



HAL
open science

Réponses des circuits corticaux aux afférences sous-corticales impliquées dans les états de vigilance

Audrey Hay

► **To cite this version:**

Audrey Hay. Réponses des circuits corticaux aux afférences sous-corticales impliquées dans les états de vigilance. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2014. Français. NNT : 2014PA066412 . tel-01127021

HAL Id: tel-01127021

<https://theses.hal.science/tel-01127021>

Submitted on 6 Mar 2015

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

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



**THÈSE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité Neurosciences
École doctorale Cerveau – Cognition – Comportement

Présentée par :
Audrey HAY

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

**Réponses des circuits corticaux aux afférences
sous-corticales impliquées dans les états de vigilance**

Soutenue le 05.09.2014
devant le jury composé de :

Dr Étienne Audinat	Rapporteur
Dr Philippe Fossier	Rapporteur
Pr Philippe Ascher	Examineur
Pr Jean-Christophe Cassel	Examineur
Dr Jean-Christophe Poncer	Examineur
Dr Bertrand Lambolez	Directeur de thèse
Dr Clément Léna	Membre invité

Université Pierre & Marie Curie - Paris 6
Bureau d'accueil, inscription des doctorants
et base de données
Esc. G, 2^me étage
15 rue de l'école de médecine
75270 - PARIS CEDEX 06

Tél. Secrétariat : 01 42 34 68 35
Fax : 01 42 34 68 40
Tél. pour les étudiants de A à EL : 01 42 34 68 41
Tél. pour les étudiants de EM à MON : 01 42 34 68 41
Tél. pour les étudiants de MOO à Z : 01 42 34 68 51
E-mail : scolarite.doctorat@upmc.fr

Table des matières

Liste des abréviations	7
Liste des publications	11
1 Avant-propos	13
I Introduction	15
1 Le réseau néocortical	17
Organisation laminaire et en colonnes du néocortex	17
Composition cellulaire du néocortex	18
La couche VIb du néocortex	23
Connectivité de la colonne corticale	27
Afférences corticales	31
Afférences sous-corticales	31
2 Encodage temporel des afférences corticales	34
Codage du stimulus sensoriel : l'inhibition antérograde	35
Codage intégratif : les activités persistantes	41
3 Le thalamus non-spécifique	50
Histoire du thalamus non-spécifique : de l'éveil cortical à la mémoire à long terme	50
Organisation topographique du thalamus non-spécifique	51
Le noyau rhomboïde : un noyau de la ligne médiane du thalamus	53
4 Le système cholinergique et ses projections corticales	59
L'acétylcholine	59
Les noyaux cholinergiques et leurs projections	61
Les récepteurs nicotiques à l'acétylcholine	63

5	Orexine : éveil et attention	72
	L'orexine ou hypocrétine : découverte et premiers rôles physiologiques . . .	72
	Rôle de l'orexine dans le cycle veille-sommeil	76
	Modulation de l'activité corticale par l'orexine	79
II	Méthodes	82
1	Etudier une synapse	84
	Enregistrer des courants synaptiques	85
	Caractéristiques des transmissions synaptique et volumique	86
	Caractérisation des récepteurs impliqués dans la synapse chimique	87
	Quantification électrophysiologique des paramètres de la synapse chimique	88
2	L'optogénétique : un outil pour l'étude spécifique de voies neuro-	92
	nales	
	La Channelrhodopsine	92
	Variations autour de ChR2	93
3	Transfert viral	96
	Un vecteur viral à expression rapide : le Sindbis	96
	Des vecteurs viraux à expression lente : le Lentivirus et l'Adéno-associated	
	virus	97
	Le cycle du virus et la conception de virus incompetents à la phase répli-	
	cative	98
	Expression spécifique du gène d'intérêt dans la cellule cible	100
III	Résultats	104
1	Présentation de l'article : "Target interneuron preference in thalamocortical pathways determines the temporal structure of cortical responses."	106
	Introduction	106
	Article	108
2	Présentation de l'article : "Orexin-dependent activation of layer VIb enhances cortical network activity and integration of non-specific thalamocortical inputs."	146
	Introduction	146
	Article	147

3	Présentation de l'article : "Cortical nicotinic synapses on excitatory and inhibitory neurons operate in a dual phasic/tonic mode."	164
	Introduction	164
	Article	166
IV	Discussion	210
1	Encodage temporel des informations liées au contexte et en particulier à l'état d'éveil de l'animal	212
	Transmission orexinergique et cycle circadien	213
	Transmission nicotinique biphasique	214
	Transmission glutamatergique thalamocorticale	216
2	Quelques réflexions sur l'existence d'une synapse nicotinique dans le cortex	217
	Anatomie des varicosités cholinergiques	217
	Apports des outils d'optogénétiques pour l'étude de la synapse nicotinique	218
	Conclusion	221
3	Rhomboïde, activités persistantes et mémoire	223
	Mémoire de travail et mémoire à long terme	223
	Réseau cortical et activités persistantes	224
	les activités prolongées induites par le Rh peuvent-elles être le substrat de la mémoire?	225
4	Conclusion générale et perspectives	227
V	Annexe 1 : Validation des modèles de souris et rats transgéniques et des vecteurs d'expression viraux pour Philippe Faure et Uwe Maskos	229
1	Introduction	231
2	Résultats	234
	Article 1 : Tolu et al., 2013	235
	Article 2 : Eddine et al., N.P.	249
	Article 3 : Morel et al., 2013	271

VI Annexe II : rôle des courants médiés par les récepteurs orphelins GluR δ 1 et GluR δ 2 dans la physiologie des neurones corticaux et de la substance noire compacte 279

1 Introduction	281
La famille des récepteurs ionotropiques au glutamate	281
Expression de GluR δ 1 et GluR δ 2	281
Phénotype des mutants de GluR δ 2	283
Rôle de GluR δ 2 dans la stabilisation d'une synapse cérébelleuse	283
GluR δ 1 et GluR δ 2 possèdent un canal fonctionnel	284
Le slow EPSC : TRPC ou GluR δ ?	285
2 Résultats	288
Les récepteurs glutamatergiques de la famille delta sont exprimés dans l'ensemble du cerveau	288
Etude du slowEPSC mGluR dans les neurones DA de la substance noire compacte	308
Bibliographie	308
Résumé	341
Summary	343

Table des figures

I.1	Propriétés des interneurons FS	22
I.2	Diversité morphologique des neurones de la couche VIb	25
I.3	Sensibilité de la couche VIb aux neuromodulateurs de l'éveil	27
I.4	Organisation de la colonne corticale	30
I.5	Projection thalamocorticales dans le cortex en tonneaux	36
I.6	Bases cellulaires de l'inhibition antérograde	39
I.7	Propriétés à court terme de l'inhibition antérograde	40
I.8	Description des activités persistantes	42
I.9	Bases moléculaires des activités persistantes	44
I.10	Incrémentation des activités persistantes	47
I.11	Localisation du rhomboïde	53
I.12	Projections corticales du rhomboïde	55
I.13	Le complexe Re/Rh dans le contrôle des flux hippocampo-corticaux	58
I.14	Les noyaux cholinergiques et leurs projections	62
I.15	Les fibres cholinergiques dans le néocortex	63
I.16	Expression des différents nAChRs dans le SNC	65
I.17	Cinétique des courants $\alpha 4\beta 2$ et $\alpha 7$	70
I.18	Synthèse de l'orexine et sa liaison à son récepteur	73
I.19	Projection des neurones à orexine et expression des OXR	75
I.20	L'orexine au cours du cycle veille-sommeil	78
II.1	Comparaison des transmissions volumique et <i>wired</i>	87
II.2	Ratio AMPA/NMDA	89
II.3	Analyse de bruit non-stationnaire	91
II.4	Structure 3D et spectre d'activation de la ChR2	93
II.5	Le cycle du virus HIV	99

II.6	Expression conditionnelle de ChR2 dans les neurones PV	102
IV.1	Synapse nicotinique vue en microscopie électronique	218
IV.2	Modèles de la transmission nicotinique dans le néocortex	222
VI.1	Arbre phylogénétique et structure des récepteurs ionotropiques au glutamate	282
VI.2	Génération du mutant GluR δ 1 -/-	282
VI.3	Enregistrement en système hétérologue et en cellule de Purkinje du courant DHPG médié par GluR δ 2	285
VI.4	Slow EPSC dans les cellules de Purkinje chez le WT et aboli chez le Hotfoot	286

Liste des abréviations principales

Structures cérébrales

ARAS	<i>activating reticular arousal system</i>
DR	Raphé dorsal
GP	<i>globus pallidus</i>
HDB	bande horizontale de Broca
ILN	noyau intralaminaire
LC	<i>locus coeruleus</i>
LDTg	noyau tegmental laterodorsal
IGN	noyau géniculé latéral
mPFC	cortex préfrontal médian
MTN	noyaux thalamiques de la ligne de milieu
NRT	noyau réticulé thalamique
NTM	noyau tubéromammillaire
POm	noyau postéro-médian
PPTg	noyau tegmental pédonculopontin
Re	réuniens
Rh	rhomboïde
SI	<i>substantia innominata</i>
SNc	substance noire compacte
SNC	système nerveux central
TC	thalamo-cortical
VB	noyau ventro-basal
VDB	bande verticale de Broca
VPM	noyau ventro-postérieur médian
VTA	aire tegmentale ventrale

Protéines du métabolisme et du transport des neurotransmetteurs

AcCoA	acétylcoenzyme A
AChE	acétylcholinestérase
ChAT	choline-acétyl-transférase
GAD	Glutamate decarboxylase
VAChT	transporteur vésiculaire de l'acétylcholine
vGluT	transporteur vésiculaire du glutamate

Électrophysiologie

EC50	concentration efficace médiane
EPSC	courant post-synaptique excitateur
EPSP	potentiel post-synaptique excitateur
HS	haute sensibilité
IB	décharge en bouffée intrinsèque
IPSC	courant post-synaptique inhibiteur
I-V	voltage-courant
LS	basse affinité
mEPSC	courant post-synaptique excitateur miniature
mIPSC	courant post-synaptique inhibiteur miniature
RS	<i>regular spiking</i>
RSNP	<i>regular spiking non pyramidal neuron</i>
sEPSC	courant post-synaptique excitateur spontané
slowEPSC	courant post-synaptique excitateur lent

Autres molécules biologiques

ADNc	acide désoxyribonucléique circulaire
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATP	adénosine triphosphate
Cb	calbinding
CCK	cholécystokinine
Cr	calrétinine
EF-1α	<i>elongation factor I-α</i>
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
GFP	protéine verte fluorescente
GMPc	guanosine monophosphate cyclique
GTP	guanosine triphosphate
PKA	protéine kinase A
PV	parvalbumine
SOM	somatostatine
SNP	<i>single nucleotide polymorphisme</i>
VIP	peptide vasoactif intestinal

Sommeil

REM	<i>rapid eye movement</i>
SWS	<i>slow wave sleep</i>

Récepteurs

5-HT₃R	récepteur à la sérotonine 3
AMPA	acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique
ChR2	channelrhodopsine
GABAR	récepteur du acide γ -aminobutyrique
iGluR	récepteur ionotropique au glutamate
mGluR	récepteur métabotropique au glutamate
nAChR	récepteur nicotinique à l'acétylcholine
NMDA	acide N-méthyl-D-aspartique
OXxR	récepteur à l'orexine de type x
TRPC	<i>transient receptor potential channel</i>

Agonistes, antagonistes, etc.

α-BGT	bungarotoxine- α
DHβE	dihydro- β -érythroïdine
DHPG	3,5-dihydroxyphenylglycine
MLA	méthyllycaconitine
TTX	tétradontoxine

Sous-types neuronaux

Ad	<i>adapting interneuron</i>
FS	<i>fast-spiking</i>
SSN	<i>spiny stellate neuron</i> ou neurone étoilé épineux

Animaux et virus

AAV	<i>adeno-associated virus</i>
KO	<i>knock-out</i>
Lv	lentivirus
Sb	sindbis
WT	<i>wild-type</i>

Tests comportementaux

DC-RAM	<i>delayed choice radial arm maze</i>
DNMTP	<i>delayed non-matching to position</i>
VC-DNM	<i>varying choice delayed non-matching</i>
WS-RAM	<i>win/shift radial arm maze</i>

Liste des publications

Publications principales

Hay YA, Andjelic S, Badr S, Lambolez B. **Orexin-dependent activation of layer vib enhances cortical network activity and integration of non-specific thalamocortical inputs.** *Brain Structure and Function* 2014. PMID : 25108310.

Hay YA, Lambolez B*, Tricoire L*. **Cortical nicotinic synapses on excitatory and inhibitory neurons operate in a dual phasic/tonic mode.** *Soumis.*

Hay YA, Naudé J, Faure P, Lambolez B. **Target interneuron preference in thalamocortical pathways determines the temporal structure of cortical responses.** *Soumis.*

Publications issus de collaborations

Tolu S*, Eddine R*, Marti F*, David V, Graupner M, Pons S, Baudonnat M, Husson M, Besson M, Reperant C, Zemdegs J, Pagès C, Hay YA, Lambolez B, Caboche J, Gutkin B, Gardier AM, Changeux JP, Faure P, Maskos U. **Co-activation of VTA DA and GABA neurons mediates nicotine reinforcement.** *Molecular Psychiatry* 2013. PMID : 22751493.

Morel C*, Fattore L*, Pons S, Hay YA, Marti F, De Biasi M, Lathrop M, Lambolez B, Fratta W, Maskos U, Faure P. **Nicotine consumption is regulated by a human polymorphism expressed in the dopaminergic system.** *Molecular Psychiatry* 2013. PMID : 24296975.

Hepp R, Hay YA, Aguado C, Lujan R, Dauphinot L, Potier MC, Nomura S, Poirel O, El Mestikawy S, Lambolez B*, Tricoire L*. **Glutamate receptors of the delta family are widely expressed in the adult brain.** *Brain Structure and Function* 2014. PMID : 25001082.

Eddine* R, Valverde* S, Hay YA, Morel C, Tolu S, Lambolez B, Marti F, Faure P. **Dopaminergic responses to nicotine and alcohol are anatomically dependent.** *Soumis.*

1 | Avant-propos

Le néocortex est le siège de processus cognitifs complexes tels que l'intégration des informations sensorielles, la formation de traces mnémoniques ou la prise de décision. L'ensemble de ces processus est fortement dépendant des états d'éveil ou du niveau d'attention qui sont modulés par différentes structures sous-corticales.

Les enregistrements EEG montrent que les activités électriques du néocortex dépendent très fortement des états de vigilance. En particulier, le sommeil profond, ou sommeil à ondes lentes, se caractérise par la présence d'oscillations lentes et de grande amplitude qui suggèrent une forte synchronisation du réseau cortical. À l'inverse, durant l'éveil les enregistrements présentent des oscillations plus rapides et de moins grande amplitude qui suggèrent une désynchronisation du réseau. De façon intéressante, la désynchronisation est d'autant plus prononcée que l'animal est dans un état d'éveil actif.

Le niveau de synchronisation du réseau cortical dépend de l'activité différentielle des différents types de neurones qui le composent. Les neurones corticaux présentent une très large diversité. Dans le cadre de cette étude, nous les avons regroupés en trois catégories principales : les neurones excitateurs qui représentent 80 % des cellules et deux populations de neurones inhibiteurs les interneurones à décharge rapide et les interneurones à adaptation de décharge. L'activation spécifique ou synchrone d'une ou plusieurs de ces populations joue un rôle prépondérant dans la génération et le maintien des états de vigilance. Il est donc central de comprendre comment les structures sous-corticales impliquées dans la modulation des états de vigilance agissent sur les différents sous-types de neurones corticaux afin de comprendre comment sont induits et maintenus les différents états d'éveil.

L'étude de la sensibilité des neurones corticaux aux neuromodulateurs des régions sous-corticales fait l'objet d'une dense littérature. En particulier, la caractérisation des réponses électrophysiologiques à l'application des neuromodulateurs a mis en évidence que les différents sous-types de neurones corticaux ne présentent pas une réponse ubiquitaire aux modulateurs de l'éveil. Ces différences de réponse dépendent du type cellulaire mais aussi de la couche corticale ou de l'aire corticale considérée. De plus, la réponse dépend du type de récepteur exprimé par la cellule et peut ainsi varier en amplitude et durée mais aussi en nature : excitation ou

inhibition. Cependant, la résultante globale de l'excitation ou de l'inhibition des différents types de neurones sur la dynamique du réseau cortical reste largement inconnue.

J'ai donc cherché au cours de ma thèse à comprendre le mécanisme d'action sur le réseau cortical de structures promotrices de l'éveil. Je me suis en particulier intéressée à l'hypothalamus latéral, les noyaux basaux et le thalamus non-spécifique qui projettent de façon étendue dans le néocortex et ciblent toutes de façon ubiquitaire la couche VIb du néocortex. Pour cela, je me suis placée à trois échelles : le récepteur, le type cellulaire et la couche corticale.

Afin de mettre en contexte mes articles, je commencerai dans l'introduction par présenter le réseau cortical et deux phénomènes corticaux qui montrent comment la modulation différentielle des différents types neuronaux influence la dynamique corticale. Ensuite, je décrirai les trois structures sous-corticales auxquelles je me suis intéressée : le thalamus non-spécifique, les noyaux basaux et les neurones à orexine de l'hypothalamus latéral.

Première partie

Introduction

1 | Le réseau néocortical

Le néocortex appartient au télencéphale, dont il constitue l'écorce. Il est impliqué dans l'ensemble des processus cognitifs complexes tels que la coordination des mouvements, la reconnaissance des objets ou des sons, le langage, la motivation ou encore le stockage et le rappel de la mémoire. Ces différents processus mettent en jeu des aires ou des combinaisons d'aires corticales et sous-corticales différentes. Chez l'Homme on divise classiquement le cortex en quatre lobes : le lobe frontal, région antérieure qui contient entre autres le cortex frontal et les aires motrices ; le lobe pariétal qui englobe des régions somesthésiques et de stockage de mémoire ; le lobe temporal qui est impliqué dans le traitement de l'information auditive et le lobe occipital qui contient les aires visuelles.

Organisation laminaire et en colonnes du néocortex

Pour bien comprendre le fonctionnement du néocortex et la façon dont sont traitées les informations afférentes, il est impératif de s'intéresser à la fois à l'organisation en colonnes et à l'organisation laminaire du néocortex.

Le néocortex est composé de six couches qui ont été originellement mises en évidence par coloration de Nissl et imprégnation argentique (réaction noire de Golgi). Ces six couches présentent des propriétés cytoarchitecturales et des connectivités particulières.

La couche I présente une très faible densité neuronale, l'essentiel de son volume étant occupé par des fibres nerveuses. Les couches II à VI sont composées à 80% de neurones excitateurs. Ces neurones sont pyramidaux dans les couches II, III, V et VIa, pyramidaux et étoilés dans la couche IV et polymorphes dans la couche VIb. La couche IV est nommée granulaire du fait de sa haute densité cellulaire, en conséquence on nommera les couches I à III supragranulaires et les couches V à VIb infragranulaires. Les six couches reçoivent des afférences différentes et participent donc à l'intégration des informations à plusieurs niveaux du processus. L'épaisseur des couches dépend du cortex considéré. Ainsi dans un cortex sensoriel, la couche IV, cible principale des entrées sensorielles, sera particulièrement développée. À

l'inverse, dans les aires plus associatives, recevant peu d'entrées sensorielles, cette couche sera plus fine alors que la couche V, qui reçoit des afférences corticocorticales et renvoie des informations dans les autres aires corticales et sous-corticales sera plus développée.

Le néocortex est assemblé en colonnes corticales. On retrouve cette organisation dans l'ensemble des aires du néocortex (voir Douglas and Martin, 2004 pour revue). Ces colonnes verticales forment des micro-réseaux qui impliquent les neurones des six couches. Leur section est d'environ 0.3 mm^2 et contient environ 7500 neurones (Markram et al., 2004, Meyer et al., 2010). Les neurones des colonnes projettent de façon préférentielle sur les autres neurones de la colonne et reçoivent majoritairement des informations de leur colonne. Les colonnes sont des unités morphologiques et fonctionnelles. Dans les cortex sensorielles, elles répondent à un stimulus : visuel, somesthésique, auditif, etc. Après la description des différents types cellulaires corticaux, nous reviendrons sur la connectivité à l'intérieur d'une colonne corticale ainsi que sur les voies d'entrées et de sorties de la colonne.

Composition cellulaire du néocortex

Le néocortex contient deux principaux types cellulaires : les neurones glutamatergiques excitateurs qui représentent environ 80% des neurones et les neurones GABAergiques locaux inhibiteurs qui constituent les 20% restants. Ces deux types de neurones sont d'origines embryonnaires différentes puisque les neurones glutamatergiques sont produits dans la zone de prolifération du néocortex tandis que les neurones GABAergiques proviennent du neuroépithélium du télencéphale (Andersen et al., 2002).

Derrière cette apparente simplicité se cache une grande diversité de la morphologie, du transcriptome et des projections de ces neurones. Par conséquent, tant les neurones glutamatergiques que les cellules GABAergiques ont été le sujet de nombreuses études de classification.

Les neurones excitateurs

Dans la majorité des cortex étudiés, les neurones glutamatergiques ont été discriminés en fonction de la couche corticale à laquelle ils appartiennent (Simonnet et al., 2013). On trouve des neurones glutamatergiques dans toutes les couches du néocortex à l'exception de la couche I. Les couches II/III, V et VIa sont composées de neurones pyramidaux classiques (Peters and Jones, 1984). Ces cellules se caractérisent par un soma de forme pyramidale avec un dendrite apical principal dirigé vers la surface piaie et des dendrites secondaires basales. Ces dendrites présentent une importante densité d'épines. Les pyramides sont parfois classifiées en

fonction de la zone de terminaison de l'arbre dendritique. L'axone part en général de la base de la pyramide et peut soit projeter localement soit plonger dans la matière blanche pour projeter à plus longue distance. La couche IV est composée à la fois de pyramides et de neurones étoilés (Schubert et al., 2003, Staiger et al., 2004). Ces derniers présentent un soma moins volumineux et ont une large arborisation dendritique sphérique autour du soma, ils reçoivent la majorité des entrées sensorielles. Enfin, les neurones de la couche VIb présentent une large diversité morphologique qui fera l'objet d'une description plus approfondie ultérieurement dans ce chapitre.

Les interneurones GABAergiques

Le néocortex est composé d'environ 20% d'interneurones GABAergiques. Ce sont des neurones peu ou pas épineux qui reçoivent des projections excitatrices et inhibitrices sur le soma et l'arbre dendritique. Ils projettent localement et ciblent des régions et des types neuronaux différents selon le type d'interneurones (pour une revue voir Markram et al., 2004).

Les interneurones corticaux sont classiquement classifiés en fonction de divers paramètres : la morphologie, les propriétés passives de membrane, les propriétés du potentiel d'action et de décharge, l'expression de gènes codant des neuropeptides ou des chélateurs calciques (Houser et al., 1983, Hendry et al., 1983, Kawaguchi, 1993, Kubota et al., 1994, Kawaguchi, 1997, Cauli et al., 1997, 2000, Karagiannis et al., 2009, Xu et al., 2010). Récemment, le groupement pour la nomenclature des interneurones Petilla (PING) regroupant les principaux investigateurs du domaine se sont accordés sur une terminologie permettant de décrire les différents types d'interneurones corticaux (Ascoli et al., 2008). Dans un second temps, le PING a tenté une synthèse des connaissances afin d'élaborer une classification consensuelle. Cependant, il ressort de cette étude que les différents paramètres précédemment décrits ne le permettent pas. De plus, les auteurs pointent du doigt la subjectivité d'un certain nombre d'analyses, en particulier les analyses morphologiques. Ils suggèrent donc la mise au point d'un outil informatique de classification automatisé et objectif : le "Neuroclassifier" (DeFelipe et al., 2013). En attendant, l'avènement de la classification ultime, nous diviserons les interneurones corticaux en trois catégories arbitraires et subjectives : les interneurones de la couche I, les interneurones fast-spiking (FS) et les interneurones adapting (Ad). Cette dernière catégorie regroupe tous les interneurones non-FS : interneurones à somatostatine (SOM), à peptide vasoactif intestinal (VIP) ou encore à calrétinine (Cr).

Les interneurons de la couche I

La couche I est la couche présentant la plus faible densité de neurones, elle est principalement composée de projections axoniques et dendritiques massives de l'ensemble des couches de la colonne corticale ainsi que des projections corticales distales. Enfin, elle reçoit des afférences de nombreuses structures sous-corticales : thalamiques et cholinergiques entre autres (Herkenham and Pert, 1981, Arroyo et al., 2012, Bennett et al., 2012, Cruikshank et al., 2012).

Les interneurons de la couche I forment une population d'interneurons GABAergiques relativement homogène avec des somas de petites tailles et ronds. D'un point de vue électrophysiologique, ils présentent une résistance d'entrée relativement faible ($\sim 100 \text{ M}\Omega$), des potentiels d'action plus rapides que ceux des neurones excitateurs mais plus épais que ceux des FS ($\sim 1.2 \text{ ms}$) et une fréquence maximale de décharge également intermédiaire ($\sim 50 \text{ Hz}$). Une large proportion des interneurons de la couche I est de type *late spiking* bien que quelques neurones déchargeant en bouffées ou de type FS aient pu être enregistrés (Hestrin and Armstrong, 1996, Chu et al., 2003, Wozny and Williams, 2011).

Morphologiquement, on peut identifier deux principales populations d'interneurons : les neurogliaformes et les fusiformes. Les neurones neurogliaformes présentent un soma localisé plutôt dans la partie profonde de la couche I et un arbre dendritique très dense contenu en couche I. Ces neurones projettent très localement puisque l'axone est ségrégué en couche I ou de façon éparse dans les parties superficielles de la couche II (Hestrin and Armstrong, 1996, Christophe et al., 2002, Chu et al., 2003). Ils auraient donc une action inhibitrice sur les arborisations dendritiques distales des pyramides des couches II/III et V. L'autre population de morphologie fusiforme verticale pourrait projeter jusqu'en couche V dans la colonne corticale. Cette population a un réseau dendritique moins développé et pourrait agir de façon plus diversifiée sur les différentes régions dendritiques de ses cibles. Ces neurones fusiformes verticaux se rapprochent des interneurons fusiformes verticaux des autres couches avec lesquels ils partagent la particularité d'exprimer le VIP (Hestrin and Armstrong, 1996, Christophe et al., 2002, Chu et al., 2003, Xu et al., 2010).

Une troisième population nettement différenciée peut être observée chez le juvénile et semble disparaître après la fin de la deuxième semaine post-natale, il s'agit des cellules de Cajal-Retzius. Ces neurones horizontaux sont allongés dans le sens de la surface et leurs prolongements ont globalement la même orientation. Ces prolongements sont souvent très épais et ne semblent pas former de synapses (Hestrin and Armstrong, 1996).

Les interneurons de type FS

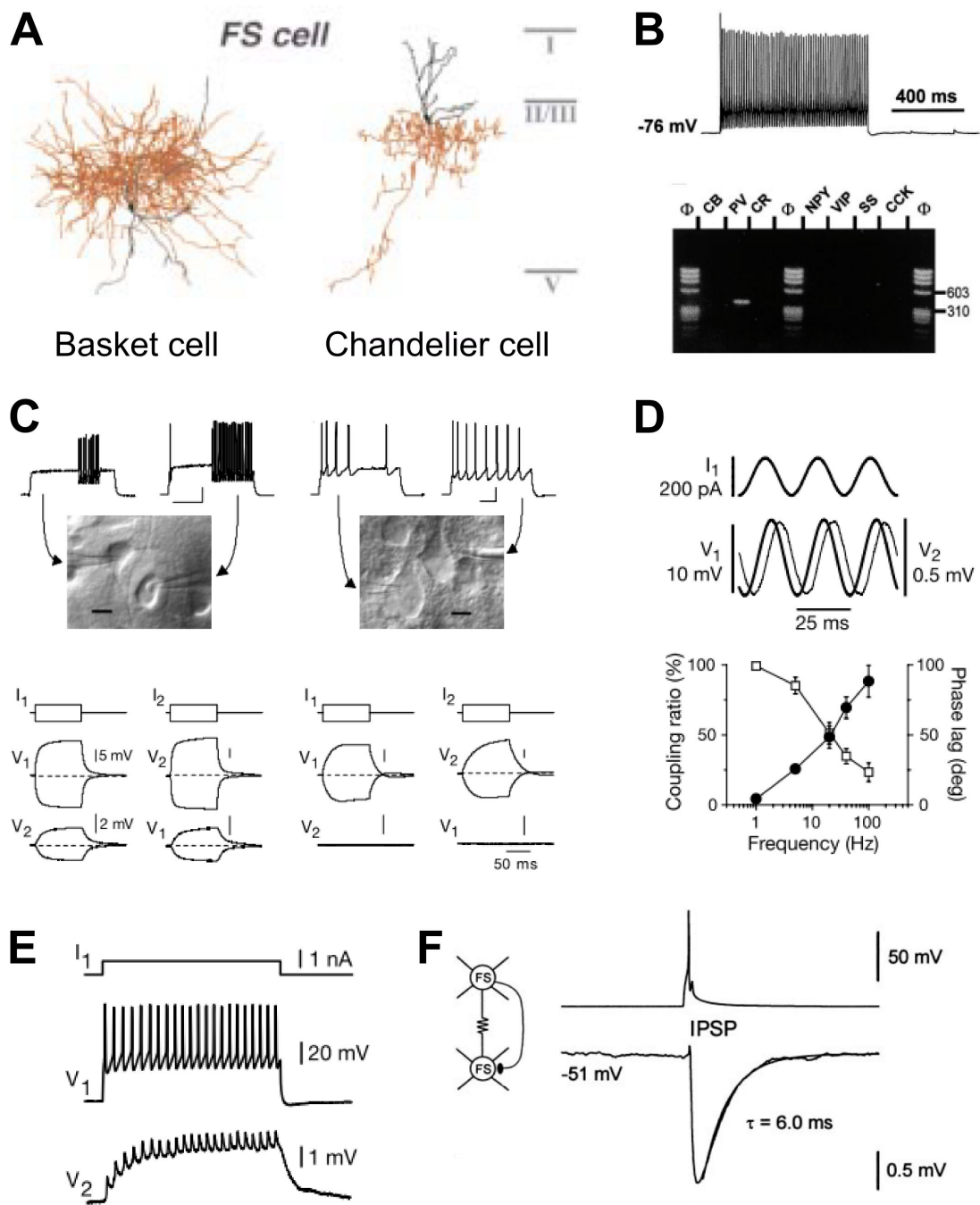
On trouve des interneurons FS de la couche II à la couche VI. Ils se distinguent très nettement des autres types neuronaux corticaux par leur signature électrophysiologique et l'expression de la parvalbulmine, un chélateur calcique puissant. Les FS se caractérisent par une faible résistance d'entrée ($\sim 100 \text{ M}\Omega$), des potentiels d'action rapides ($< 0.6 \text{ ms}$ en général) et une fréquence maximale de décharge élevée ($> 100 \text{ Hz}$). Morphologiquement, ils appartiennent aux neurones dits en panier (*basket cells*) ou en chandelier (Figure I.1A et B ; Kubota et al., 1994, Kawaguchi, 1995, Cauli et al., 1997, Kawaguchi, 1997).

Ces interneurons forment des réseaux locaux très interconnectés tant par synapse chimique ($\sim 50\%$ de probabilité de connexion) que par synapse électrique ($\sim 60\%$ de probabilité de connexion). Le couplage électrique permet l'émission synchrone de potentiels d'action et donc génèrent un tonus inhibiteur dans la colonne corticale impliquée (Figure I.1 C, D et E ; Galarreta and Hestrin, 1999, Gibson et al., 1999, Galarreta and Hestrin, 2002). Le couplage électrique permet aussi la synchronisation du réseau d'interneurons FS et autorise la mise en place d'oscillations du réseau. Ces oscillations ont été bien caractérisées et les analyses montrent en particulier qu'elles s'accompagnent d'un décalage de phase qui augmente avec l'augmentation de la fréquence des oscillations, suggérant que le couplage électrique permet à la fois de synchroniser le réseau inhibiteur et de donner une marque de fréquence (Figure I.1 D et Galarreta and Hestrin, 1999). Mais le réseau FS est aussi très largement interconnecté via un réseau de synapses GABAergiques (Figure I.1 F). Cette inhibition, souvent réciproque, pourrait être impliquée dans le maintien de la fenêtre temporelle d'activation des neurones et augmenterait ainsi la précision de décharge des potentiels d'action (*spike-timing precision*). Il a été également proposé que les interneurons FS pourraient s'auto-inhiber en formant des synapses chimiques sur elles-mêmes (nommées autapses, Bacci et al., 2003).

Les FS projettent sur les neurones pyramidaux et les autres interneurons de la colonne corticale ($\sim 45\%$ sur les pyramides $\sim 33\%$ sur les Ad ; Gibson et al., 1999, Beierlein et al., 2003). Ils font généralement des synapses dans les régions proximales et sur les somas des neurones excitateurs (Kawaguchi, 1997). Ces contacts proximaux sont impliqués dans les processus d'inhibition antérograde qui seront décrits ultérieurement.

Les interneurons de type *adapting* ou *regular spiking non-pyramidal neurons*

Les autres types d'interneurons peuvent être regroupés sous le terme d'interneurons *adapting* (Ad) ou neurones réguliers non-pyramidaux (RSNP). Beaucoup de travaux sur les dynamiques de réseau se limitent à ce degré de précision,



c'est d'ailleurs ce que nous ferons dans l'étude des projections du thalamus-non-spécifique, mais cette population est hétérogène et peut être divisée en plusieurs sous-populations.

En fonction des critères définis précédemment (morphologie, propriétés passives

FIGURE I.1 (*page précédente*) – Les interneurons FS : morphologie, électrophysiologie, scPCR et synapses chimique et électrique. **A.** Morphologie en *basket* et en chandelier. En rouge les axones et en noir les dendrites. *D’après Kawaguchi, 1997.* **B.** Caractérisation électrophysiologique et moléculaire. *Adapté de Cauli et al., 1997.* **C.** Couplage électrique entre les interneurons FS mais pas entre les pyramides. **D.** Décalage de phase lors de la propagation des rythmes dans le réseau FS couplé électriquement. **E.** Effet filtre passe bas au cours d’un train, mais les PAs restent visibles. *B, C, D, E Adapté de Galarreta and Hestrin, 1999.* **F.** Paire couplée électriquement et chimiquement : l’excitation électrique précède l’inhibition GABAergique. *D’après Galarreta and Hestrin, 2002.*

de membrane, propriétés de décharge, expression des gènes codant des neuropeptides ou des chélateurs calciques), on sépare les interneurons Ad en : neurones late spiking neurogliaformes, cellules de Martinotti exprimant la somatostatine (SOM) ou interneurons à bas seuil de décharge (*low threshold spiking* ou LTS) et cellules à double bouquet exprimant le peptide vasoactif intestinal (VIP). Ces derniers peuvent également, chez le rongeur, exprimer la choline-acétyl-transférase (ChAT), ils sont donc à la fois GABAergiques et cholinergiques (Kawaguchi, 1997, Porter et al., 1998). On distingue aussi parfois selon les études les neurones à neuropeptide Y (NPY, Karagiannis et al., 2009) et les neurones à Cholecystokinine (CCK). Néanmoins, comme ces marqueurs sont exprimés par certains types de neurones des précédentes catégories et que ces neurones présentent des morphologies diverses, il n’est pas aisé de les définir comme une population aux critères d’inclusion stricts.

Les classifications peuvent encore être raffinées jusqu’à définir plusieurs dizaines de sous-types d’interneurones corticaux (Markram et al., 2004), mais les frontières entre ces sous-types deviennent alors floues et on pourrait alors envisager un continuum d’interneurones se basant sur des paramètres électrophysiologiques et morphologiques (Battaglia et al., 2013).

A l’instar des FS, les interneurons Ad sont couplés électriquement avec une forte probabilité ($\sim 50\%$; Gibson et al., 1999) tandis qu’ils sont plus rarement couplés synaptiquement. On peut toutefois constater que la probabilité de connexion dépend fortement du sous-type cellulaire, ainsi un sous-type (VIP, SOM, etc) va préférentiellement se connecter à une cellule du même sous-type cellulaire. Enfin, les Ad projettent souvent dans des régions plus distales de l’arbre dendritique que les FS (pour une revue voir par exemple Markram et al., 2004).

La couche VIb du néocortex

Très peu d'études ont porté sur la couche VIb, aussi nommée couche "plexiforme", couche polymorphe ou couche VII. Elle est située en bordure du néocortex à la limite de la matière blanche et serait séparée du reste du cortex par une mince bande fibreuse (Clancy and Cauller, 1999, Bayer et al., 2002a). Cette mince couche neuronale présente un marquage de la phosphate-activated glutaminase, une enzyme de l'anabolisme du glutamate, suggérant que les neurones de la couche VIb sont principalement glutamatergiques (Van der Gucht et al., 2003).

Les données encore lacunaires sur la couche VIb sont souvent contradictoires. Les études anatomiques suggèrent que la couche VIb est la voie de retour principale du néocortex vers les noyaux du thalamus non-spécifique alors que les pyramides de la couche VIa forment le principal retour du néocortex vers les noyaux relais du thalamus (Usrey and Fitzpatrick, 1996, Zarrinpar and Callaway, 2006). Du fait de ses projections diffuses à travers les différentes couches corticales et de sa situation de principale région de projection du thalamus non-spécifique (Herkenham, 1980), elle pourrait servir de relais pour les entrées thalamiques non-spécifiques et pourrait ainsi relayer un message excitateur pour l'ensemble du cortex.

Origine embryonnaire controversée

Une première controverse concerne l'origine embryologique de la couche VIb. Couche à part entière pour certains auteurs (Valverde et al., 1989), elle serait composée de neurones résidus de la *subplate* et n'ayant pas migré pour d'autres (Clancy and Cauller, 1999, Torres-Reveron and Friedlander, 2007). Dans cette hypothèse, les neurones issus de la *subplate* seraient tous excitateurs. Cependant, des travaux récents démontrent l'existence de neurones GABAergiques au sein de la couche VIb (Andjelic et al., 2009, Perrenoud et al., 2013). Ces interneurons inhibiteurs possèdent des propriétés électrophysiologiques et un profil d'expression moléculaire typiques des interneurons corticaux (Cauli et al., 1997) et à l'instar des autres couches, ils constituent environ 20% des neurones de la couche VIb. L'hypothèse privilégiée à l'heure actuelle est donc que la couche VIb est une couche néocorticale à part entière, dont la neurogenèse se déroule de E12 à E14 et dont les neurones bipolaires, horizontaux au début du développement, se transforment en neurones horizontaux et en pyramides atypiques autour de P1 (Valverde et al., 1989). Les neurones résidus de la *subplate* survivraient jusqu'à la 2^{me} semaine post-natale avant de disparaître (Torres-Reveron and Friedlander, 2007).

Grande diversité morphologique

La couche VIb se différencie des autres couches corticales par la diversité morphologique des neurones excitateurs, ce qui lui a valu le nom de couche polymorphe. Contrairement aux couches II-VIa dont les neurones excitateurs sont très largement des pyramides au sens strict du terme, la couche VIb contient peu de telles pyramides (Tömböl, 1984).

Les diverses études visant à déterminer des classes morphologiques ont montré quatre formes prédominantes pour les neurones excitateurs : les pyramides obliques, qui présentent un dendrite apical dirigé à environ 45° de la surface piaie, les pyramides inversées, les neurones bipolaires horizontaux parallèles aux fibres de la matière blanche et les neurones bipolaires verticaux (Figure I.2). Enfin 25% des neurones ne sont pas catégorisables (Meller et al., 1968, Tömböl, 1984, Brederode and Snyder, 1992, Andjelic et al., 2009, Marx and Feldmeyer, 2013). Bien que de morphologies diverses, ces neurones présentent des profils électrophysiologiques et moléculaires (déterminés par RT-PCR sur cellule unique) très semblables. Un des rares traits qui distingue les neurones de la couche VIb des neurones des autres couches du néocortex est peut-être la largeur des potentiels d'action qui est légèrement supérieure dans la couche VIb (Andjelic et al., 2009).

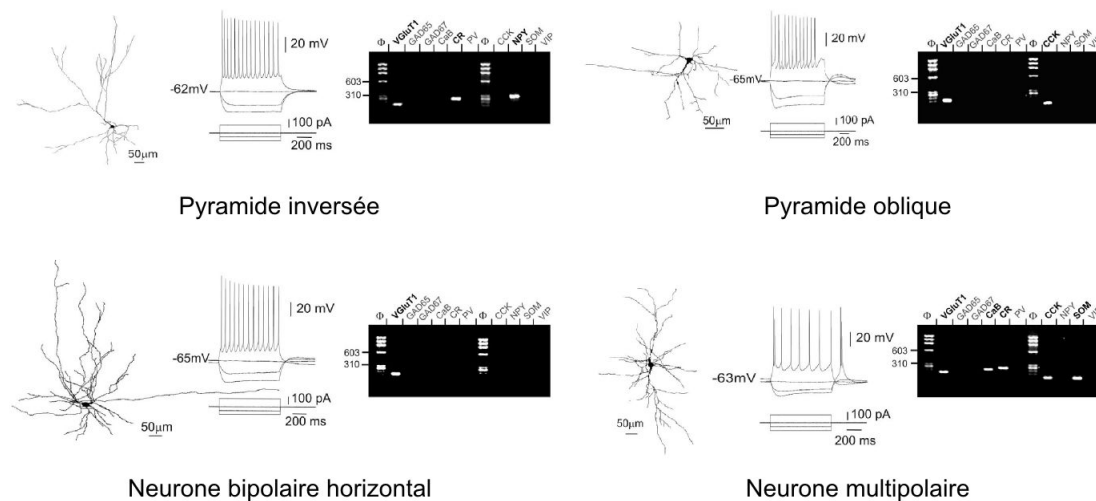


FIGURE I.2 – Diversité morphologique des neurones de la couche VIb. *D'après Andjelic et al., 2009*

L'étude des interneurones de la couche VIb est encore plus délicate. Bien que Zarrinpar et ses collaborateurs ne relèvent aucune synapse symétrique au sein de la couche VIb et suggèrent même l'absence de neurones inhibiteurs (Zarrinpar and Callaway, 2006), d'autres études montrent la présence de neurones GABAergiques

(Arimatsu et al., 2003, Xu et al., 2010, Perrenoud et al., 2013). Les travaux menés au laboratoire par S. Andjelic ont montré l'existence de neurones exprimant les marqueurs des interneurons GABAergiques (GAD65, GAD67) dont certains ont un profil de décharge à potentiels d'action fins et à haute fréquence similaire à celui des interneurons FS des couches supérieures (Kawaguchi, 1993, Cauli et al., 1997). D'autre part, une étude récente combinant RT-PCR sur cellule unique, électrophysiologie et reconstruction morphologique démontre que les interneurons de la couche VIb présentent une diversité morphologique similaire à celle des autres couches (Perrenoud et al., 2013).

Un fait intrigant mérite enfin d'être relevé : les données moléculaires obtenues au laboratoire (non publiées) montrent une large coexpression du marqueur glutamatergique (vGluT1) et des marqueurs GABAergiques (GAD65 et GAD67) et électrophysiologiquement ces neurones présentent des potentiels d'action large (> 1.2 ms à mi-hauteur). De plus, une étude réalisée par Van Der Gucht et ses collaborateurs montre par immunohistochimie la présence conjointe dans certains neurones de la couche VIb de la phosphate-activated glutaminase, une enzyme de l'anabolisme du glutamate et de certains marqueurs typiques des neurones GABAergiques (PV, Cb, Cr) qu'on retrouve très peu dans les autres couches corticales (Van der Gucht et al., 2003). Ces données pourraient laisser suggérer une possible co-libération de glutamate et de GABA par les neurones de la couche VIb. Cependant, ces analyses moléculaires étant effectuées sur des animaux jeunes (P14 à P18), la co-expression de vGluT1 et des GAD pourraient être un effet transitoire de maturation de la couche VIb.

Projections intracorticales et thalamiques

Les données concernant les projections de la couche VIb restent encore très lacunaires et parfois même contradictoires. De façon classique, les neurones excitateurs de la couche VI sont divisés en trois catégories : les neurones corticocorticaux, en général des pyramides de la couche VIa, projettent vers la couche IV, les neurones corticothalamiques de la couche VIa projettent vers les noyaux relais du thalamus et le NRT et envoient des collatérales jusqu'en couche III et enfin les neurones corticothalamiques de la couche VIb projettent vers les noyaux relais et les noyaux non-spécifiques du thalamus (Usrey and Fitzpatrick, 1996, Mercer et al., 2005, Zarrinpar and Callaway, 2006) . Néanmoins, les aires de projections intracorticales de la couche VIb sont toujours débattues. D'après Mercer et ses collaborateurs (Mercer et al., 2005), il semblerait que les neurones excitateurs de la couche VIb projettent dans la couche V principalement, ce que dément l'étude de Usrey et Fitzpatrick qui soutient que ces neurones traversent les couches IV et V sans établir de connexion et projettent en couche II/III. Une troisième étude menée par Clancy et Cauller indique qu'une fraction des neurones de la couche VIb projette

dans la couche I (Clancy and Cauller, 1999). Enfin, les neurones de la couche VIb expriment *Nurr1*, un marqueur de projections ipsilatérales à longue distance, de façon plus générale que dans les autres couches, suggérant que ces neurones pourraient envoyer des projections hors de la colonne corticale voire dans d'autres aires corticales (Arimatsu et al., 2003).

Les cibles cellulaires des neurones de la couche VIb ont été très peu étudiées. On notera tout de même que les neurones corticocorticaux de la couche VI, comprenant donc probablement des neurones de la couche VIb, font deux à quatre fois plus de connexions avec les neurones corticocorticaux qu'avec les neurones corticothalamiques (Mercer et al., 2005). Ces derniers ciblent en effet plutôt les interneurons ($\sim 50\%$ de probabilité de contact) et très peu les pyramides ($\sim 1.25\%$, West et al., 2006). Enfin, les travaux de Prieto et Winer suggèrent qu'environ 15% des projections commissurales proviennent des neurones non-horizontaux de la couche VIb (Prieto and Winer, 1999).

Sensibilité aux neuromodulateurs de l'éveil

Le trait le plus caractéristique de la couche VIb est sa sensibilité aux deux principaux neuromodulateurs de l'éveil : l'orexine et l'acétylcholine. En effet, les travaux de Bayer et collaborateurs ont montré que la couche VIb est la seule couche du néocortex sensible à l'orexine, un des principaux peptides impliqué dans la régulation du cycle circadien (cf chapitre 5 de l'introduction, Figure I.3 et Bayer et al., 2004). La spécificité de cette réponse est d'autant plus nette qu'elle affecte l'ensemble des neurones testés dans la couche VIb, et aucun dans les autres couches et qu'elle est reproductible d'une aire corticale à l'autre (Bayer et al., 2004). De plus, les travaux menés par l'équipe de E. Lambe ont mis en évidence une réponse ubiquitaire des neurones de la couche VI aux agonistes nicotiques qui excitent à la fois les pyramides classiques de la couche VIa et les neurones glutamatergiques atypiques de la couche VIb (Figure I.3). Leurs résultats suggèrent que l'excitation cholinergique est soutenue par l'expression des récepteurs hétéromériques de type $\alpha 4\alpha 5\beta 2$ (Kassam et al., 2008). L'expression des récepteurs $\alpha 4$, $\alpha 5$ et $\beta 2$ a bien été retrouvée par scRT-PCR au laboratoire et est confirmée par pharmacologie. Néanmoins, on rediscutera ultérieurement de l'expression de la sous-unité $\alpha 5$ dans la couche VIa tout au long de la vie post-natale ainsi que de son expression dans la couche VIb après P15 (Winzer-Serhan and Leslie, 2005). Il est intéressant de noter que si la couche VI présente une sensibilité générale aux agonistes nicotiques, cette sensibilité est restreinte à certains types d'interneurones dans les autres couches du néocortex (voir chapitre 4 de l'introduction, Porter et al., 1999, Christophe et al., 2002).

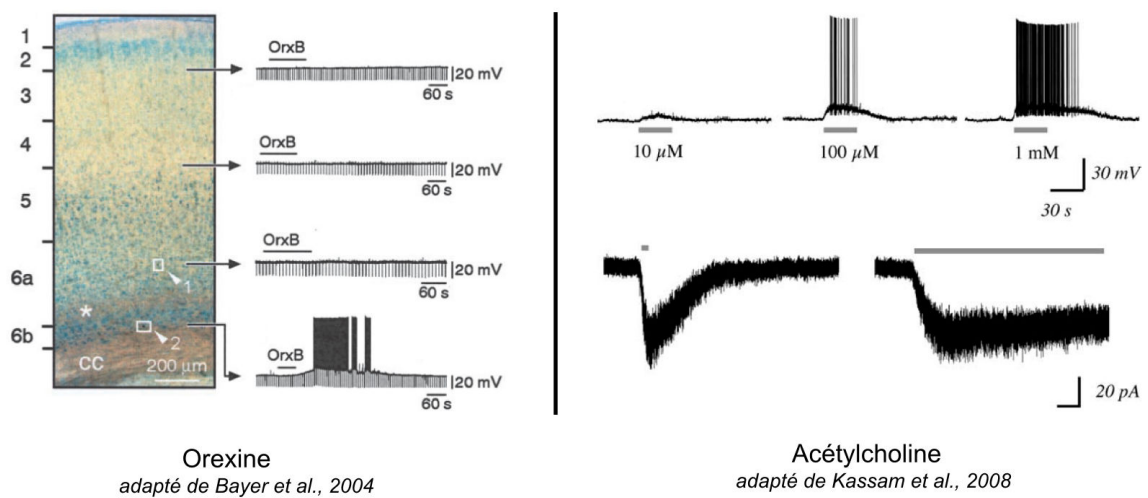


FIGURE I.3 – Sensibilité de la couche VIb à l'orexine et à l'acétylcholine

Connectivité de la colonne corticale

Les neurones corticaux situés dans un même plan dorso-ventral définissent une colonne corticale. Cette colonne est constituée de moins de 10000 neurones répartis de la couche I à la couche VIb. Ces neurones forment des micro-circuits dont l'architecture est stéréotypée dans l'ensemble des aires corticales (Silberberg et al., 2002). Ces micro-circuits sont composés de l'ensemble des types cellulaires décrits précédemment, répartis dans les différentes couches, et qui se connectent les uns aux autres selon des règles précises (Figure I.4 A et Meyer et al., 2010).

La stéréotypie des colonnes corticales a été principalement décrite dans les cortex sensoriels primaires, même si à de petites nuances près (épaisseur des couches, nombre de neurones par couche) on retrouve cette organisation dans les autres structures. Ces colonnes sont définies par une connectivité du réseau excitateur sur lequel se surimpose un réseau inhibiteur interconnecté.

Connectivité des neurones excitateurs

Organisation de la connectivité excitatrice translaminaire

Les entrées sensorielles thalamiques ont lieu principalement en couche IV (Banister et al., 2002). Le thalamus projette sur les neurones étoilés épineux (SSN pour *spiny stellate neurons*) qui forment un réseau très interconnecté avec environ 90% des synapses faites au sein de leur propre couche (Kisvarday et al., 1989, Lübke et al., 2000). Les synapses thalamocorticales sur les SSNs ne représentent que 6% des synapses reçues par ces neurones (Castro-Alamancos, 2004). Dans la couche IV,

les neurones réguliers (RS) sont très interconnectés formant une boucle positive d'amplification des informations thalamiques, tandis que les neurones *burstants* projettent vers les pyramides de la couche II/III, principale voie de sortie de la couche IV. Les pyramides étoilées et les pyramides projettent vers les couches infragranulaires (Figure I.4 **B** et Kisvarday et al., 1989, Staiger et al., 2004, Bannister, 2005).

Dans les cortex sensoriels, les colonnes corticales sont organisées avec une grande précision topographique, un stimulus précis activant une ou un ensemble de colonnes corticales, que l'on nomme alors champ récepteur. Dans la couche IV, les SSNs possèdent un champ récepteur similaire à celui des cellules relais thalamiques suggérant une organisation précise des projections thalamocorticales. A l'inverse, les pyramides II/III ont des champs récepteurs complexes dus à la convergence des informations des neurones de la couche IV vers ceux de la couche II/III (Hirsch et al., 1998).

Les pyramides de la couche II/III sont une voie d'entrée majeure des informations contralatérales et provenant d'aires associatives (Douglas and Martin, 2004). Les pyramides II sont largement connectées avec les pyramides II/III et souvent sortent de la colonne corticale via la matière blanche, se ramifiant très peu lors de la traversée des couches IV-VI. Les pyramides III, elles, se ramifient et contactent les pyramides des couches IV-V (Figure I.4 **B** et Thomson and Deuchars, 1997, Bannister, 2005).

Les arbres dendritiques des pyramides des couches III et V se chevauchent souvent et ces cellules reçoivent des informations corticocorticales des mêmes noyaux associatifs au niveau de la couche I (Brederode and Snyder, 1992, Clancy and Cauller, 1999). on a donc deux niveaux d'intégration : les entrées proximales des pyramides III et les entrées distales au niveau du *tufted* apical dans les couches superficielles et principalement la couche I. Au sein de la couche V, les pyramides s'interconnectent avec une probabilité élevée. Les pyramides V sont une des voies majeures de sortie du néocortex (Figure I.4**B** et Bannister, 2005).

Les pyramides VI reçoivent des informations thalamocorticales et se divisent en deux catégories : les neurones corticocorticaux et les pyramides de retour corticothalamique. La couche VIa est le principal fournisseur de corticothalamiques (Beierlein and Connors, 2002). Les cellules corticocorticales présentent une plus large diversité morphologique, elles projettent dans les différentes couches et font 2 à 4 fois plus de contacts entre pyramides de la couche VIa que les corticothalamiques (Lübke et al., 2000, Mercer et al., 2005).

Le déterminisme des connexions pyramide-pyramide

Un débat a longtemps agité le domaine de la connectivité pyramide-pyramide : est-ce que les synapses récurrentes entre pyramides sont organisées de façon aléa-

toire ou de façon déterministe ?

Les travaux de Kalisman et ses collaborateurs ont cherché à répondre à cette question en enregistrant des paires de pyramides puis en effectuant la reconstruction de ces neurones en microscopie confocale. Leurs résultats montrent que les axones des pyramides de la couche V touchent les dendrites de leur entourage de façon aléatoire et sans biais, mais que le couplage fonctionnel, lui, est fortement corrélé à l'existence de boutons synaptiques entre les pyramides (Kalisman et al., 2005). Ces résultats suggèrent que les pyramides de la V possèdent à chaque instant toutes les potentialités pour former des synapses avec leurs voisins mais que seul un petit nombre de voisins vont être effectivement ciblées, rendant le système extrêmement plastique. Par conséquent, il existe bien un déterminisme dans la mise en place des contacts synaptiques entre les neurones. De la même façon, les projections trans-laminaires sont organisées de façon déterministe, un type cellulaire ciblant préférentiellement tel ou tel autre type dans d'autres couches (Thomson and Morris, 2002). Enfin, on retrouve ce déterminisme au niveau des connexions établies par les fibres thalamocorticales avec les neurones corticaux. Nous détaillerons ce point dans le chapitre suivant.

Modulation par les réseaux inhibiteurs

Au réseau excitateur se surimpose un réseau inhibiteur qui module et équilibre l'excitation du néocortex. En effet, la garantie de cet équilibre est nécessaire à la mise en place et au maintien de la stabilité dans les circuits fonctionnels (Compte et al., 2003, Hensch, 2004, Hensch and Stryker, 2004, Hensch and Fagiolini, 2005, Le Roux et al., 2006, Moreau et al., 2010). Le dérèglement de cette balance est impliqué dans de nombreuses pathologies comme la maladie d'Alzheimer, la schizophrénie, l'épilepsie, etc (Wassef et al., 2003, Cossart et al., 2005, Bessaïh et al., 2006).

Les neurones inhibiteurs d'une couche contrôlent généralement les entrées excitatrices en provenance des autres couches. Ainsi les interneurons de la couche III projettent massivement sur les SSNs de la couche IV, limitant dans le temps l'activation de la couche IV. De la même façon, les pyramides de la couche V éteignent la couche II/III et les neurones corticothalamiques de la VI éteignent la colonne corticale via des projections massives sur l'ensemble de ses interneurons (Figure I.4 **B** et Silberberg et al., 2005, West et al., 2006).

En fonction de leur type cellulaire, les interneurons ciblent les régions proximales ou distales des neurones excitateurs. Les neurones FS de type *basket* ou chandelier projettent sur le compartiment somatique, sur le segment initial ou sur les dendrites proximales. Ils ont donc une action "tout ou rien" sur le potentiel d'action et autorisent ou non son émission. Ils sont particulièrement impliqués dans la modulation des entrées excitatrices thalamocorticales (Gil and Amitai, 1996 et

voir chapitre suivant). A l'inverse, les cellules de Martinotti exprimant la SOM projettent sur les arbres dendritiques des pyramides au niveau de la couche I et sont plutôt impliquées dans la modulation corticocorticale (Silberberg and Markram, 2007). A l'instar des interneurons de la couche I, elles vont donc moduler les entrées distales et avoir une fonction de régulateur de gain des entrées associatives. Enfin les interneurons à VIP ou fusiformes verticaux projettent sur les dendrites proximales et médiales et ciblent plus spécifiquement les dendrites basales des pyramides et non la dendrite apicale. Les neurones à VIP sont situés sur les bordures de la colonne corticale et forment une limite entre les colonnes (Silberberg et al., 2002).

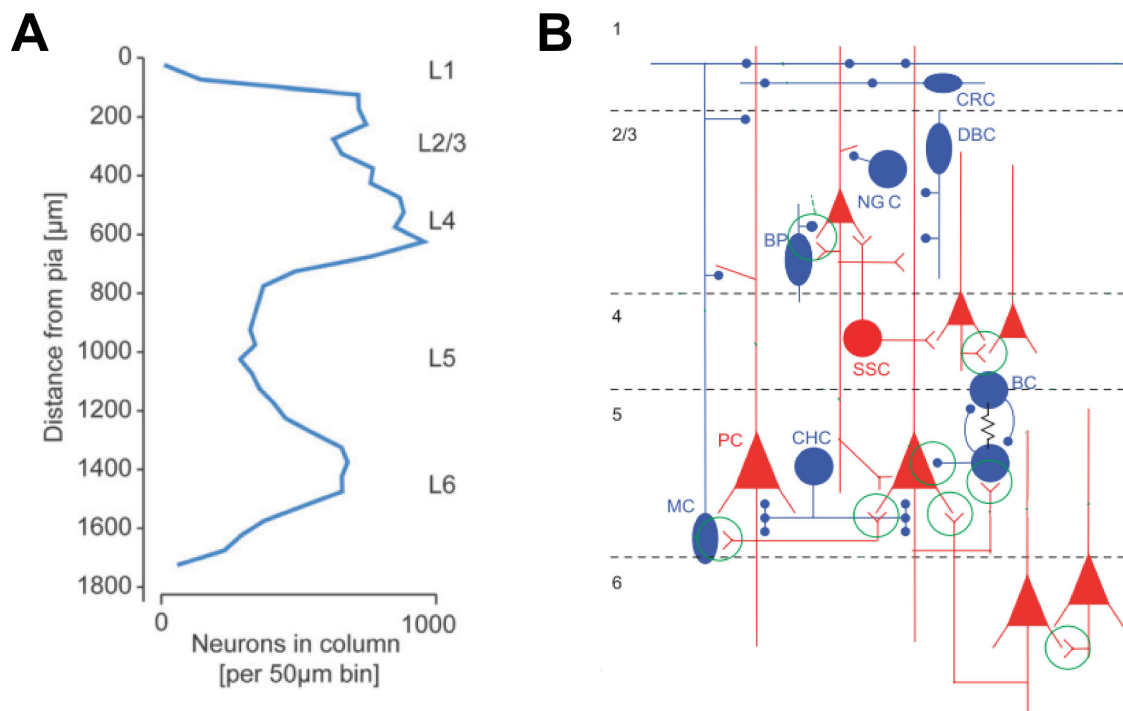


FIGURE I.4 – Organisation de la colonne corticale. **A.** Répartition de la densité de neurones dans une colonne corticale. *Adapté de Meyer et al., 2010.* **B.** Organisation des projections dans une colonne corticale. En rouge les neurones excitateurs, en bleu les interneurons. *Adapté de Silberberg et al., 2005*

Afférences corticales

Afférences ipsilatérales

Chaque cortex reçoit des afférences d'un grand nombre d'aires corticales. Par exemple, le cortex en tonneaux reçoit des afférences du cortex moteur, d'autres cortex somesthésiques, mais aussi du cortex frontal ou du cortex pariétal. En général, ces afférences arrivent en couche I et II/III et les informations sont intégrées au niveau des terminaisons des arbres dendritiques en particulier par les pyramides de la couche II/III, les IB de la couche V et les pyramides de la couche VIa (Zhang and Deschênes, 1998).

Afférences contralatérales

Les neurones callosaux sont principalement situés dans les couches II/III et dans une moindre mesure dans les couches IV et VI. En général ces neurones sont des grosses pyramides, mais on trouve parfois des neurones étoilés de grande taille ou des pyramides inversées (Hornung and Garey, 1981, Karayannis et al., 2007). La morphologie des neurones callosaux peut présenter des différences par rapport aux autres neurones de la même couche. Par exemple, les pyramides callosales de la couche V du cortex visuel ont moins de dendrites basales et une dendrite apicale plus courte que les pyramides qui projettent vers le colliculus supérieur (Hübener and Bolz, 1988). La principale cible des neurones callosaux est la couche III ($\sim 75\%$ des afférences) et secondairement les couches V et VI (Code and Winer, 1985). Dans la couche V, les pyramides et les interneurons reçoivent des afférences callosales (Karayannis et al., 2007).

La densité d'afférences callosales dépend de l'aire corticale et de différentes modalités. Ainsi dans le cortex auditif par exemple, il y a plus de projections contralatérales pour les fréquences élevées que pour les fréquences basses (Code and Winer, 1985).

Afférences sous-corticales

Au cours de ma thèse, j'ai cherché à comprendre comment trois réseaux d'afférences sous-corticales agissaient sur le réseau cortical : les noyaux du thalamus non-spécifique, les neurones à orexine de l'hypothalamus latéral et les noyaux cholinergiques des noyaux basaux. Ces trois ensembles ainsi que leurs afférences corticales seront décrits dans trois chapitres spécifiques de ce manuscrit et je n'évoquerai ici que succinctement les autres afférences sous-corticales.

Le néocortex reçoit des afférences de nombreuses autres structures sous-corticales impliquées dans diverses fonctions. Ces projections présentent une densité de répartition qui dépend des aires et des couches corticales. Ainsi, les noyaux relais du thalamus convoient des informations essentiellement sensorielles vers les aires corticales qui leurs sont associées. L'aire tegmentale ventrale et le locus coeruleus libèrent respectivement de la dopamine et de la noradrénaline dans l'ensemble des aires corticales. Néanmoins, si les afférences noradrénergiques semblent réparties de façon homogène dans l'ensemble des aires corticales, la densité des fibres dopaminergiques semble suivre un gradient rostro-caudal avec une densité maximale de fibres dans le cortex préfrontal et un minimum dans le cortex occipital. Le noyau de Raphé envoie des projections sérotoninergiques et l'hypothalamus des projections histaminergiques dans l'ensemble du néocortex. Ces neuromodulateurs ont la particularité de cibler de façon différentielle les sous-types neuronaux corticaux et par conséquent ils influent chacun différemment sur la dynamique corticale, en modifiant localement et temporairement la balance excitation-inhibition (Lucas-Meunier et al., 2009, Le Roux et al., 2009, Moreau et al., 2010, Amar et al., 2010).

De façon plus spécifique, des aires corticales reçoivent des projections glutamatergiques spécifiques à leurs fonctions comme le cortex préfrontal qui reçoit des afférences hippocampiques ou le cortex moteur des afférences striatales.

2 | Encodage temporel des afférences corticales

Schématiquement, on envisage l'encodage des informations par une succession temporelle de potentiels d'action. Néanmoins, à chaque relais, un traitement s'opère et la séquence initiale est modifiée. Ces modifications sont à la fois la conséquence des propriétés des neurones pré- et post-synaptiques, mais également des propriétés du réseau recevant l'information. Au cours de mon travail de thèse, je me suis plus particulièrement intéressée à ce deuxième facteur que nous décrivons donc ici tandis que les propriétés de la transmission synaptique ne seront pas évoquées.

L'encodage par le cortex d'un signal excitateur dépend de sa provenance et sa diversité est encore mal connue. On peut néanmoins imaginer trois types de réponses à l'arrivée d'une entrée excitatrice. Tout d'abord, le signal peut être relayé sans traitement, et un signal d'une durée x , par exemple de la durée d'un potentiel d'action, associerait une réponse d'une durée similaire. Mais l'information du signal pris en compte par le réseau récepteur peut également être l'instant d'arrivée plutôt que sa durée, l'encodage se basant alors sur la dérivé du signal donc sur l'initiation du potentiel d'action. Enfin l'information du signal afférent peut être une indication de changement d'état impliquant un changement d'état du réseau récepteur. Dans ces conditions, le processus d'encodage se base sur l'intégrale du signal. Ces deux derniers processus font l'objet d'une vaste littérature dans le domaine des neurosciences computationnelles, mais la comparaison des différents phénomènes et leurs bases cellulaires ne sont pas encore clairement définies, en particulier dans le cas des activités persistantes. Dans cette partie, nous nous intéresserons à ces deux processus à travers deux exemples. L'encodage dérivatif du signal sera décrypté à travers l'exemple des projections du thalamus spécifique vers les cortex sensoriels, et l'encodage intégratif sera décrit à travers les exemples des activités persistantes glutamatergiques et cholinergiques.

Codage du stimulus sensoriel : l'inhibition antéro-grade

Organisation topographique des voies d'intégration sensorielle

À l'instar du cortex, les noyaux relais du thalamus présentent une organisation topographique dépendant de la modalité sensorielle traitée et projettent majoritairement vers l'aire corticale sensorielle associée. Ainsi le corps genouillé latéral (IGN) cible le cortex visuel et le noyau ventrobasal (VB) projette vers le cortex somatosensoriel. De façon plus précise, au sein du VB, le noyau ventro-postérieur médian (VPM) reçoit les informations somesthésiques de la face et dans le cas du rongeur principalement des informations des vibrisses. Une carte des vibrisses est établie dans le VPM, où, à chaque vibrisse correspond un ensemble de neurones regroupés dans un barréloïde. Une carte similaire mais plus raffinée existe dans le cortex dans une région nommée cortex en tonneaux ou *barrel cortex*. La couche IV est le principal réceptacle des entrées sensorielles thalamiques (Figure I.5 et Meyer et al., 2010). C'est dans cette couche qu'on trouve la plus grande densité de fibres thalamocorticales mais également de boutons synaptiques (Meyer et al., 2010, Wimmer et al., 2010). Les fibres du VPM projettent de façon plus éparsée dans la couche VIa qui contient les principales afférences corticothalamiques (Mercer et al., 2005). Dans les deux couches, les axones du VPM semblent cibler préférentiellement les régions dendritiques proximales (Petreanu et al., 2009). Les fibres du VPM sont largement ségréguées dans les tonneaux (Figure I.5 et Meyer et al., 2010). À l'inverse, le noyau postérieur médian (POm), catégorisé parmi les noyaux de second ordre, donc convoyant une information plus contextuelle et moins sensorielle, projette majoritairement en couche I et Va dans les régions séparant les tonneaux et nommées régions septales (Figure I.5).

Les neurones thalamiques des barréloïdes ainsi que les neurones excitateurs de la couche IV du cortex en tonneaux présentent une forte sensibilité à l'angle de déflexion et à l'orientation de la vibrisse. À l'inverse, les neurones inhibiteurs de type FS sont des nœuds de convergence des entrées thalamiques et présentent peu ou pas de sélectivité d'angle ou d'orientation de la vibrisse (Swadlow, 2003). On estime qu'un tonneau contient environ 19000 neurones qui sont largement interconnectés (Meyer et al., 2010). En particulier, les interneurons de type FS forment des micro-circuits intracorticaux qui se synchronisent lors de l'activation des afférences thalamocorticales contrôlant ainsi l'excitabilité du tonneau.

Deux vues s'opposent sur l'organisation des projections thalamocorticales. Pour Braitenberg et Schüz, les contacts synaptiques au niveau des terminaisons des fibres thalamocorticales s'effectuent au hasard (Braitenberg and Schüz, 1991). À l'inverse, de nombreux auteurs suggèrent que les connexions s'effectuent de façon

très organisée et avec un haut niveau de sélectivité (White and Rock, 1981, White et al., 2004). Les données électrophysiologiques et de développement prouvent aujourd'hui clairement la précise organisation des projections thalamiques et l'organisation des projections thalamocorticales participent à la stéréotypie des microcircuits corticaux (Silberberg et al., 2002). On a donc un déterminisme des projections thalamocorticales comme on a un déterminisme à l'intérieur des microcircuits des colonnes corticales.

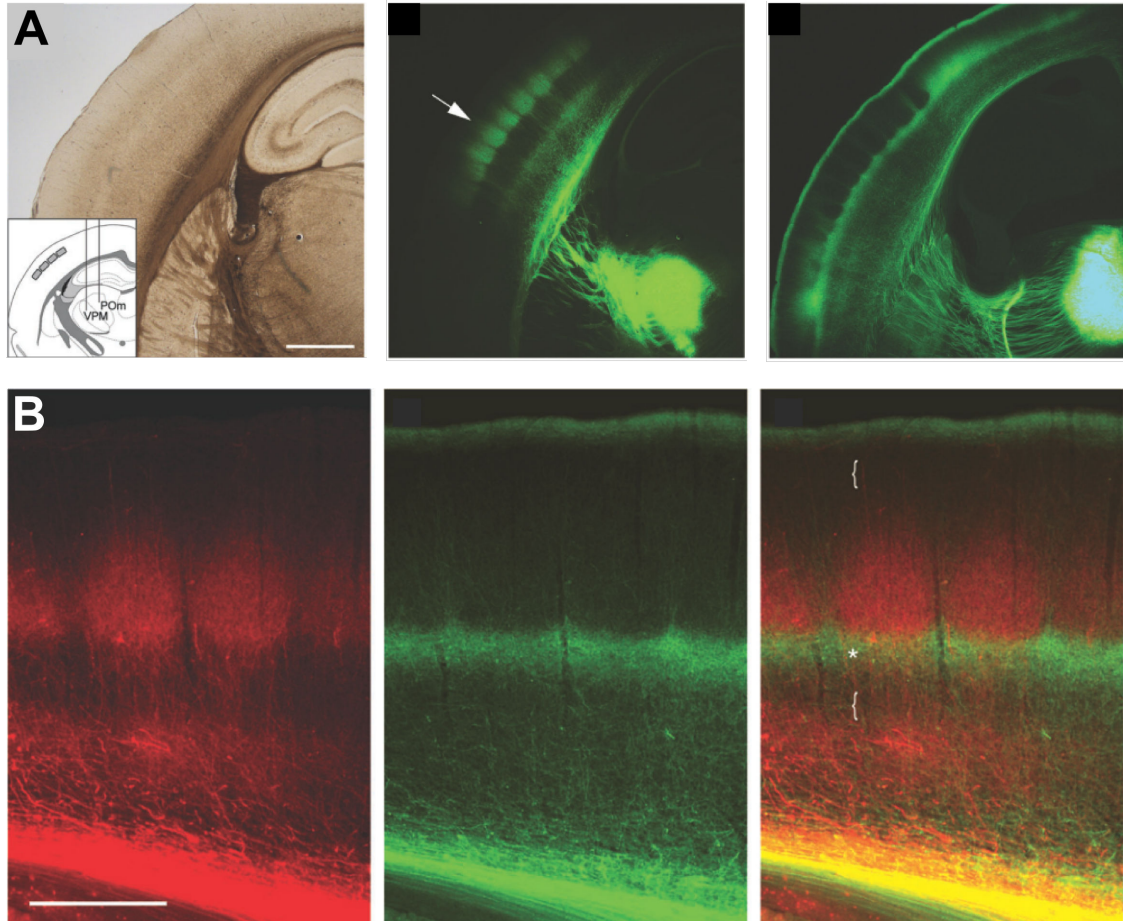


FIGURE I.5 – **A.** Projections thalamocorticales dans le cortex en tonneaux (S1) du VPM (*milieu*) et POm (*droite*). **B.** Double marquage des fibres provenant des VPM (rouge) et POm (vert) dans le cortex en tonneaux. Le marquage VPM délimite les tonneaux tandis que le septum est envahi par les fibres du POm. *Adapté de Wimmer et al., 2010*

À cette organisation topographique est associée une très grande précision temporelle de l'arrivée des potentiels d'action dans le cortex en tonneau qui reflète

précisément la séquence temporelle des stimuli au niveau de la vibrisse (Swadlow, 2003).

Caractérisation électrophysiologique des entrées thalamocorticales

La mise au point de tranches préservant partiellement les fibres thalamocorticales a permis l'étude de cette voie dès les débuts de l'électrophysiologie en tranche (Agmon and Connors, 1991). Grâce à cette technique, les neurones des noyaux relais du thalamus peuvent être spécifiquement stimulés et la réponse électrophysiologique dans le cortex peut être enregistrée. Ces tranches permettent en particulier de stimuler les neurones thalamiques d'un barréloïde et d'enregistrer les réponses dans le tonneau correspondant du cortex somatosensoriel. L'enregistrement des neurones des couches IV à VIa montre qu'ils sont les cibles privilégiées des neurones thalamocorticaux (Gil and Amitai, 1996, Constantinople and Bruno, 2013). Ce système a donc été particulièrement bien décrit et reste encore très étudié.

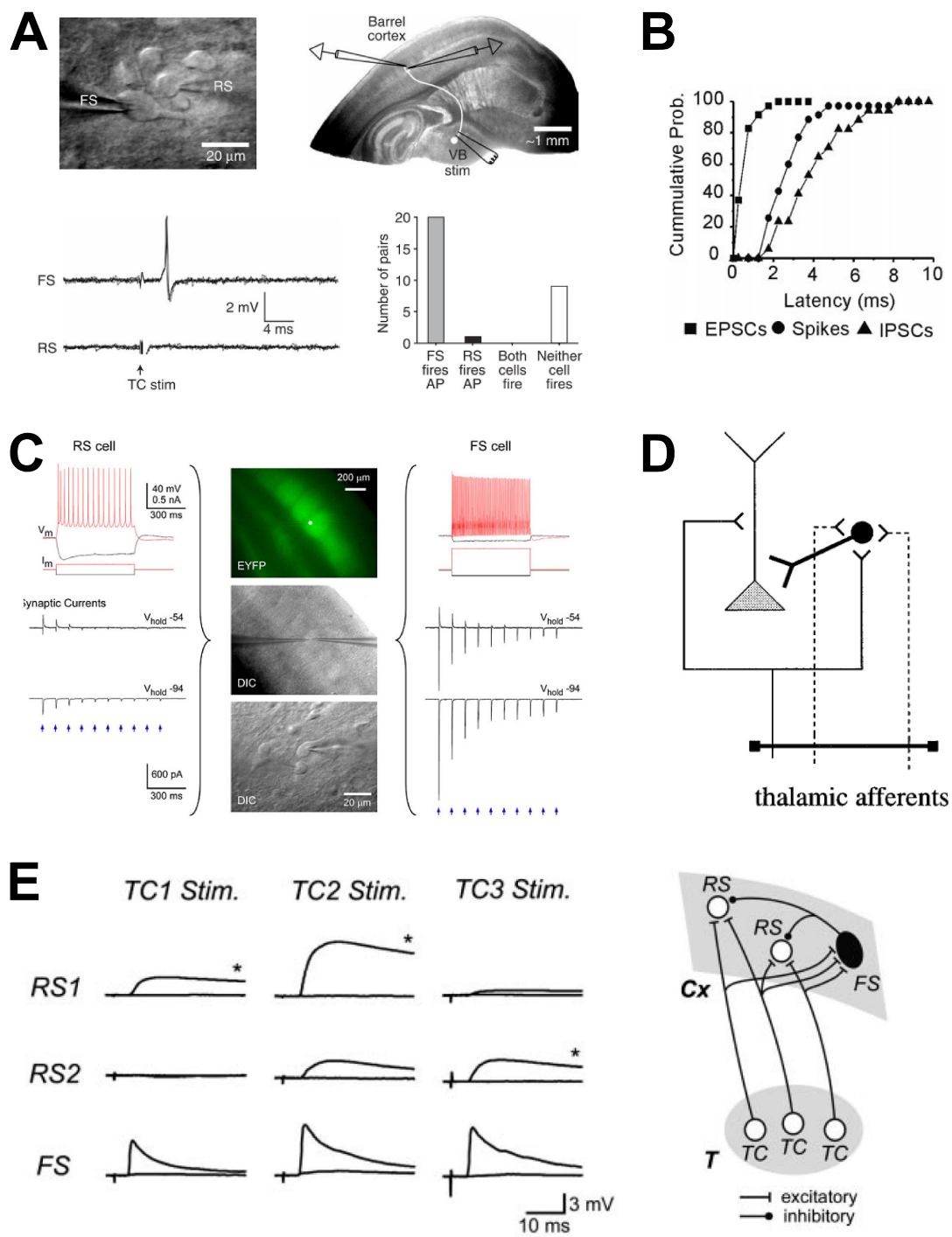
L'inhibition antérograde

Description de l'inhibition antérograde

D'un point de vue électrophysiologique, les entrées des noyaux relais thalamiques produisent, sur les neurones excitateurs épineux étoilés et pyramidaux des couches IV et VI, une brève dépolarisation suivie par une hyperpolarisation marquée (Figure I.6). Les neurones thalamocorticaux sont exclusivement glutamatergiques, par conséquent leur stimulation induit une dépolarisation rapide des neurones cibles. Ce potentiel post-synaptique excitateur (EPSP) intervient avec un délai inférieur à 1.8 ms et il est généralement coupé par un potentiel inhibiteur qui survient environ 1 ms après le début de l'EPSP (Gil and Amitai, 1996, Porter et al., 2001, Bruno and Simons, 2002, Swadlow, 2003, Cruikshank et al., 2007, Kimura et al., 2010). L'absence de fibres thalamocorticales GABAergiques indique que la source de GABA est intracorticale et est activée par les entrées thalamiques. Ce phénomène disynaptique est nommé inhibition antérograde (ou inhibition *feedforward*).

Conséquence physiologique de l'inhibition antérograde

Le néocortex est le siège de l'ajustement adaptatif en temps réel des réponses à l'environnement. Cette fonction du néocortex nécessite un processus qui réduit de façon drastique la durée des activations sensorielles. C'est ce que fait l'inhibition antérograde en coupant toute activité excitatrice récurrente. Elle permet l'émission



de potentiels d'action dans une fenêtre temporelle courte et rapprochée du stimulus initial. Les enregistrements *in vivo* de neurones corticaux dans le cortex en ton-

FIGURE I.6 (*page précédente*) – Bases cellulaires de l’inhibition antérograde. **A.** Enregistrements corticaux des réponses à la stimulation des fibres thalamocorticales. La stimulation déclenche des potentiels d’action dans 60% des FS et 5% des RS. *D’après Cruikshank et al., 2007.* **B.** Le déclenchement des potentiels d’action dans les interneurons entraîne une inhibition antérograde rapide des neurones pyramidaux. *D’après Porter et al., 2001.* **C.** Les courants excitateurs induits par photostimulation des fibres thalamocorticales sont 6 fois plus amples dans les FS que dans les RS. FS et RS reçoivent de l’inhibition antérograde. *Cruikshank et al., 2010.* **D.** Modèle disynaptique de l’inhibition antérograde. *D’après Gil and Amitai, 1996.* **E.** Convergence des entrées thalamocorticales sur les FS, qui divergent ensuite sur les RS. *D’après Inoue and Imoto, 2006.*

neaux montrent que les FS déchargent systématiquement lors de la déflexion de la vibrisse, ce qui souligne la robustesse des entrées thalamiques sur ces neurones. À l’inverse, la déflexion de la vibrisse entraîne l’émission d’un potentiel d’action de façon beaucoup moins robuste dans les neurones excitateurs (Bruno and Simons, 2002). Cette excitation synchrone génère un tonus GABAergique dans le tonneau qui limite la fenêtre d’excitabilité à la suite de l’activation thalamocorticale et augmente la précision de décharge (Swadlow, 2003).

Bases cellulaires de l’inhibition antérograde

L’inhibition antérograde rapide est principalement due à l’activation des interneurons FS. Deux facteurs expliquent comment un signal inhibiteur si robuste est généré. Premièrement, les afférences thalamocorticales convergent plus vers les FS que vers les neurones excitateurs. On estime en effet qu’un interneurone FS reçoit environ 150 afférences thalamiques contre environ 90 afférences pour les neurones excitateurs (Bruno and Simons, 2002). Une autre étude suggère que les neurones inhibiteurs reçoivent 5 fois plus d’entrées thalamiques que les neurones excitateurs (Porter et al., 2001). Une conséquence de cette convergence est l’absence d’une réponse spécifique à l’angle et à l’orientation lors de la déflexion de la vibrisse. L’entrée sur les interneurons FS est donc plus robuste et fiable que sur les excitateurs. Ceci se traduit par une amplitude des EPSPs thalamocorticaux plus importante dans les FS que dans les RS. Pourtant, les interneurons FS présentent une résistance d’entrée environ 4 fois plus faible que celle des RS (100 M Ω contre 400 M Ω), donc l’entrée synaptique doit être 4 fois plus importante pour atteindre la même amplitude (Cruikshank et al., 2007, Karagiannis et al., 2009). Deuxièmement les FS forment des micro-circuits locaux inhibiteurs qui sont interconnectés électriquement et qui convergent vers les mêmes cibles corticales (Gibson et al., 1999, Galarreta and Hestrin, 1999). Ils envoient donc un signal coïncident

et coordonné vers leur cibles.

La rapidité de l'arrivée de l'inhibition est, elle, due aux propriétés membranaires et synaptiques des interneurons FS (Hu et al., 2010). En effet, on observe d'une part que la forme et l'amplitude des EPSPs dépend des cellules cibles. Ainsi, les cinétiques des EPSPs sont beaucoup plus rapides chez les interneurons FS que chez les excitateurs (Gil and Amitai, 1996). Ces cinétiques ne sont pas dues à un facteur pré-synaptique puisqu'on retrouve des cinétiques d'EPSPs similaires lors de la stimulation des fibres corticocorticales (Gil and Amitai, 1996), mais plutôt à l'expression de la sous-unité AMPA GluR2 par les neurones excitateurs et pas par les interneurons FS (Angulo et al., 1997). D'autre part, les FS ont une faible capacitance de membrane ce qui permet une décharge des neurones très rapide après une stimulation (Karagiannis et al., 2009). Enfin, les interneurons FS projettent principalement sur les segments dendritiques proximaux ainsi que sur les somas des neurones, ce qui raccourcit encore le délai de la réponse.

Comportement à court terme de l'inhibition antérograde

La fenêtre temporelle de l'émission des potentiels d'action dans le cortex en tonneau reflète précisément la séquence temporelle des stimuli au niveau de la vibrisse (Phillips et al., 1988). Or la stimulation d'une fibre thalamocorticale induit un EPSP de trop faible amplitude pour générer à elle seule le déclenchement d'un potentiel d'action (Gil and Amitai, 1996, Brecht and Sakmann, 2002). Il nécessite donc la sommation de plusieurs EPSPs, phénomène qui dépend entre autres de la taille de la fenêtre d'intégration. Cette fenêtre correspond au délai entre l'arrivée du premier EPSP et le début de l'inhibition antérograde. Les travaux de Gabernet et collaborateurs montrent que la fenêtre d'intégration varie d'un facteur 10 lors d'une déflexion répétée de la vibrisse (Gabernet et al., 2005). Ceci se traduit par une diminution de la probabilité de décharge (Figure I.7 **B**), ainsi que par une augmentation du délai moyen et de la variabilité d'émission du potentiel d'action dans les neurones corticaux excitateurs (Figure I.7 **C**). Ce phénomène est largement d'origine corticale puisque la précision temporelle de l'émission des potentiels d'action ne varie pas au niveau thalamique (Figure I.7 **C**). L'augmentation de la taille de la fenêtre s'expliquerait par une diminution de l'inhibition antérograde qui est due à plusieurs paramètres. D'une part, le nombre de fibres thalamocorticales recrutées au cours d'une stimulation répétée diminue, ce qui a pour conséquence de faire fortement chuter le nombre d'interneurons FS recrutés. D'autre part, la synapse FS sur RS est très dépressive, ce qui diminue encore l'inhibition résultante sur les RS. On a donc au cours du temps, une diminution du contraste de l'entrée tactile et une diminution de sa résolution temporelle.

En définitive, la synapse thalamocorticale est dépressive dans l'ensemble des types cellulaires corticaux cibles. Le fait que la fenêtre d'intégration perde en pré-

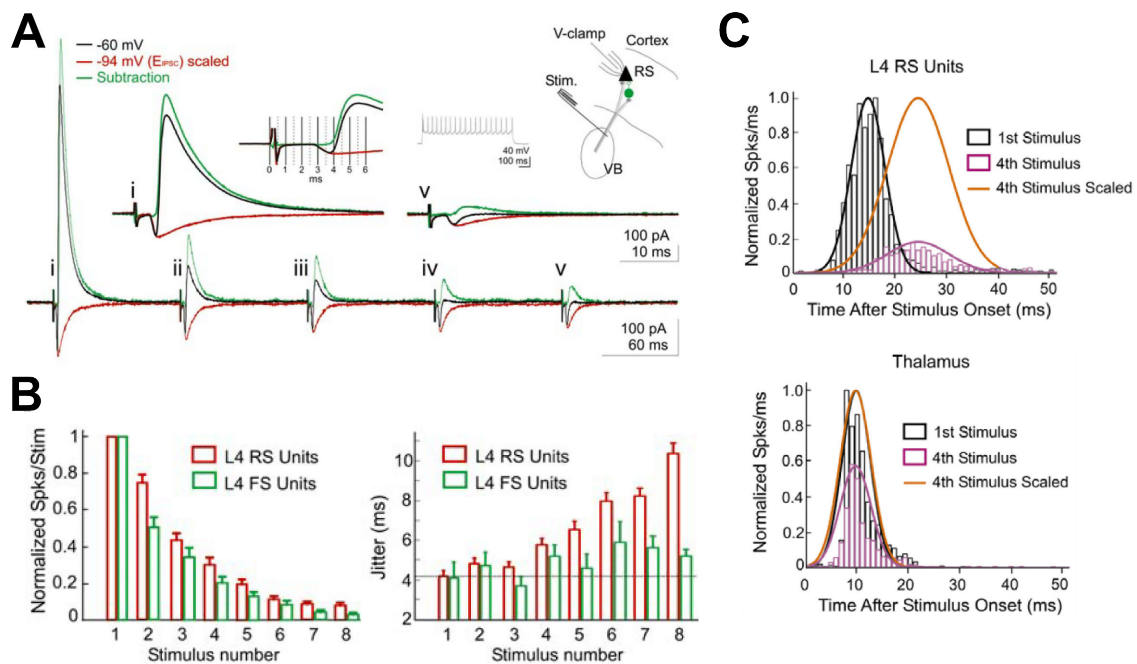


FIGURE I.7 – Propriétés à court terme de l’inhibition antérograde. **A.** Exemple d’enregistrement d’un neurone RS. L’amplitude de l’inhibition diminue de 90% au cours de la stimulation TC à 10 Hz alors que l’excitation ne diminue que de 50%. *Inset* : On observe un délai de 1 ms entre l’excitation et l’inhibition. **B.** L’inhibition antérograde augmente dans les RS et les FS, mais n’entraîne une augmentation significative du jitter que dans les RS. **C.** Lors de déflexions de la vibrisse à 10 Hz, le *jitter* de l’émission du potentiel d’action dans les neurones RS augmente au fil des stimulations, alors que le *jitter* n’augmente pas dans les neurones du VPM. *Adapté de Gabernet et al., 2005*

cision lors d’une stimulation répétée autorise la sommation des EPSPs et donc augmente la probabilité d’avoir un potentiel d’action après une stimulation sensorielle. Cette probabilité serait probablement nulle si la fenêtre d’intégration restait aussi étroite. De plus, d’un point de vue physiologique, on peut se demander quel peut être le sens d’une stimulation répétée de la vibrisse à 10 Hz. En effet, il semble imaginable qu’une unique stimulation puisse avoir une signification temporelle, tandis qu’une stimulation répétée perdrait la valeur intrinsèquement temporelle pour coder une information plus contextuelle et donc moins dépendante d’un timing précis.

Codage intégratif : les activités persistantes

Avant la découverte des activités persistantes, Donald Hebb postulait l'existence d'un mécanisme neuronal central qui expliquerait le délai entre la stimulation et la réponse, qui semble si caractéristique de la pensée (Hebb, 1949). Vingt ans après ce postulat, des neurones déchargeant de façon persistante ont été mis en évidence dans le cortex préfrontal, et cette décharge persistante a été corrélée à la réalisation de tâches comportementales impliquant la mémoire de travail (Fuster and Alexander, 1971, Niki, 1974a,b, Funahashi et al., 1989, Goldman-Rakic, 1995). Les activités persistantes sont aujourd'hui considérées comme le marqueur neuronal de la mémoire de travail et de l'attention. Néanmoins, des activités persistantes sont aussi associées aux états *up* et *down* qu'on peut enregistrer dans les cortex d'animaux anesthésiés ou sur des préparations de tranches oscillantes. Pourtant les mécanismes cellulaires et de réseau qui sous-tendent ces activités dans ces deux contextes sont encore sujets à débat.

Description des activités persistantes de la mémoire de travail et des états *up*

Les activités persistantes ont été enregistrées dans différents contextes : animaux effectuant une tâche comportementale, animaux anesthésiés ou tranches de cerveau de rongeur ou de furet.

Une démonstration convaincante de la survenue d'activités persistantes lors d'une tâche de mémoire de travail a été présentée par Funahashi et collaborateurs en 1989. Dans cette tâche, les expérimentateurs utilisent le paradigme de la réponse retardée : ils présentent à un singe un stimulus visuel pendant une brève période (~ 0.5 s) et l'animal doit fixer le lieu d'apparition du stimulus pendant plusieurs secondes pour obtenir une récompense. L'enregistrement de neurones du cortex préfrontal au cours de la tâche montre que certains neurones déchargent de façon persistante pendant le délai entre le stimulus et la réponse comportementale. De plus, le stimulus visuel présentant une orientation, ces enregistrements ont révélé que les neurones du cortex préfrontal répondent de façon préférentielle à une orientation (voir Fig. I.8A et Funahashi et al., 1989). Ceci suggère que tous les stimulus n'induisent pas une activité persistante et par conséquent qu'il existe un processus de sélectivité de la réponse des neurones préfrontaux en fonction du stimulus.

Les états *up* sont également des situations au cours desquelles se produisent des activités persistantes. *In vivo*, les états *up* ont été décrits chez l'animal anesthésié dans des conditions qui miment un sommeil profond à ondes lentes. Les oscillations lentes ont été observées dans les pyramides des couches II à VI et dans différentes

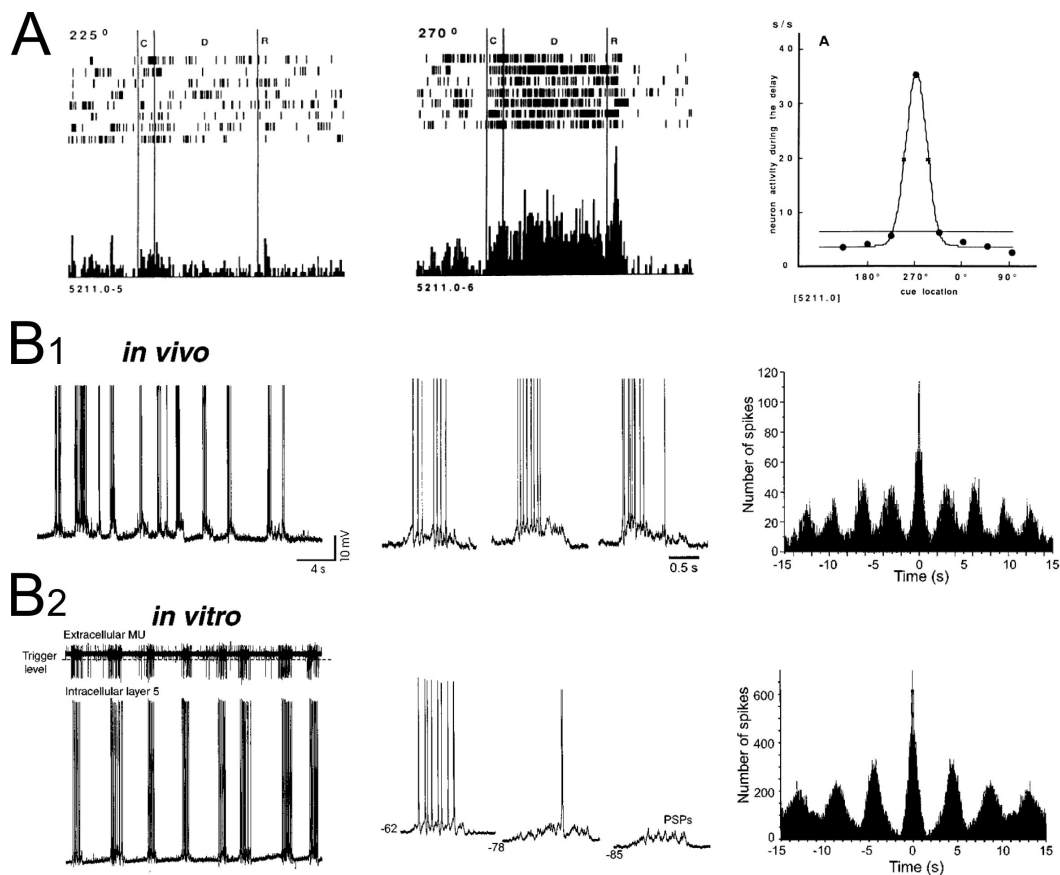


FIGURE I.8 – Description des activités persistantes. **A.** Activité persistante d’une pyramide du cortex préfrontal durant une tâche de mémoire de travail nécessitant une réponse retardée à un stimulus visuel. *Adapté de Funahashi et al., 1989* **B.** Enregistrement chez l’animal anesthésié **B₁** ou en tranche **B₂** d’épisodes d’états *up* dans le cortex visuel. Ces épisodes d’états *up* correspondent à des activités persistantes d’environ une seconde. *Adapté de Sanchez-Vives and McCormick, 2000*

aires corticales (cortex préfrontal, sensori-moteur, pariétal, etc). Mais les états *up* ont également été enregistrés en tranche de cerveau en présence d’une solution extra-cellulaire dite "tranche active" publiée par Sanchez-Vives et collaborateurs en 2000. Cette solution se base sur une concentration en potassium (3.5 mM) plus élevée que la concentration généralement utilisée (2.5 mM) et qui mime de façon plus physiologique celle mesurée dans le fluide cérébro-spinal (Sanchez-Vives and McCormick, 2000). Cette solution augmente l’excitabilité des neurones et permet la génération d’oscillations spontanées dans le cortex. Les états *up* présentés dans ce travail en tranche et *in vivo* sont assez similaires : ce sont des épisodes de décharge spontanée accompagnés d’une dépolarisation du neurone, qui durent en

moyenne 0.5 secondes et se répètent avec une périodicité d'environ 3 secondes (voir Fig.I.8B₁ et B₁, Steriade et al., 1993, Sanchez-Vives and McCormick, 2000).

Dans ces deux contextes, une entrée, généralement glutamatergique, est à l'origine du déclenchement des activités persistantes. La durée de l'activation du neurone est ensuite modulée par des phénomènes de réverbération du micro-circuit cortical ou par la présence de neuromodulateurs libérés par des afférences sous-corticales.

Bases cellulaires des activités persistantes

L'induction et le maintien des états *up* et *down* sont le résultat d'un équilibre dynamique entre l'excitation et l'inhibition à l'intérieur d'un réseau de neurones inter-connectés (Compte et al., 2003, Haider et al., 2006). C'est pourquoi les récepteurs glutamatergiques (en particulier les récepteurs NMDA), les récepteurs GABAergiques (GABA_A et GABA_B), et aussi les différentes populations de neurones (pyramidaux et interneurons GABAergiques) ont été associés aux différents paramètres qui décrivent ces états. Les états *up* sont associés à une diminution de la résistance membranaire due aux nombreuses entrées synaptiques (Rigas and Castro-Alamancos, 2009), ce sont donc des périodes où l'ensemble des neurones du réseau cortical est dans un état activé.

L'enregistrement de pyramides corticales et de neurones thalamiques a permis de montrer l'implication de la boucle thalamocorticale dans le maintien des états *up*. En effet, la stimulation des fibres thalamocorticales a tendance à favoriser les états *up*, tandis que la stimulation des fibres corticocorticales les inhibe (Rigas and Castro-Alamancos, 2007). La boucle thalamocorticale implique le réseau cortical et la bouche thalamique interne. Le réseau cortical, comme nous l'avons précédemment signalé, est composé d'environ 80% de neurones excitateurs et 20% de neurones inhibiteurs. Ces neurones sont connectés les uns aux autres dans des proportions variables et selon des schémas précis dont l'influence sur la dynamique du réseau semble primordiale mais dont l'appréhension reste compliquée en dehors des études de modélisation (Ostojic, 2014, Goel and Buonomano, 2014). La boucle thalamique, elle, est composée des neurones glutamatergiques des noyaux sensoriels (comme par exemple ceux du noyau VB) et des neurones GABAergiques du noyau réticulé thalamique (NRT). Ces deux noyaux projettent l'un vers l'autre réciproquement. De plus, le VB projette vers le cortex, principalement vers la couche IV, tandis que la couche VIa cible principalement le NRT et le VB (Fig.I.9A). Durant les oscillations lentes, le VB et le NRT émettent des bouffées de potentiels d'action de façon très rythmée. Au niveau cortical, l'arrivée régulière de bouffées de potentiels d'action à haute fréquence crée une dépolarisation autorisant l'activation des récepteurs NMDAs. Ces récepteurs lents et dépendants du voltage participent de façon fondamentale à la capacité des neurones pyramidaux à entrer

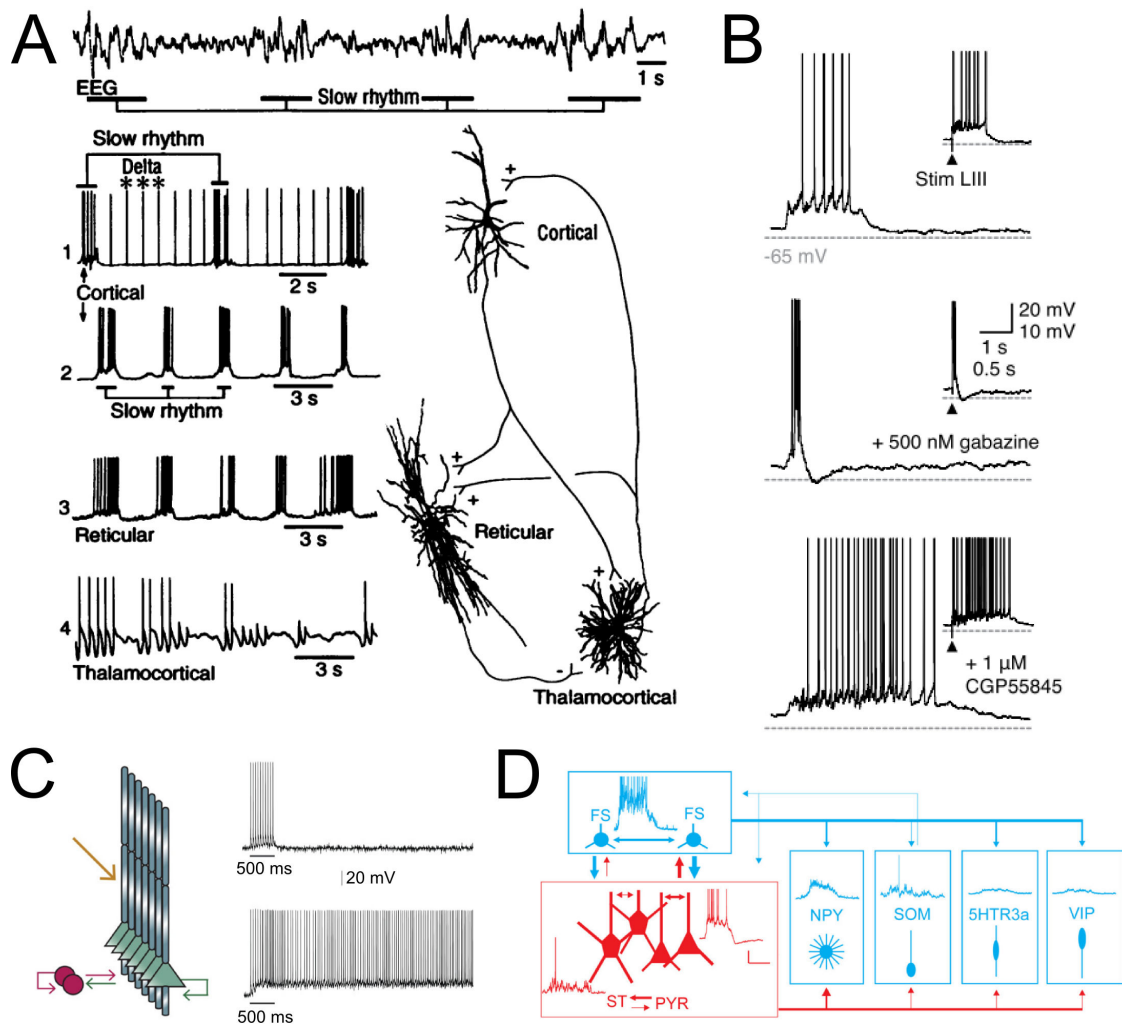


FIGURE I.9 – Bases moléculaires des activités persistantes. **A.** Oscillations induites et entretenues par la boucle thalamocorticale. *Provient de Steriade et al., 1993.* **B.** Modulation de la durée des états *up* par les antagonistes des récepteurs $GABA_A$ et $GABA_B$. *Adapté de Mann et al., 2009.* **C.** Modèle décrivant le comportement des activités persistantes en fonction du ratio AMPA/NMDA. *Provient de Papoutsis et al., 2013.* **D.** Comportement des différents sous-types d'interneurones corticaux durant les états *up*. *Provient de Tahvildari et al., 2012.*

dans un régime d'activité persistante (Figure I.9C ; Steriade et al., 1993, Wang, 1999, 2001, Papoutsis et al., 2013). Les études de modélisation du réseau cortical montrent que l'abondance relative de récepteurs AMPA et NMDA a un rôle critique dans la mise en place de ces activités persistantes. Dans l'exemple présenté dans la figure I.9C, on voit que pour un rapport AMPA/NMDA élevé, l'activité

du neurone pyramidal revient très vite à l'état initial après la stimulation alors qu'un ratio plus faible permet d'engendrer une activité de longue durée (Papoutsi et al., 2013). L'importance des récepteurs NMDA est donc soulignée à la fois dans le cas des états *up* et dans les activités persistantes de la mémoire de travail.

La transmission GABAergique joue également un rôle fondamental dans l'induction et le maintien des états *up* puisque comme nous l'avons dit précédemment, ces états dépendent d'un équilibre précis entre l'excitation et l'inhibition (Compte et al., 2003, Haider et al., 2006). En tranche, l'application d'antagonistes des récepteurs GABA_A qui bloque la transmission GABAergique ionotropique entraîne des états *up* instables avec parfois la mise en place de comportements épileptiformes (Mann et al., 2009). De façon plus surprenante, la même étude montre que l'application d'antagonistes des récepteurs métabotropiques du GABA (GABA_BRs) entraîne une prolongation des états *up* (Mann et al., 2009, Kohl and Paulsen, 2010 et Figure I.9B). Bien que le rôle des récepteurs GABAergiques dans le maintien des activités persistantes soit établi, la diversité des interneurons corticaux est encore peu prise en compte dans les différentes études. C'est particulièrement le cas dans les études de modélisation, qui sont nombreuses à s'intéresser à la génération d'activités persistantes dans un réseau de neurones. Ces modèles comportent généralement une population de neurones excitateurs et un unique type d'interneurone dont les propriétés biophysiques se rapprochent des interneurons FS. Pourtant, il est intéressant de noter que les neurones neurogliaformes (donc du sous-type SOM) pourraient activer les GABA_BRs avec un seul potentiel d'action (Tamás et al., 2004) alors que pour les autres types d'interneurones, la stimulation répétée des synapses GABAergiques est nécessaire au *spill over* du GABA et à l'activation des récepteurs métabotropiques. Récemment, une étude a disséqué le comportement des différents sous-types neuronaux du cortex au cours des états *up* dans un modèle de tranche de cortex entorhinal présentant des oscillations lentes. Cette étude montre que les différents types neuronaux ne participent pas de la même façon à la génération, au maintien et à la terminaison des états *up*. Ainsi, les pyramides excitatrices et les interneurons FS sont les deux types cellulaires principalement activés dans l'état *up*. Les neurones excitateurs étoilés ainsi que les interneurons de type SOM sont plus faiblement actifs et les VIP, les NPY et les neurones exprimant 5-HT_{3a}R sont silencieux. Pour les interneurons SOM, on a deux populations de neurones : des neurones inactifs et des neurones actifs spontanément dans la tranche même pendant les états *down*. Ces neurones reçoivent des entrées synaptiques massives pendant les états *up* mais qui ne sont pas suffisantes pour induire la décharge de potentiel en général dans ce modèle de tranche (Figure I.9D ; Tahvildari et al., 2012).

Bases moléculaires des activités persistantes induites par l'acétylcholine

Un modèle couramment utilisé pour la description et la recherche des facteurs qui permettent le maintien des activités persistantes est le modèle des ADPs (pour *after depolarization*). Pour induire des ADPs amples et reproductibles, on injecte au neurone enregistré un créneau de courant supraliminaire en présence d'agonistes des récepteurs muscariniques (mAChRs) ou des récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluRs). Ce plateau dépolarisant atteint ou non le seuil de déclenchement des potentiels d'action. Ces ADPs ont été enregistrées majoritairement dans les pyramides des cortex préfrontaux et entorhinaux (Haj-Dahmane and Andrade, 1996) ou dans les pyramides de l'hippocampe (Fraser and MacVicar, 1996).

Les premières études cherchant à comprendre les mécanismes moléculaires sous-tendant les activités persistantes ont mis en évidence une diminution de conductance en présence d'agonistes muscariniques. Comme ces activités s'accompagnent d'une dépolarisation des cellules, les auteurs ont conclu à la fermeture d'une conductance potassique (en particulier une diminution de I_{Leak}). Cependant, plusieurs études ultérieures ont remis en cause la fermeture exclusive d'une conductance et mis en évidence l'ouverture d'une conductance cationique non-sélective (Haj-Dahmane and Andrade, 1998, Fraser and MacVicar, 1996). Cette conductance nommée I_M serait sous-tendue par des canaux, nommés TRPCs pour *Transient Receptor Potential Channel*, dans le cortex entorhinal (Zhang et al., 2011). Ces canaux sont ouverts via l'activation des protéines G (Hofmann et al., 1999), ce qui est cohérent avec le mode de fonctionnement des récepteurs mAChRs ou mGluRs. Cependant, l'ouverture des canaux TRPC seuls ne permet pas d'expliquer tout le courant de l'ADP, ce qui laisse supposer que d'autres conductances pourraient être mises en jeu comme par exemple celle médiée par le récepteur glutamatergique ionotropique orphelin GluR δ 1 (voir Annexe II).

Une propriété intéressante des activités persistantes a été décrite par Egorov et ses collaborateurs en 2002. Dans cet article, les auteurs montrent la capacité d'incrémentation des activités persistantes (Fig.I.10 et Egorov et al., 2002). En effet, l'application de créneaux supraliminaires successifs induit une augmentation graduelle de la fréquence de décharge des potentiels d'action de l'ADP. De la même façon, les auteurs montrent que l'application de créneaux hyperpolarisants successifs induit une diminution graduelle de la fréquence de décharge des potentiels d'action.

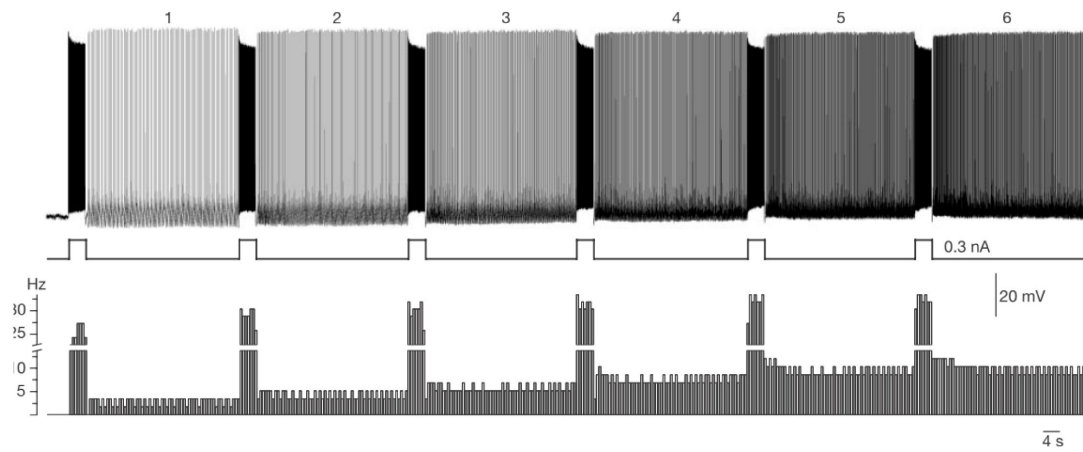


FIGURE I.10 – Incrémentation des activités persistantes induites par application d'un agoniste muscarinique. *Provient de Egorov et al., 2002.*

3 | Le thalamus non-spécifique

Le thalamus est classiquement vu comme un relais sensoriel projetant vers le néocortex et fortement organisé topographiquement. Ainsi chaque noyau du thalamus sensoriel reçoit des afférences d'une modalité sensorielle spécifique, vision, audition, somesthésie etc., et projette vers l'aire corticale sensorielle correspondante, cortex visuel, auditif, sensoriel, etc. C'est pourquoi ces noyaux sont couramment appelés noyaux spécifiques ou noyaux relais du thalamus. La première hypothèse de l'existence d'un thalamus autre qu'un relais sensoriel remonte aux années 1940 et aux travaux de Morison et Dempsey (Morison and Dempsey, 1942). Ils observent que la stimulation électrique des régions thalamiques centrales entraîne une activation des couches superficielles du cortex et en particulier des interneurons de la couche I. De plus, les études de traçage de Lorente de No montrent un profil de projections thalamiques diffus et à axones fins vers les aires corticales principalement associatives (Lorente de No, 1938). Se basant sur ces travaux, Morison et Dempsey proposent le concept d'un système de projections non-spécifiques provenant de noyaux thalamiques principalement situés dans les régions intralaminaires (ILN pour *intralaminar nuclei*) et de la ligne médiane (MTN pour *midline thalamic nuclei*).

Histoire du thalamus non-spécifique : de l'éveil cortical à la mémoire à long terme

La première hypothèse du rôle des noyaux non-spécifiques reposait sur les observations mentionnées précédemment d'une projection diffuse et éparse des fibres thalamiques dans l'ensemble du néocortex. Elle proposait que le thalamus non-spécifique pouvait agir comme un excitateur global du cortex permettant de potentialiser sa réponse à un stimulus.

Une hypothèse alternative a été imaginée et étudiée quelques années après par Herbert H. Jasper (Jasper et al., 1953, Hanbery and Jasper, 1953, 1954). Ces auteurs observent, par stimulation électrique des MTN et ILN, l'existence d'un réseau interconnecté projetant de façon diffuse dans le cortex et qui pourrait être le

substrat de l'éveil cortical voire de la conscience. Il suggèrent alors que le thalamus non-spécifique pourrait être la continuité rostrale du *activating reticular arousal system* (ARAS). Cette région réticulée, située dans le mésencéphale, a été mise en évidence par Moruzzi et Magoun qui ont observé que la stimulation de cette région entraîne une désynchronisation du cortex, caractéristique de l'état d'éveil (Moruzzi and Magoun, 1949). Ils ont alors élaboré la théorie d'un générateur d'éveil caudal dont la continuité rostrale serait le thalamus non-spécifique. Des travaux ultérieurs ont étayé cette théorie en observant que des lésions des ILN chez l'humain entraînent un syndrome d'hypersomnie (Façon et al., 1958, Castaigne et al., 1962).

Plus récemment, le thalamus non-spécifique a été étudié dans différents processus mnémoniques. En effet, chez l'humain, le syndrome de Korsakoff et l'amnésie diencephalique, deux syndromes où des lésions du diencephales sont observées, sont associés à des troubles de la mémoire. Bien que ces syndromes soient généralement attribués à des lésions du noyau médio-dorsal, les autres noyaux intralaminaires et de la ligne médiane peuvent être impliqués (Parker et al., 1997). De nombreuses études menées chez le primate non-humain et chez le rongeur confortent l'hypothèse d'un rôle du thalamus non-spécifique dans les processus mnémoniques en particulier dans le rappel de la mémoire à long terme, dans la mémoire de travail impliquant le cortex préfrontal médian ainsi que dans des tâches de conditionnement (Hembrook and Mair, 2011, Hembrook et al., 2012, Bailey and Mair, 2005, Buchanan et al., 1998, Loureiro et al., 2012, Cholvin et al., 2013). Ce rôle sera discuté ultérieurement dans ce chapitre.

Organisation topographique du thalamus non-spécifique

L'engouement des années 1940-1950 pour le thalamus non-spécifique a largement décliné dès le début des années 60 au profit de l'étude des noyaux relais du thalamus spécifique. De cette période, on a longtemps gardé l'image d'un thalamus non-spécifique projetant de façon éparse et ubiquitaire, avec un faible niveau d'organisation et donc un rôle mineur. Néanmoins, peu à peu, la compréhension du rôle du thalamus non-spécifique évolue et de plus en plus d'études mettent en évidence des territoires de projections ainsi que des rôles physiologiques pour ses différents noyaux.

Subdivision du thalamus

Les premières études développementales et comparatives ont divisé le thalamus en trois grandes parties en fonction du devenir des trois masses cellulaires du mur

diencéphalique : l'épithalamus, le thalamus ventral et le thalamus dorsal.

L'épithalamus est situé dorsalement, il comprend le noyau paraventriculaire et l'habénula. Contrairement aux deux autres structures thalamiques il possède plus d'affinité avec l'hypothalamus qu'avec le cortex cérébral.

Le thalamus ventral contient les noyaux réticulés thalamiques (NRT), géniculé ventral et latéral (vGN et lGN) et du champ de Forel. La plupart des cellules du thalamus ventral sont GABAergiques et elles sont issues du même groupe de cellules qui vont donner les cellules GABAergiques du globus pallidus (GP) et de la substance noire réticulée (SNr).

Le thalamus dorsal contient la plupart des noyaux thalamiques. Il envoie et reçoit des projections du striatum et du cortex. De façon générale, les noyaux qui le composent projettent vers le télencéphale et depuis les années 1940 sont subdivisés en noyaux principaux et noyaux intralaminaires.

Le thalamus dorsal

La définition permettant de séparer les différents noyaux du thalamus dorsal est énoncée dans l'ouvrage de référence d'Edward G. Jones (Jones, 2007) : Un noyau thalamique est une région circonscrite par une cytoarchitecture recevant un jeu particulier de fibres et projetant dans les frontières d'un ou plusieurs champs corticaux. Cette définition anatomique est issue des études de dégénérescence rétrograde de Manakow (1914). Relativement bien adaptée pour les noyaux relais du thalamus, elle est plus difficile à transposer pour les noyaux du thalamus non-spécifique dont les frontières de projection sont plus floues. Néanmoins, même si les projections sont plutôt diffuses, elles ciblent des champs corticaux circonscrits.

Chez le rongeur, les neurones du thalamus dorsal sont très largement glutamatergiques (99%). Ils reçoivent leurs afférences GABAergiques du NRT, qui projette principalement dans l'hémisphère ipsilatéral. Chez les primates le NRT est moins développé, et s'il projette vers l'ensemble des noyaux du thalamus dorsal, ceux-ci possèdent également leur propre réseau interne d'interneurones GABAergiques.

L'organisation des projections du thalamus non-spécifique

Les noyaux relais projetant massivement sur le néocortex, l'étude des afférences thalamiques s'est longtemps concentrée sur la voie thalamocorticale. Pourtant, la principale cible de projection des noyaux intralaminaires est le striatum. Ces projections sont systématiquement organisées de façon topographique. On notera en particulier que le rhomboïde (Rh), un noyau du MTN dont nous reparlerons au cours de ce manuscrit, projette sur les régions limbiques du striatum : noyau accumbens et striatum ventral (Giménez-Amaya et al., 1995). Les terminaisons thalamostriatales ne sont pas distribuées de façon diffuse. Elles forment de petits

agrégats focaux, qui co-localisent avec des régions précises nommées "matrice du striatum" où convergent également les fibres dopaminergiques (Deschenes et al., 1996).

Bien que les ILNs projettent de façon éparse et non-confinée dans un champ cortical particulier (Jones and Leavitt, 1974, Macchi et al., 1975, 1977), il semble que les aires striatales et corticales qui reçoivent les afférences d'un noyau intralaminaire soient elles-mêmes interconnectées (François et al., 1991, Sadikot et al., 1992a,b). Ainsi, les cortex cingulaire et retrosplénial projettent vers le striatum ventral et tous trois sont des zones de projection massive du rhomboïde. De plus, l'étude des collatérales montre qu'un même neurone thalamique peut projeter à la fois sur le striatum et sur le cortex, ce qui peut avoir une grande influence sur la synchronisation du réseau cortico-striato-thalamique (Cesaro et al., 1985, Deschenes et al., 1996, Parent and Parent, 2005).

Le caractère diffus des projections thalamocorticales est souvent interprété comme une preuve de la faible influence du thalamus non-spécifique sur le réseau cortical. Néanmoins, plusieurs études montrent que l'activation des MTNs entraîne la décharge de potentiels d'action dans leurs structures cibles : l'hippocampe (Dolleman-Van der Weel et al., 1997, Dolleman-Van der Weel and Witter, 2000), le cortex entorhinal ou l'amygdale (Zhang and Bertram, 2002). Ainsi, des enregistrements *in vivo* dans la région CA1 de l'hippocampe montrent que la stimulation électrique des noyaux de la ligne médiane (principalement réunis (RE) et Rh) induit des réponses équivalentes ou plus amples que la stimulation de CA3 qui est pourtant la principale afférence glutamatergique intra-hippocampique (Bertram and Zhang, 1999).

Le noyau rhomboïde : un noyau de la ligne médiane du thalamus

Rhomboïde : anatomie, afférences et efférences

Le Rh appartient aux MTNs, il est situé de part et d'autre de la ligne médiane (Figure I.11) et projette dans les deux hémisphères. Du fait de sa petite taille et de sa proximité avec le Re, les deux noyaux sont souvent associés dans les études d'électrophysiologie *in vivo* ou de comportement.

Aucune étude n'a spécifiquement cherché à caractériser les neurones du Rh et du Re. Néanmoins, quelques traits se dessinent au fil d'études plus générales. Le Rh est constitué de neurones glutamatergiques aux propriétés électrophysiologiques similaires à celle des autres noyaux thalamiques (Bayer et al., 2002a). Ces neurones sont de taille moyenne, généralement fusiforme, leurs dendrites plongent dans la lame médullaire interne qui traverse le Rh dans sa partie dorsale. Les marquages

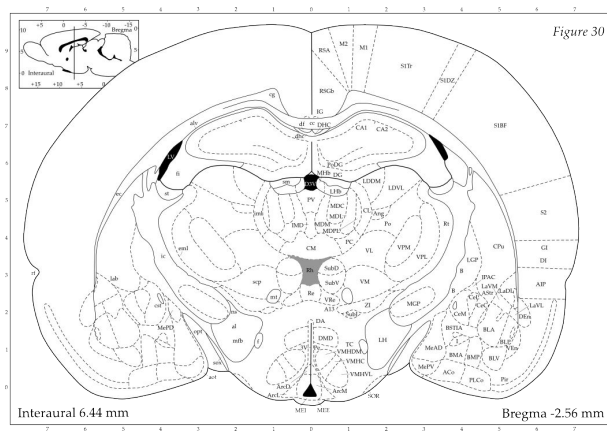


FIGURE I.11 – Localisation du Rh (en gris). *Adapté de Paxinos*

au Nissl du thalamus montre que ce noyau contient une densité plus élevée de neurones que les noyaux avoisinants, ce qui lui a valu la dénomination de *nucleus centralis densocellularis* (Olszewski, 1952).

Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, le Rh projette principalement et massivement sur le striatum ventral et le globus pallidus (Figure I.12), où ses afférences s'associent préférentiellement à la matrice du striatum, dans des zones où la concentration en acétylcholinestérase et calbindin diminuent. De façon intéressante, ce profil de projection est similaire à celui des fibres dopaminergiques. L'étude des cibles cellulaires du Rh dans le striatum montre une projection assez ubiquitaire sur les neurones étoilés épineux (MSN), les interneurons GABAergiques et les interneurons cholinergiques (Bolam et al., 1984, Meredith and Wouterlood, 1990, Sadikot and Sasseville, 1997). Cependant, la comparaison des stimulations électriques du néocortex et des MTNs montre un plus faible recrutement des interneurons lors de la stimulation des MTNs (Kawaguchi, 1993, Kubota et al., 1994).

Le complexe Re/Rh projette aussi très largement vers les aires associatives du cortex : préfrontal, pariétal et rétrosplénial en particulier (Figure I.12 et Vertes, 2006)

Les MTNs reçoivent des entrées de nombreuses structures modulatrices. Nous avons vu précédemment qu'ils étaient une cible privilégiée du ARAS. Mais ils reçoivent aussi des entrées noradrénergiques du locus coeruleus, sérotoninergiques du noyau de Raphé, cholinergiques de la région parabranchiale du pons (LDTg et PPTg) et des entrées histaminergiques plus diffuses de l'hypothalamus supérieur (Lavoie and Parent, 1991, Garcia-Rill et al., 1995, Mesulam et al., 1983, Brunton and Charpak, 1998). Plus spécifiquement et c'est une des raisons de notre intérêt pour le rhomboïde, il présente avec les noyaux centromédian, parafascicu-

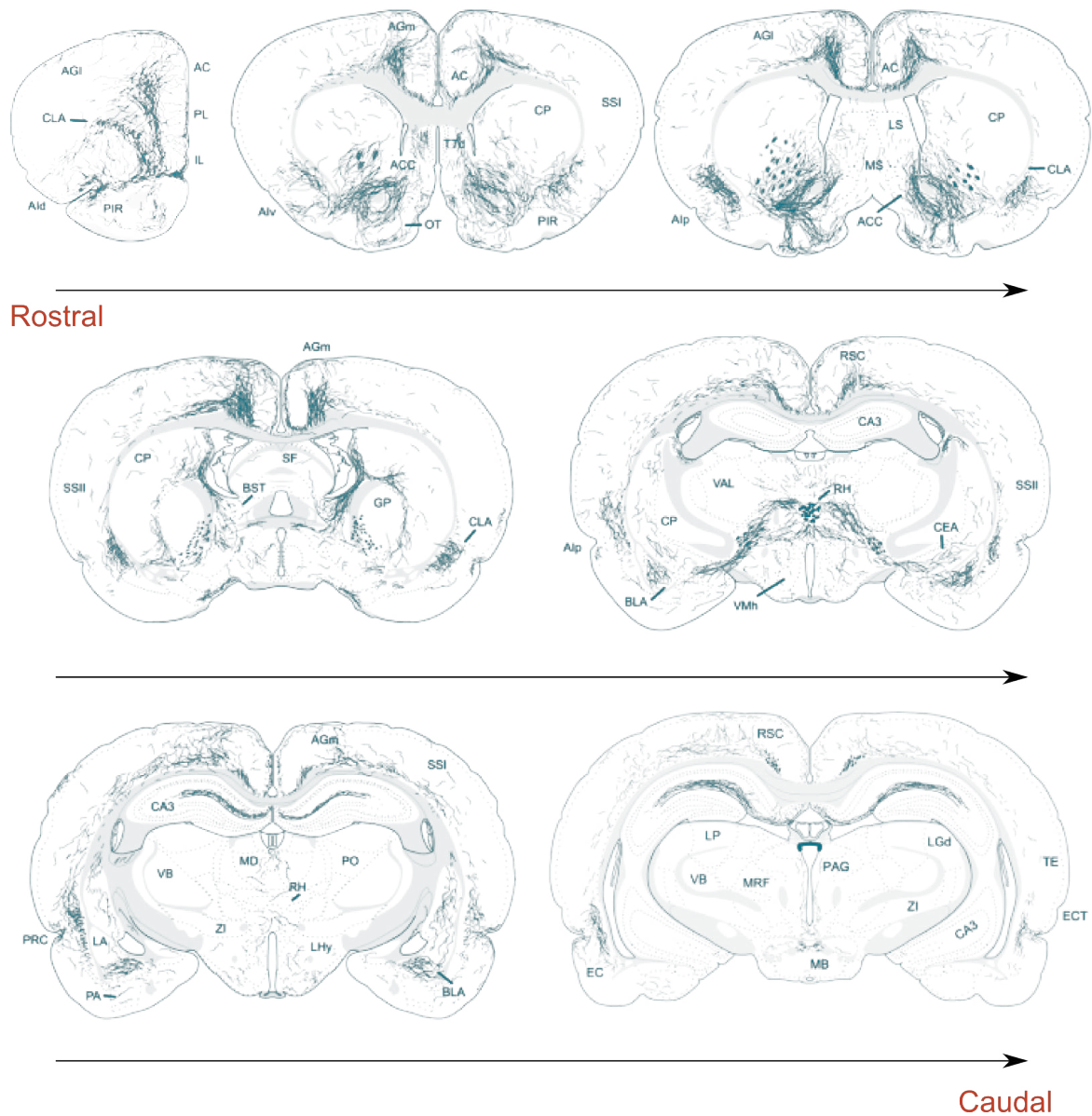


FIGURE I.12 – Projections corticales du rhomboïde. *Adapté de Vertes et al., 2006*

laire, paraventriculaire, centrolatéral et médiadorsal une sensibilité à l'orexine, un neuropeptide clé de l'éveil cortical, qu'on ne retrouve pas au niveau du thalamus spécifique (Bayer et al., 2002a, Huang et al., 2006, Govindaiah and Cox, 2006).

Les MTNs sont aussi les cibles d'afférences glutamatergiques. Dans notre système d'intérêt : le Rh ou le complexe Re/Rh, nous retiendrons que ces deux structures sont des cibles de projections de l'hippocampe et du cortex préfrontal médian (mPFC).

Implication du complexe Re/Rh dans les processus mnémoniques

Les connexions réciproques entre les MTNs et plusieurs noyaux du réseau limbique comme l'hippocampe, le mPFC, le cortex entorhinal ou l'amygdale suggèrent un rôle important pour les noyaux de la ligne médiane dans les processus mnémoniques. Plus précisément, le complexe Re/Rh projette massivement sur l'hippocampe, le striatum, le mPFC et le cortex pariétal, quatre structures largement impliquées dans la mémoire spatiale, la mémoire de travail, la prise de décision ou le stockage de mémoire à long terme. Recevant lui-même des projections du mPFC et de l'hippocampe, il serait au centre des trafics d'informations entre ces structures.

Le complexe Re/Rh est à l'origine de la voie la plus directe de transfert d'information du mPFC à l'hippocampe puisqu'il n'existe aucune voie directe du mPFC vers l'hippocampe. Plusieurs études ont donc cherché à comprendre si cette emplacement stratégique avait une influence dans les tâches mnémoniques impliquant ces deux structures.

Implication dans la mémoire de travail

L'hippocampe est la principale structure impliquée dans le stockage de la mémoire de travail, une mémoire à court terme de l'ordre de la minute. Elle est souvent testée dans des tâches de comportement où l'animal est confronté à plusieurs éléments (leviers ou bras) auxquels une règle simple a été associée. Par exemple, la tâche de *varying choice delayed non-matching* (VC-DNM) se déroule dans un labyrinthe radial en présence d'indices spatiaux. L'animal est tout d'abord enfermé au centre, puis une porte s'ouvre sur un bras que l'animal doit explorer. Moins d'une minute après le retour au centre, deux portes s'ouvrent dont celle déjà explorée. La règle de la tâche est que l'animal doit aller visiter le nouveau bras. Cette tâche requiert donc de se souvenir du bras exploré, ce qui constitue une règle très simple et n'implique que l'hippocampe. Cette tâche couplée à des lésions spécifiques des MTN montre que les noyaux de la ligne médiane dont le complexe Re/Rh ne sont pas impliqués dans la mémoire de travail pour les tâches très simples (Bailey and Mair, 2005, Hembrook and Mair, 2011). Des résultats similaires sont retrouvés en piscine de Morris où la plateforme à atteindre est immergée (Cholvin et al., 2013).

Lorsque la tâche de mémoire de travail repose sur une règle plus compliquée, une interaction entre le mPFC et l'hippocampe est nécessaire à sa réalisation. C'est le cas pour les tâches de *delayed non-matching to position* (DNMTP), *win/shift radial arm maze* (WS-RAM) ou de *delayed choice RAM* (DC-RAM). Ces deux dernières tâches se déroulent dans un *radial maze* et impliquent la mémorisation de la situation des huit bras. Cette tâche demande donc un effort de mémorisation

beaucoup plus important que la tâche de VC-DNM. Dans ce cas, la lésion du complexe Re/Rh altère significativement les performances des animaux (Hembrook and Mair, 2011, Hembrook et al., 2012).

Ces différentes études sur la mémoire de travail montrent l'implication du complexe Re/Rh dans la mémoire spatiale à court terme qui dépend des interactions mPFC-hippocampe mais pas celle qui implique l'hippocampe seul. Les auteurs suggèrent que l'inactivation du complexe Re/Rh interfère sur sa capacité à synchroniser l'activité des réseaux limbiques à grande échelle durant la tâche, provoquant les déficits mnémoniques.

Implication dans la mémoire à long terme

La consolidation d'un souvenir implique son transfert de l'hippocampe vers les aires corticales, en particulier pariétale et préfrontale. Dans le cortex préfrontal serait encodée sur le long terme une mémoire schématique de l'évènement (Euston et al., 2012). La mémoire à long terme implique donc à nouveau un dialogue entre l'hippocampe et les aires corticales au moment de la consolidation du souvenir. Le rappel d'un souvenir stocké dans la mémoire à long terme nécessite une étroite collaboration entre l'ensemble de ces structures. En particulier, l'hippocampe est sollicité pour le rappel des souvenirs contextuellement riches et principalement lorsque les souvenirs sont récents. Lors du rappel de souvenirs anciens, un dialogue entre le mPFC, le pariétal et l'hippocampe est à nouveau nécessaire.

Le rôle du complexe Re/Rh dans la mémoire à long terme a été étudié dans une tâche de piscine de Morris à plateforme immergée. Les rats se déplacent dans un environnement contenant des indices pour retrouver la plateforme. La lésion des noyaux Re/Rh entraîne un déficit dans la capacité à retrouver la plateforme 25 jours après l'acquisition de la tâche. De plus, sur les animaux non lésés, l'utilisation du marqueur d'activité et de plasticité cellulaires c-FOS montre une forte activation du complexe Re/Rh lors du rappel de mémoire à 25 jours dans les noyaux thalamiques. Ces résultats suggèrent un rôle du complexe Re/Rh dans le rappel des souvenirs anciens, qui nécessite un dialogue mPFC-hippocampe mais pas dans le rappel des souvenirs récents, qui ne nécessite que l'activation de l'hippocampe (Loureiro et al., 2012).

Implication dans le changement de stratégie

Le changement de stratégie est une tâche qui implique la capacité de prise de décision gérée par le mPFC. Dans le cadre d'une tâche de navigation spatiale, il nécessite aussi une connaissance de l'environnement apportée par l'hippocampe. Cette tâche nécessite donc à nouveau un dialogue entre le mPFC et l'hippocampe. La tâche de *behavioral adaptation involving a place strategy* a été testée dans un

double *H-maze*. L'animal est placé de façon aléatoire à deux endroits du labyrinthe et il doit nager jusqu'à la plateforme dont l'emplacement est fixe au cours de l'expérience. Il doit donc utiliser les indices spatiaux pour déterminer le bras dans lequel il a été lâché (rôle de l'hippocampe) et donc choisir le chemin à prendre pour retrouver la plateforme (rôle du mPFC). À nouveau, une lésion du complexe Re/Rh affecte les performances dans cette tâche, suggérant qu'il est impliqué dans le changement de stratégie (Figure I.12 et Cholvin et al., 2013).

Conclusion

Le complexe Re/Rh semble donc impliqué dans les différentes tâches mnémoriques qui nécessitent un dialogue entre le mPFC et l'hippocampe. Ces résultats sont étayés par des données anatomiques (Berendse and Groenewegen, 1991, Van der Werf et al., 2002, Vertes, 2006, Vertes et al., 2006) et comportementales (Bailey and Mair, 2005, Hembrook and Mair, 2011, Hembrook et al., 2012, Loureiro et al., 2012, Cholvin et al., 2013). Le complexe Re/Rh pourrait alors être considéré comme un *hub* dans le dialogue mPFC-hippocampe (Figure I.13).

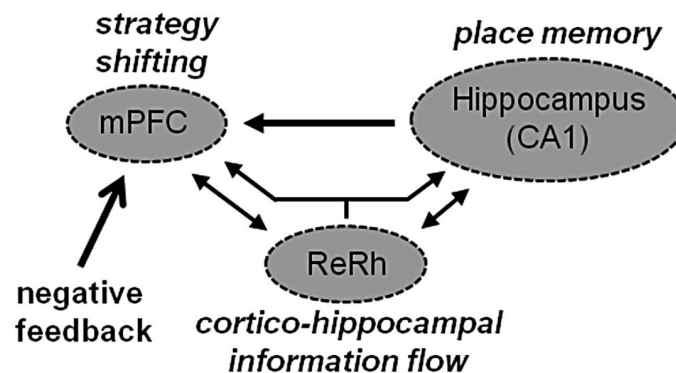


FIGURE I.13 – Rôle hypothétique de Re/Rh dans le contrôle des informations hippocampo-corticales. *D'après Cholvin et al., 2013*

Néanmoins, des données antérieures avaient montré que la lésion des MTNs entraînait des déficits dans les conditionnements non-optimaux, donc un apprentissage dans des conditions difficiles. Les auteurs avaient alors supposé que ce déficit était imputable au rôle des MTNs dans l'éveil, ces noyaux ayant alors un impact sur les performances en agissant sur le niveau de concentration de l'animal (Buchanan et al., 1998).

Si le rôle direct des MTN dans les processus mnémoriques semble aujourd'hui largement établi, il reste à bien déterminer si ces noyaux ont un effet actif sur les différents processus mnémoriques sus-mentionnés et modulent le dialogue mPFC-hippocampe ou s'ils agissent en synchronisant les activités du mPFC et de

l'hippocampe. Nous verrons dans la discussion de cette thèse dans quelle mesure les résultats que j'ai obtenus permettent de progresser dans la compréhension de ce mécanisme.

4 | Le système cholinergique et ses projections corticales

L'acétylcholine

Aperçu historique

l'acétylcholine est considérée comme le premier composant endogène du cerveau identifié et purifié avec certitude dès 1865 sous le nom de Protagon (Liebreich, 1865). Isolée à nouveau en 1866 par Adolf van Baeyer, l'acétylcholine prend alors son nom définitif (Baeyer, 1866). Son rôle ainsi que celui de la nicotine a ensuite été largement exploré dans le système nerveux périphérique par de nombreux physiologistes comme Dale et Langley (Dale, 1914, Dale and Dudley, 1929, Nanda et al., 2009).

En parallèle, et ce depuis le milieu du 19^{me} siècle, une molécule nommée ultérieurement physostigmine avait été identifiée ; cette toxine entraîne des troubles neuromusculaires si violents que Christison l'avait proposée pour les injections létales des condamnés à mort (Christison, 1855, Jobst and Hesse, 1864). Il faudra attendre 1926 pour que Loewi et Navratil établissent que la physostigmine agit sur le système cholinergique en inhibant l'acétylcholinestérase (Loewi and Navratil, 1926).

Synthèse et dégradation de l'acétylcholine

La synthèse de l'acétylcholine à partir de la choline et de l'acétyl étant une réaction endothermique, l'acétyl est au préalable activée via une liaison avec la Coenzyme A pour former l'Acétyl-Coenzyme A. Le groupement acétyl est ensuite transféré de la coenzyme A à la choline grâce à la choline-acétyl-transférase. La libération de l'acétylcholine étant vésiculaire et sa synthèse cytoplasmique, la vesicular acetylcholine transferase (VAcHT) permet le transfert de l'acétylcholine dans les vésicules. Après sa libération, l'acétylcholine est hydrolysée par l'acétylcholine

estérase (AChE) et la choline est capturée au niveau des terminaisons pour y être recyclée.

Rôle physiologique de l'acétylcholine

L'acétylcholine est impliquée dans de nombreux processus physiologiques (stress, éveil, attention, mémoire, motivation) ainsi que dans de nombreuses pathologies (maladie d'Alzheimer, maladie de Parkinson, addiction, schizophrénie, etc.). On observe une dégénérescence des neurones cholinergiques des noyaux basaux chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, du syndrome de Down, de la maladie de Parkinson, du complexe démence parkinsonienne-sclérose latérale amyotrophique, du syndrome de Korsakoff, de la maladie de Kreutzfeldt-Jakob ou de certaines formes de démences séniles.

L'acétylcholine joue également un rôle primordial dans la modulation des états d'éveil. Les mesures de concentration d'acétylcholine dans le fluide céphalo-rachidien montrent un taux d'acétylcholine maximal pendant l'éveil et le sommeil paradoxal et minimal pendant le sommeil profond. De plus, le taux de libération d'acétylcholine et les oscillations corticales mesurées par électroencéphalographie sont corrélés car ces désynchronisations sont soutenues par la libération d'acétylcholine (Jasper and Tessier, 1971).

Enfin, la libération d'acétylcholine dans les différentes aires corticales participe à la modulation des états d'attention et par conséquent à l'intégration des entrées sensorielles. Au niveau des intégrations sensorielles, l'application iontophorétique d'acétylcholine dans le cortex visuel du chat augmente l'amplitude de la réponse des neurones à un stimulus spécifique dans 60% des cellules mais ne déprime pas la réponse à un stimulus non spécifique (Sillito and Kemp, 1983). De façon similaire, la réponse à un stimulus sensoriel est potentialisée dans les couches infra- et supra-granulaire du cortex somatosensoriel en présence d'acétylcholine exogène (Donoghue and Carroll, 1987). En revanche, l'activation des récepteurs muscariniques de type 4 inhibe la réponse au stimulus sensoriel dans la couche IV, ce qui permettrait un filtrage des entrées sensorielles faibles et augmenterait la qualité de détection des stimulus saillants (Eggermann and Feldmeyer, 2009). Les cortex associatifs jouent un rôle primordial dans la modulation des états d'éveil. En particulier, la déplétion en acétylcholine dans le cortex pariétal, par dénervation, entraîne des déficits de gradation des niveaux d'attention chez le rat (Bucci et al., 1998). De même, la destruction des fibres cholinergiques projetant dans le mPFC, ou l'application d'antagonistes cholinergiques dans ce même cortex entraînent des déficits de mémoire de travail et des troubles de l'attention (Couey et al., 2007). Ces déficits seraient principalement dus à la suppression de la modulation muscarinique et à la mise en jeu du mécanisme d'activité persistante dont nous avons parlé dans le chapitre 2 de l'introduction. Néanmoins, une étude récente lie l'expression des ré-

cepteur nicotinique hétéromérique contenant la sous-unité $\beta 2$ dans le mPFC aux niveaux d'attention. En effet, les souris déficientes pour la sous-unité $\beta 2$ présentent des troubles de l'attention qui peuvent être limités par la ré-expression spécifique de $\beta 2$ dans les neurones pyramidaux du mPFC, remettant en cause l'implication seule des récepteurs muscariniques (Guillem et al., 2011).

Les noyaux cholinergiques et leurs projections

L'acétylcholine est synthétisée par de multiples populations neuronales réparties dans l'ensemble du système nerveux.

Les noyaux cholinergiques

Le système cholinergique central est très diffus. Il est composé d'un ensemble de noyaux situés dans le télencéphale, le diencephale et le mésencéphale. Huit noyaux cholinergiques principaux, classés de Ch1 à Ch8 ont été décrits d'après leur localisation et leurs projections (Mesulam et al., 1983). Ch1 à Ch4 forment un premier groupe de noyaux situés dans les noyaux basaux qui projettent vers les différentes régions corticales et l'amygdale, Ch5 et Ch6 sont situés dans le mésencéphale. Ch7 est la seule structure cholinergique du diencephale, elle est située dans la partie ventrale de l'habénula médiane et ses neurones cholinergiques pourraient co-libérer du glutamate (Ren et al., 2011). Enfin Ch8 correspond aux neurones du noyau parabigéminale. Les différents noyaux cholinergiques projettent principalement dans la structure cérébrale à laquelle ils appartiennent. Néanmoins on peut noter que Ch6, le noyau tegmental latérodorsal, est situé dans le mésencéphale et projette à la fois sur des structures du mésencéphale, comme l'aire tegmentale ventrale, ou du diencephale, comme le thalamus (Figure I.14 et Mesulam et al., 1983). Cette dénomination des noyaux cholinergiques ne peut néanmoins pas s'appliquer de façon stricte chez le rat dont les noyaux impliqués dans les différentes voies de projection ne sont pas clairement délimités. De plus, la nomenclature présente des redondances et certains noyaux peuvent être appelés différemment en fonction de l'espèce considérée. C'est par exemple le cas pour Ch4, nommé noyau basal magnocellulaire chez le rat et noyau de Meynert chez l'humain.

A l'intérieur même de ces noyaux, les neurones cholinergiques ne constituent en général qu'une sous-population neuronale. Ainsi les neurones cholinergiques du septum médian (Ch1) ne représentent que 10% des neurones de la région tandis qu'ils constituent 70% des neurones de la bande diagonale de Broca verticale mais seulement 1% de la partie horizontale. Si ces noyaux possèdent majoritairement des neurones cholinergiques de projection, d'autres structures en revanche possèdent plutôt des neurones à projections locales comme dans le striatum ou le neocortex.

De plus, le système cholinergique murin qui est le principal système décrit présente des différences avec l'humain. En particulier, il semblerait que l'humain ne possède pas d'interneurones VIP cholinergiques dans le néocortex (Eckenstein and Thoenen, 1983, Porter et al., 1998).

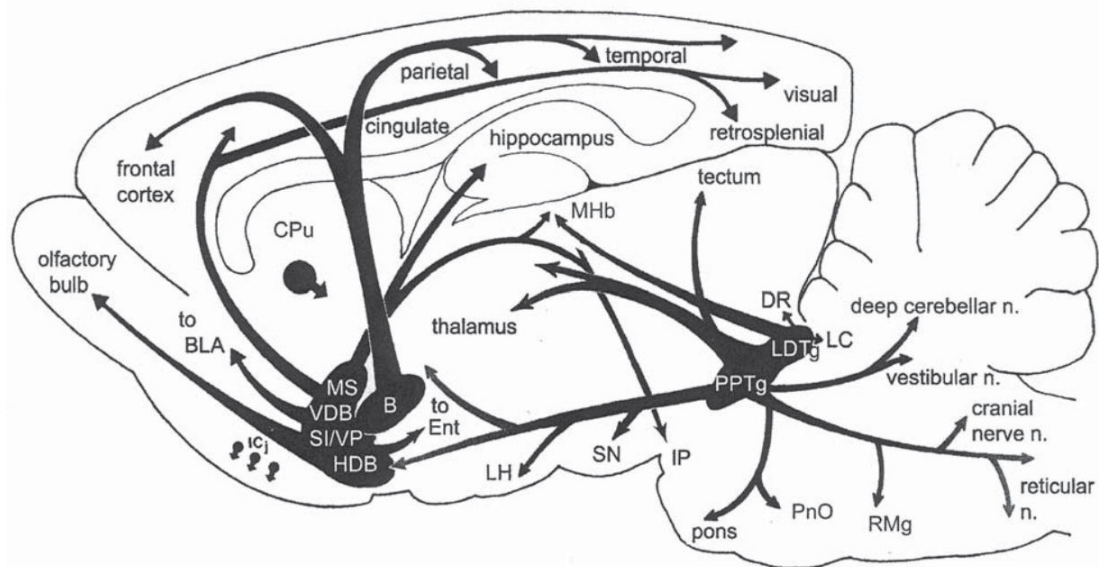


FIGURE I.14 – Les noyaux cholinergiques et leurs projections : B=basal nucleus of Meynert, BLA=basolateral amygdaloid nucleus, CPu=caudate putamen, DR=dorsal raphe nucleus, ICj=islands of Calleja, HDB=horizontal limb of the diagonal band of Broca, IP=interpeduncular nucleus, LC=locus coeruleus, LDTg=laterodorsal tegmental nucleus, LH=lateral hypothalamic area, MHb=medial habenular nucleus, MS=medial septal nucleus, PnO=pontine reticular nucleus, PPTg=pedunculo-pontine tegmental nucleus, RMg=raphe magnus nucleus, SI=substantia innominata, VDB=vertical limb of the diagonal band of Broca, VP=ventral pallidum, SN=sustantia nigra.

Les afférences cholinergiques du néocortex

Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, le néocortex reçoit des afférences cholinergiques principalement des noyaux magnocellulaires du basal forebrain : bande diagonale de Broca horizontale (HDB) et verticale (VDB) et substantia innominata (SI; Mesulam et al., 1983). Chez le rat, ces noyaux ne contiennent que 7000 à 9000 neurones cholinergiques. Ils projettent dans l'ensemble du néocortex suivant un gradient antéro-postérieur, dorso-ventral et médio-latéral (Lamour et al., 1982, Luiten et al., 1985, 1987, Lysakowski et al., 1989). Ainsi les neurones

cholinergiques situés dans la région antérieure du noyau basal magnocellulaire projettent majoritairement dans un cadran ventral des cortex antérieurs ainsi que dans l'amygdale tandis que les neurones des régions postérieures projettent dans un cadran dorsal du cortex. Cette organisation topographique est également vraie dans le cas des projections cholinergiques vers le cortex visuel (Lamour et al., 1982).

Les fibres cholinergiques sont principalement identifiées par marquage immunohistochimique de la ChAT ou de l'AChE, qui révèlent une répartition hétérogène des fibres en fonction des couches corticales (Lysakowski et al., 1989). Ainsi on trouve des fibres exprimant la ChAT et un marquage AChE dans l'ensemble des couches corticales mais avec une densité plus importante en couches I et V-VI (Figure I.15A et Eckenstein et al., 1988)

En plus de cette modulation cholinergique sous-corticale, une population d'interneurones présents majoritairement en couche II/III expriment la ChAT (Figure I.15 B et C, Eckenstein and Thoenen, 1983, Eckenstein et al., 1988). Ces neurones co-expriment le VIP et présentent une morphologie en "double bouquet" (voir Figure I.15 C et Kubota et al., 1994, Porter et al., 1998). Fonctionnellement, leur étroite association avec le système vasculaire est cohérente avec une action directe du VIP et de l'acétylcholine sur le couplage neurovasculaire (Eckenstein and Baughman, 1984, Cauli et al., 2004) et ainsi, ils pourraient augmenter la libération de glutamate via l'activation des récepteurs cholinergiques situés au niveau des terminaisons glutamatergiques en pré-synaptique (Engelhardt et al., 2007). Enfin chez le rongeur, ces interneurones représentent 20 à 30 % des terminaisons cholinergique dans le néocortex (Eckenstein and Baughman, 1984). Il semblerait néanmoins qu'on ne retrouve pas cette population d'interneurones cholinergiques chez les primates (Hedreen et al., 1983, Mesulam et al., 1992).

Les récepteurs nicotiques à l'acétylcholine

À l'instar de la transmission glutamatergique, il existe deux types de transmission cholinergique : une rapide utilisant des récepteurs ionotropiques nicotiques, et une plus lente passant par des récepteurs métabotropiques muscariniques.

Les récepteurs nicotiques appartiennent à la famille des récepteurs cis-loop. Ils ont été isolés dans les années 1990 à partir de l'organe électrique de torpilles et d'anguilles (Changeux, 1990) puis à partir de muscles squelettiques de mammifères.

Structure des nAChRs

Les nAChRs sont constitués de cinq sous-unités protéiques pour former un récepteur allostérique. Ces sous-unités peuvent être de type α , β , δ , ϵ et γ , et seules les sous-unités de type α peuvent lier l'acétylcholine. Au niveau de la jonction

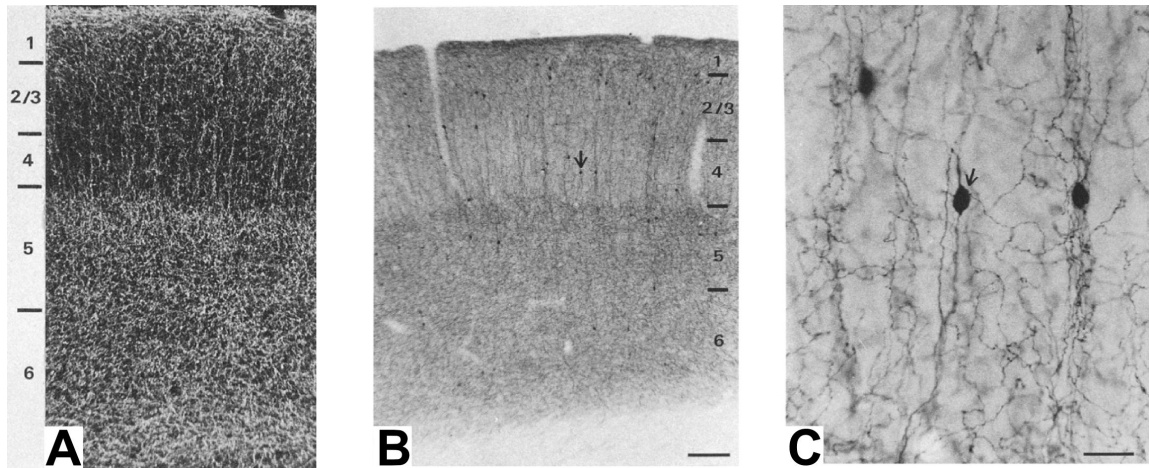


FIGURE I.15 – Fibres cholinergiques dans le néocortex. **A.** Projections des noyaux basaux dans le cortex pariétal. **B.** Marquage ChAT dans le cortex pariétal. **C.** Grossissement de l'image précédente, montrant les somas d'interneurones à double bouquet. *Adapté de Eckenstein et al., 1988.*

neuromusculaire, les récepteurs nicotiniques sont composés de 2α , 1β , 1δ et 1ϵ ou 1γ et la liaison de deux molécules d'acétylcholine au niveau des deux sous-unités α est nécessaire à l'ouverture du canal. Dans le système nerveux central, seules les sous-unités $\alpha 2$ - $\alpha 9$ et $\beta 2$ - $\beta 4$ sont exprimées. Les 5 sous-unités forment une structure en rosette, observables en microscopie électronique.

Chaque sous-unité est une protéine à quatre segments transmembranaires (M1-M4) avec la terminaison N-terminale en extracellulaire et qui contient le site de liaison à l'agoniste. Le site de liaison des sous-unité α contient une paire de cystéines nécessaire à la liaison de l'agoniste. La boucle intracellulaire entre les segments M3 et M4 contient des sites de phosphorylation permettant la régulation du récepteur. L'agencement des segments M2 des 5 sous-unités permet la formation d'un port cationique non-sélectif dont la perméabilité relative aux ions dépend de la nature des sous-unités.

L'agencement des sous-unités pour former un récepteur nicotinique conditionne ses propriétés de cinétique, de conductance, de désensibilisation et suit des règles précises. Ainsi certaines sous-unités forment exclusivement des récepteurs homomériques (c'est le cas pour $\alpha 7$ et $\alpha 8$), tandis que les autres entrent dans des combinaisons pour former des récepteurs hétéromériques. L'étude des différentes associations de sous-unités montre que les récepteurs hétéromériques ont une composition de la forme $\alpha_{2/3}\beta_{3/2}$, la forme la plus courante comprenant deux sous-unités α et trois sous-unités β . Les récepteurs hétéromériques comportent généralement un type de sous-unité α et un type de sous-unité β , mais on a parfois des combi-

naisons plus complexes, et certaines études vont jusqu'à envisager des récepteurs composés de quatre types de sous-unités différentes. Pourtant, l'absence d'anticorps spécifique pour chacune des sous-unités et de signature électrophysiologique et pharmacologique pour les différentes combinaisons de sous-unités rend complexe l'identification de la composition exacte des récepteurs nicotiques. Deux méthodes ont donc été utilisées pour tenter de démontrer l'existence de tels récepteurs. La première consiste à coupler PCR quantitative et évaluation statistique. La deuxième est l'étude des propriétés des courants nicotiques en système hétérologue, principalement en ovocyte de xénope. Pour ces études, les ovocytes sont transfectés avec des plasmides contenant les différentes sous-unités nicotiques dans des proportions variables. La comparaison des courants obtenus laisse penser que la combinaison de quatre sous-unités nicotiques différentes peut donner un canal fonctionnel. Néanmoins, ces études en système hétérologue ne permettent pas d'affirmer que ce type d'association existe réellement dans les neurones.

Localisation des nAChRs

Les différentes combinaisons de récepteurs nicotiques sont réparties de façon précise dans le système nerveux périphérique, en particulier au niveau de la jonction neuromusculaire, et dans le système nerveux central. Dans le système nerveux central, on observe une spécificité d'expression des sous-unités nicotiques. Ainsi, la sous-unité $\alpha 2$ est exprimée spécifiquement dans le noyau interpedonculaire, la sous-unité $\alpha 5$ est principalement exprimée dans le néocortex, l'hippocampe, l'aire tegmentale ventrale, la substance noire compacte et l'habénula médiane. De même, la sous-unité $\alpha 6$ est exprimée dans la substance noire compacte et le colliculus supérieur et peu ou pas dans les autres structures (Taly et al., 2009).

Les récepteurs sont généralement situés dans les compartiments dendritiques et somatiques mais les avis divergent sur leur confinement ou non au sein d'une synapse. En effet, l'absence d'anticorps spécifique pour les récepteurs nicotiques, les données très variables sur la proportion de différenciation synaptique au niveau des varicosités cholinergiques ainsi que jusqu'à récemment les difficultés pour faire libérer l'acétylcholine endogène par les fibres cholinergiques ont laissé la problématique ouverte.

On trouve également des récepteurs au niveau des terminaisons pré-synaptiques qui peuvent avoir un rôle direct sur la libération des neurotransmetteurs. Ainsi, des récepteurs $\alpha 7$ ont été décrits au niveau des terminaisons glutamatergiques contactant les neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale (Jones and Wonnacott, 2004).

Dans cette partie, nous nous focaliserons sur les récepteurs nicotiques exprimés dans le néocortex : le récepteur homomérique $\alpha 7$ et le récepteur hétéromérique $\alpha 4(\alpha 5)\beta 2$ (Porter et al., 1999, Christophe et al., 2002, Kassam et al., 2008). Ces

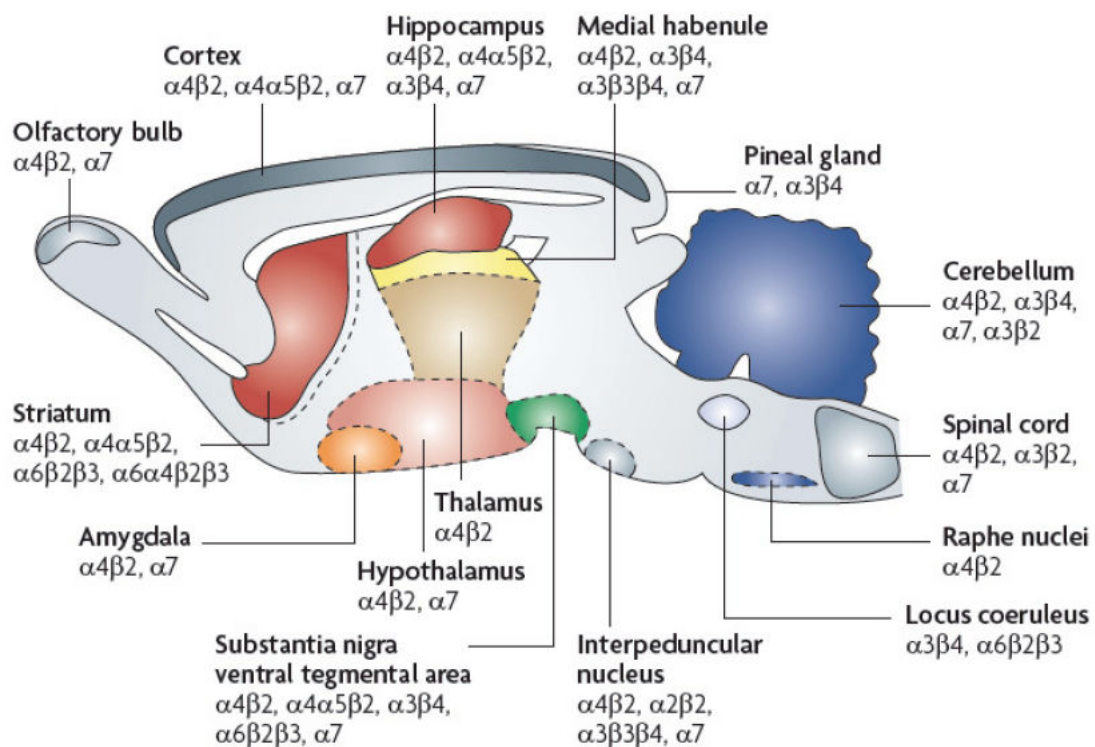


FIGURE I.16 – Expression des nAChRs dans le système nerveux central (SNC).
D'après Taly et al., 2009

deux types de récepteurs sont les plus courants du système nerveux central, et si le récepteur $\alpha 7$ est toujours présent sous la forme homomérique, des sous-unités accessoires peuvent être associées au récepteur $\alpha 4\beta 2$ en fonction des structures.

Les récepteurs homomériques $\alpha 7$

Cinq sous-unités $\alpha 7$ s'assemblent pour former des homopentamères. Ces récepteurs sont bloqués pharmacologiquement par le MLA (méthyllycaconitine), qui est un alcaloïde diterpène produit par le *Delphinium sp.*. Il agit comme antagoniste compétitif des récepteurs $\alpha 7$ et est assez sélectif de ce type de récepteur quand il est utilisé à faible concentration (< 100 nM). À plus haute concentration, il peut cibler les récepteurs hétéromériques comprenant une interface $\alpha\alpha$.

Les récepteurs $\alpha 7$ sont des récepteurs à faible affinité, aux cinétiques très rapides et présentant une désensibilisation très rapide (Figure I.17A). Ces cinétiques rapides couplées à la désensibilisation du récepteur ont rendu la caractérisation des courants $\alpha 7$ complexe. En effet, les systèmes d'application pharmacologiques induisent une augmentation progressive de la concentration en acétylcholine au

niveau des récepteurs et par conséquent un certain pourcentage des récepteurs est déjà désensibilisé avant que le courant atteigne son amplitude maximale. Ce taux de récepteurs désensibilisés est évidemment positivement couplé à la concentration d'acétylcholine testée. Une évaluation de l'EC50 du récepteur humain exprimé de façon stable dans la lignée cellulaire HEK-293 suggère des concentrations d'environ 49 μM pour la nicotine et 155 μM pour l'acétylcholine (Gopalakrishnan et al., 1995). Néanmoins, les lignées HEK sont sensibles à la pression mécanique ce qui requiert une application pharmacologique lente. Une étude ultérieure menée sur des ovocytes de xénope permet de limiter les effets de désensibilisation et suggère que les valeurs précédentes d'EC50 mesurées en HEK sont surestimées d'un facteur 5 à 10. Dans leur système, en effet, l'EC50 serait d'environ 37 μM pour l'acétylcholine (Papke and Thinschmidt, 1998). Plus récemment, l'utilisation de constructions chimériques contenant la région N-terminal d' $\alpha 7$ et les régions transmembranaires et C-terminale du récepteur à la sérotonine 5-HT3 a permis de confirmer un EC50 d'environ 30 μM (Craig et al., 2004). Il est communément admis que la cinétique de descente du courant $\alpha 7$ est modulée par la désensibilisation rapide des récepteurs. En effet, l'application d'acétylcholine sur des récepteurs $\alpha 7$ en système hétérologue montre que la phase de descente commence avant la fin de l'application (Gopalakrishnan et al., 1995). Néanmoins, dans le cas des applications d'acétylcholine très brèves et en particulier dans le cas de l'activation des récepteurs $\alpha 7$ par la libération d'acétylcholine endogène, on observe une cinétique de descente plus rapide que celles mesurées en HEK : de l'ordre de 15-20 ms en HEK contre 3-5 ms au niveau de la synapse nicotinique de la couche I (Gopalakrishnan et al., 1995, Arroyo et al., 2012). La question d'une descente modulée par la désensibilisation ou par la désactivation des récepteurs dans le cas de la transmission synaptique reste donc ouverte.

Les propriétés cinétiques sont conférées par les acides aminés présents dans le pore du canal et qui appartiennent au segment M2. Ainsi, la thréonine placée en position 245 est cruciale, cet acide aminé ne se retrouve que dans les sous-unités formant des récepteurs homomériques et est remplacé dans les autres sous-unités de type α et β par une sérine. L'application d'acétylcholine sur un système hétérologue exprimant le mutant d' $\alpha 7$ T245S induit des courants beaucoup plus amples qu'en présence de la version sauvage d' $\alpha 7$. De plus, la mutation induit une constante de *decay* plus de dix fois supérieure à celle de la version non-mutée (Criado et al., 2011). Le récepteur $\alpha 7$ présente également une très forte rectification entrante. La même mutation T245S semble abolir cette rectification (Criado et al., 2011).

L'utilisation de bungarotoxine- α (α -BGT) radioactive a permis de montrer qu' $\alpha 7$ est distribuée de façon ubiquitaire dans l'ensemble du cerveau, mais avec des taux plus élevés dans le cortex, l'hippocampe, l'amygdale, l'hypothalamus, le bulbe olfactif et le noyau supra-optique (Séguéla et al., 1993).

Au niveau subcellulaire, le récepteur $\alpha 7$ est exprimé principalement en post-synaptique. On le retrouve ainsi exprimé dans les interneurons GABAergiques à VIP dans le néocortex ou l'hippocampe mais pas dans les interneurons FS ni dans les neurones pyramidaux. Dans l'aire tegmentale ventrale (VTA), une aire mésencéphalique dopaminergique impliquée dans l'addiction à la nicotine, la sous-unité $\alpha 7$ a également été observée sur les axones glutamatergiques au niveau des terminaisons présynaptiques ou en pérисynaptique. Dans cette structure, on a donc une modulation $\alpha 7$ présynaptique des afférences glutamatergiques mais aussi somatique des neurones dopaminergiques et GABAergiques (Jones and Wonnacott, 2004).

Enfin, les récepteurs $\alpha 7$ auraient un rôle majeur dans la stimulation de l'activité cognitive et dans la formation de la mémoire. L'utilisation d'animaux *knock-out* (KO) pour $\alpha 7$ ainsi que l'activation spécifique de ces récepteurs montrent que la modulation $\alpha 7$ au niveau de l'hippocampe agirait sur les processus d'attention et de mémoire de travail. Ainsi l'utilisation d'agonistes spécifiques d' $\alpha 7$ ou de modulateurs allostériques positifs améliore les déficits cognitifs associés à la maladie d'Alzheimer (Taly et al., 2009). Il a récemment été suggéré qu'une liaison directe et spécifique d' $\alpha 7$ à la protéine Tau serait la base moléculaire de l'action de ces agonistes.

Les récepteurs hétéromériques $\alpha 4\beta 2$

Les récepteurs $\alpha 4\beta 2$ et $\alpha 4\alpha 5\beta 2$ sont bloqués par le DH β E (dihydro- β -érythroïdine), un alcaloïde extrait de la graine *Erythrina*. C'est un antagoniste non-spécifique des $\alpha 4\beta 2$ car il cible aussi la sous-unité $\alpha 3$ qui n'est pas exprimée dans le néocortex mais il agit peu sur $\alpha 7$.

Les récepteurs nicotiques étant pentamériques, il existe deux stœchiométries pour les récepteurs de type $\alpha 4\beta 2$: $2 \alpha 3 \beta$ et $3 \alpha 2 \beta$. Les récepteurs contenant 2 sous-unités α ne présentent que deux sites de liaison à l'acétylcholine contrairement à l'isoforme contenant 3 α qui a potentiellement 3 sites de liaison à l'acétylcholine. Ces deux récepteurs ont des propriétés de sensibilité à l'acétylcholine et de désensibilisation différentes, l'isoforme à 2 α étant considéré comme l'isoforme à haute sensibilité (HS) et celle à 3 α l'isoforme à faible sensibilité (LS ; Figure I.17C). Néanmoins, on peut considérer que par rapport au récepteur homomérique $\alpha 7$, les récepteurs $\alpha 4\beta 2$ sont des récepteurs à haute affinité (Figure I.17B). Contrairement au récepteur $\alpha 7$, la cinétique de désensibilisation des récepteurs $\alpha 4\beta 2$ est relativement lente ce qui permet de déterminer en système hétérologue les EC50 et les cinétiques des courants $\alpha 4\beta 2$. Néanmoins, la co-existence des deux stœchiométries complique cette évaluation. Afin d'estimer ces cinétiques, une chimère des sous-unités $\alpha 4$ ou $\beta 2$ contenant l'insertion d'un résidu hydrophobe à la position L9'T du 2^{me} segment transmembranaire a été exprimée en système hétérologue.

Cette mutation permet d'évaluer le nombre de résidus $\alpha 4$ ou $\beta 2$ présents dans les récepteurs (Labarca et al., 1995). Ainsi, l'EC50 évalué pour le récepteur $\alpha 4\beta 2$ HS est de 1-4 μM contre environ 70-90 μM pour la forme LS (Nelson et al., 2003, Moroni et al., 2006).

Les récepteurs $\alpha 4\beta 2$ présentent une très forte rectification entrante pour les potentiels positifs qui est due à la forte concentration de spermine intracellulaire dans les neurones (Haghighi and Cooper, 1998). La structure du pore du récepteur $\alpha 4\beta 2$ contient deux anneaux chargés négativement situés du côté intracellulaire. La mutagenèse dirigée des résidus du pore le plus interne montre que les acides glutamiques formant cet anneau sont impliqués à la fois dans l'interaction avec les polyamines intracellulaires qui sont responsables de la très forte rectification entrante mais également dans la perméabilité au calcium (Haghighi and Cooper, 2000).

À l'instar de $\alpha 7$, le récepteur $\alpha 4\beta 2$ est exprimé principalement en post-synaptique. On le retrouve ainsi exprimé par les interneurons GABAergiques à VIP et à SOM dans le néocortex ou l'hippocampe mais pas dans les interneurons FS, on observe également une expression ubiquitaire d' $\alpha 4\beta 2$ par les neurones pyramidaux de la couche VIa et polymorphes de la couche VIb. L'expression des différentes isoformes d' $\alpha 4\beta 2$ dans les différentes structures cérébrales est encore très mal connue. L'évaluation de l'assemblage spontané de ces récepteurs en système hétérologue suggère que l'isoforme LS est la plus courante (Nelson et al., 2003). Néanmoins, la même étude suggère que la stœchiométrie évolue en fonction des environnements, en effet l'incubation des cellules HEK exprimant $\alpha 4\beta 2$ en présence de nicotine augmente la proportion de l'isoforme HS. Dans le système nerveux central, une étude récente suggère que l'isoforme LS est exprimée à la synapse entre le motoneurone et la cellule de Renshaw (Lamotte d'Incamps et al., 2012). En revanche, dans le cortex ou le NRT, la cinétique très lente de *decay* des courants $\alpha 4\beta 2$ laisse plutôt supposer une expression majoritaire de l'isoforme HS.

La sous-unité $\alpha 5$ dans les récepteurs hétéromériques $\alpha 4\beta 2$

Si certaines sous-unités sont indispensables à la formation d'un canal fonctionnel, comme par exemple les sous-unités $\alpha 4$ et $\beta 2$ dans le cas du récepteur $\alpha 4\alpha 5\beta 2$, la sous-unité $\alpha 5$, elle, n'y est pas nécessaire et est pour cette raison nommée sous-unité accessoire. De plus, du fait de la substitution d'une tyrosine par un acide aspartique dans la poche de liaison de l'agoniste, $\alpha 5$ ne peut former ni canal homomérique fonctionnel ni se lier uniquement avec des sous-unités de type β . Par conséquent, elle entre dans la composition de récepteurs hétéromériques de type $\alpha\beta$ dont elle module les propriétés biophysiques. Elle s'insère principalement dans les récepteurs de type $\alpha 4\beta 2$ et $\alpha 3\beta 4$ où elle augmente significativement les taux de désensibilisation (Ramirez-Latorre et al., 1996, Wang et al., 1996, Groot-Kormelink

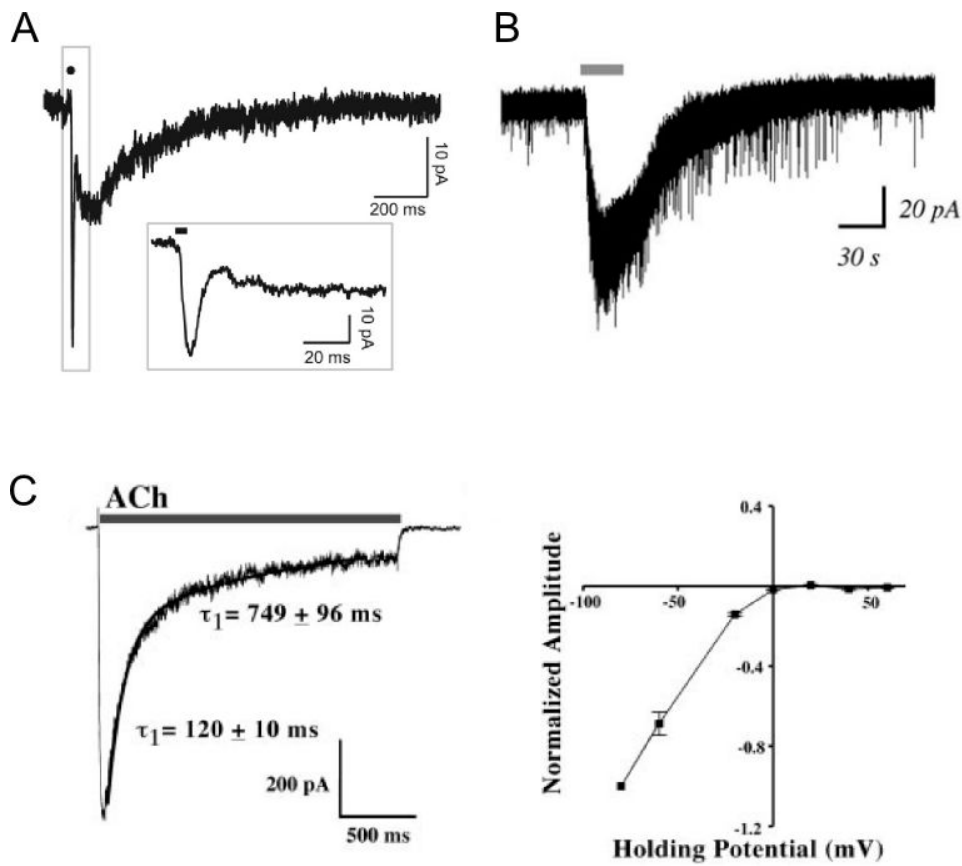


FIGURE I.17 – Cinétique des courants $\alpha 4\beta 2$ et $\alpha 7$. **A.** Courants $\alpha 7$ à basse affinité et cinétique rapide et $\alpha 4\beta 2$ à haute affinité et cinétique lente induit par photostimulation des fibres cholinergiques en couche I du néocortex. *D'après Arroyo et al., 2012.* **B.** Courant $\alpha 4\beta 2$ induit par application d'acétylcholine en couche VI. *D'après Kassam et al., 2008.* **C.** Application d'acétylcholine sur un ovocyte exprimant les sous-unité $\alpha 4$ et $\beta 2$. On observe un *decay* bi-exponentiel dont la composante lente correspond au courant HS et la réponse au courant LS. Le courant $\alpha 4\beta 2$ présente une très forte rectification entrante. *D'après Nelson et al., 2003*

et al., 2001). L'enregistrement unitaire des courants $\alpha 4\alpha 5\beta 2$ et $\alpha 4\beta 2$ montre que la sous-unité $\alpha 5$ augmente également la conductance unitaire du canal (de 25 à 45 pS). De plus, en présence de nicotine à faible concentration, la probabilité d'ouverture du canal $\alpha 4\alpha 5\beta 2$ est augmentée transitoirement par rapport au récepteur $\alpha 4\beta 2$ mais elle diminue ensuite rapidement suggérant une désensibilisation des récepteurs $\alpha 4\alpha 5\beta 2$ (Ramirez-Latorre et al., 1996). Cependant, la désensibilisation des récepteurs $\alpha 4\alpha 5\beta 2$ a été mis en tranche, où l'application longue de nicotine induit une désensibilisation plus faible des récepteurs $\alpha 4\beta 2$ chez les ani-

maux sauvage (WT) que chez les animaux $\alpha 5$ KO (Bailey et al., 2010). Néanmoins, des résultats publiés récemment montrent que dans la couche VI du néocortex, la sous-unité $\alpha 5$ augmente la sensibilité à la nicotine et par conséquent le taux de récepteur désensibilisé en présence de concentration submicromolaire de nicotine, ce qui est cohérent avec les données obtenues en système hétérologue (Poorthuis et al., 2013).

La sous-unité $\alpha 5$ a été impliquée dans divers processus physiologiques et pathologiques. Ainsi, les souris $\alpha 5$ KO présenteraient des troubles de l'attention, qui seraient dus à l'absence d' $\alpha 5$ dans le cortex préfrontal (Bailey et al., 2010). De plus, l'utilisation de la même souris KO pour $\alpha 5$ a permis de montrer un rôle de cette sous-unité dans la mise en place de l'aversion aux doses fortes de nicotine (Frahm et al., 2011, Morel et al., 2013). Néanmoins, ces deux études s'opposent sur la structure impliquée dans cette aversion. Pour Frahm et collaborateurs, l'expression d' $\alpha 5$ dans l'habenula médiane serait primordiale tandis que pour Morel et collaborateurs, la nicotine affecterait principalement les neurones dopaminergiques de la VTA.

Enfin, la séquence nucléique de la sous-unité $\alpha 5$ présente des polymorphismes dont le polymorphisme D398N qui a été impliqué dans l'incidence de cancers du poumon. Le mécanisme communément admis est que ce polymorphisme diminue la sensibilité des récepteurs $\alpha 4\alpha 5\beta 2$ à la nicotine, ce qui incite les fumeurs possédant cette mutation à fumer environ 3 fois plus qu'un fumeur classique pour atteindre la même satiété (Kuryatov et al., 2011, Morel et al., 2013). Néanmoins, des résultats d'épidémiologie récents indiquent que la susceptibilité au cancer du poumon est également augmentée chez les porteurs de la mutation ne fumant pas, suggérant un rôle direct de la sous-unité $\alpha 5$ au niveau de l'épithélium du poumon où elle est exprimée (Tournier and Birembaut, 2011, Kraiss et al., 2011).

Expression des récepteurs nicotiques dans le néocortex

Les récepteurs homomériques $\alpha 7$ et les récepteurs hétéromériques contenant les sous-unités $\alpha 4$, $\beta 2$ et parfois la sous-unité accessoire $\alpha 5$ ne sont pas exprimés de façon ubiquitaire mais ciblent des types neuronaux particuliers.

En particulier, deux couches corticales présentent une sensibilité ubiquitaire aux agonistes nicotiques : la couche I et la couche VI. Dans les autres couches, la sensibilité nicotinique est restreinte à certains types neuronaux et elle peut également varier au cours du développement.

Les interneurons de la couche I, neurogliaformes et bipolaires, présentent une sensibilité généralisée à l'acétylcholine. La pharmacologie et les expériences de single cell RT-PCR montrent que ces interneurons expriment le récepteur homomérique $\alpha 7$ et le récepteur hétéromérique $\alpha 4\beta 2$ (Figure I.17A ; Christophe et al., 2002, Arroyo et al., 2012, Bennett et al., 2012). La photostimulation des fibres

cholinergiques montre néanmoins qu'environ un tiers des neurones de la couche I ne présentent qu'une réponse $\alpha 4\beta 2$ lente, un tiers ne présentent qu'une réponse $\alpha 7$ rapide et le dernier tiers présentent une réponse biphasique (Arroyo et al., 2012 et Publication 3). De plus, si les réponses $\alpha 4\beta 2$ sont stables dans le temps, les réponses $\alpha 7$, elles, sont très variables.

Les neurones de la couche VI présentent également une réponse généralisée à l'acétylcholine. Les neurones glutamatergiques, pyramidaux dans la couche VIa et de morphologie diverse dans la couche VIb, expriment les récepteurs hétéromériques $\alpha 4\beta 2$ (Figure I.17B; Kassam et al., 2008). La sensibilité nicotinique des interneurons GABAergiques n'a pas été caractérisée, mais nos résultats de scRT-PCR sur les interneurons de la couche VIb indiquent qu'ils coexpriment le récepteur homomérique $\alpha 7$ et le récepteur hétéromérique $\alpha 4\beta 2$ (Hay et al., 2014). Ces interneurons présentent donc un comportement similaire à ceux de la couche I. Les neurones de la couche VI expriment également la sous-unité accessoire $\alpha 5$. Néanmoins, cette expression est assez transitoire avec un pic au cours de la deuxième semaine post-natale suivie d'une régression rapide jusqu'à environ 20% du niveau maximal à l'âge adulte (Winzer-Serhan and Leslie, 2005).

Dans les autres couches, on observe une expression des récepteurs $\alpha 4\alpha 5\beta 2$ dans les interneurons à VIP mais pas dans les interneurons FS (Porter et al., 1999). Enfin, dans le cortex préfrontal, la sous-unité $\alpha 7$ est exprimée par les pyramides de la couche V, propriété qu'on n'observe pas dans les autres cortex, en particulier dans le cortex somatosensoriel.

5 | Orexine : éveil et attention

L'orexine ou hypocretine : découverte et premiers rôles physiologiques

Un neuropeptide synthétisé dans l'hypothalamus

L'hypothalamus joue un rôle fondamental dans les homéostasies endocriniennes et autonomes. Il est constitué d'une confédération de noyaux qui régulent un large éventail d'activités comportementales et physiologiques via, entre autres, une signalisation peptidergique. L'orexine, ou hypocretine, a été découverte en parallèle et publiée à un mois d'intervalle de façon indépendante par les équipes de Sutcliffe et Yanagisawa (de Lecea et al., 1998, Sakurai et al., 1998). Dans l'équipe de Sutcliffe, c'est l'étude des gènes préférentiellement exprimés dans l'hypothalamus qui a permis de découvrir l'ARNm précurseur des deux orexines, nommé préprohypocretine (Figure I.18). Les orexines A et B, composées de 28 et 33 acides aminés respectivement, présentent environ 60% d'homologie de séquence et sont apparentées à la famille des sécrétines, produites dans le tube digestif. Leur synthèse intervient tardivement au cours du développement puisqu'ils ne sont pas décelables avant P15 (de Lecea et al., 1998). Les neurones synthétisant l'orexine sont répartis de façon diffuse dans l'hypothalamus dorsal dont ils ne représentent pas plus de 10% de la population neuronale. Cette structure possède d'autres populations de neurones, dont une totalement dissociée qui libère la *melanin-concentrating hormone* et dont l'activité au cours du cycle veille-sommeil est en total opposition avec celle des neurones à orexine (Bayer et al., 2002b, Hassani et al., 2009).

L'observation par microscopie électronique des terminaisons axoniques des neurones à orexine révèle la présence de différenciations synaptiques asymétriques. Ces synapses contiennent 2 à 8 vésicules larges granulaires par plan de coupe et parfois dans certains boutons des petites vésicules agranulaires suggérant une libération vésiculaire synaptique du peptide (de Lecea et al., 1998).

Récepteurs à l'orexine et projections des neurones à orexine

L'équipe de Yanagisawa a identifié les orexines A et B à partir de deux récepteurs orphelins couplés aux protéines G qui sont exprimés dans un grand nombre de structures du cerveau (Sakurai et al., 1998). L'activation des récepteurs à l'orexine, OX1R et OX2R entraîne une dépolarisation des neurones. Dans la couche VIB et dans le thalamus non-spécifique, cette dépolarisation est sous-tendue via l'activation de deux types de protéines G, G_{i/G_o} ou $G_{q/11}$, par la fermeture d'une conductance potassique (Figure I.18 et Bayer et al., 2002a, 2004). Plusieurs autres mécanismes ont été impliqués dans le courant orexinergique comme l'ouverture d'une conductance cationique non spécifique qui pourrait être due aux canaux TRPC (Burlet et al., 2002). L'activation des canaux responsables du courant I_h , qui sont des canaux sensibles au voltage (HCN) a également été envisagée dans le cas de la dépolarisation des dendrites apicales des neurones pyramidaux du cortex préfrontal (Li et al., 2010). Les récepteurs OX1R et OX2R présentent des affinités différentes pour l'orexine A et B. OX1R est spécifique de l'orexine A avec une affinité d'environ 30 nM pour l'orexine A contre 2500 nM pour l'orexine B, tandis que OX2R présente des affinités similaires pour les deux neuropeptides (~ 30 nM).

Ces récepteurs sont largement distribués dans le cerveau avec une organisation topographique précise qui recoupe l'ensemble des aires de projection des fibres orexinergiques. Les principales cibles des afférences orexinergiques sont les structures monoaminergiques : locus coeruleus (LC, noradrénaline), noyau tubéromammillaire (NTM, histamine), raphé dorsal (DR, sérotonine) ainsi que les noyaux cholinergiques : noyaux basaux, LDTg et PPTg, l'amygdale, certains noyaux thalamiques et des sous-régions corticales (Figure I.19). Ces différents noyaux expriment différenciellement les récepteurs OX1R et OX2R. En particulier le DR et le LC expriment exclusivement OX1R tandis que le noyau accumbens, le thalamus ou le cortex expriment très majoritairement OX2R (Trivedi et al., 1998). Enfin, dans les noyaux cholinergiques, les deux récepteurs sont exprimés, mais sur des cibles cellulaires différentes : OX1R sur les neurones cholinergiques et les deux récepteurs sur les autres types neuronaux. La répartition topographique des récepteurs à orexine a très probablement un rôle physiologique mais celle-ci est encore mal connue.

OX2R est exprimé de façon spécifique dans certains noyaux du thalamus non-spécifique comme les noyaux paraventriculaires, parafasciculaire, centrolatéral, rhomboïde ou centromédian qui reçoivent des projections des neurones à orexine (Trivedi et al., 1998, Lee et al., 2005, Govindaiah and Cox, 2006, Huang et al., 2006). En revanche, les noyaux du thalamus spécifique, dont les neurones n'expriment ni OX1R ni OX2R, ne reçoivent pas d'afférences orexinergiques et l'application à orexine n'a pas d'effet sur ces neurones (Bayer et al., 2002b). Dans le néocortex, OX2R est exprimé spécifiquement dans la couche VIB, dont les neurones sont dépolarisés par l'application d'orexine, à l'inverse des neurones des couches su-

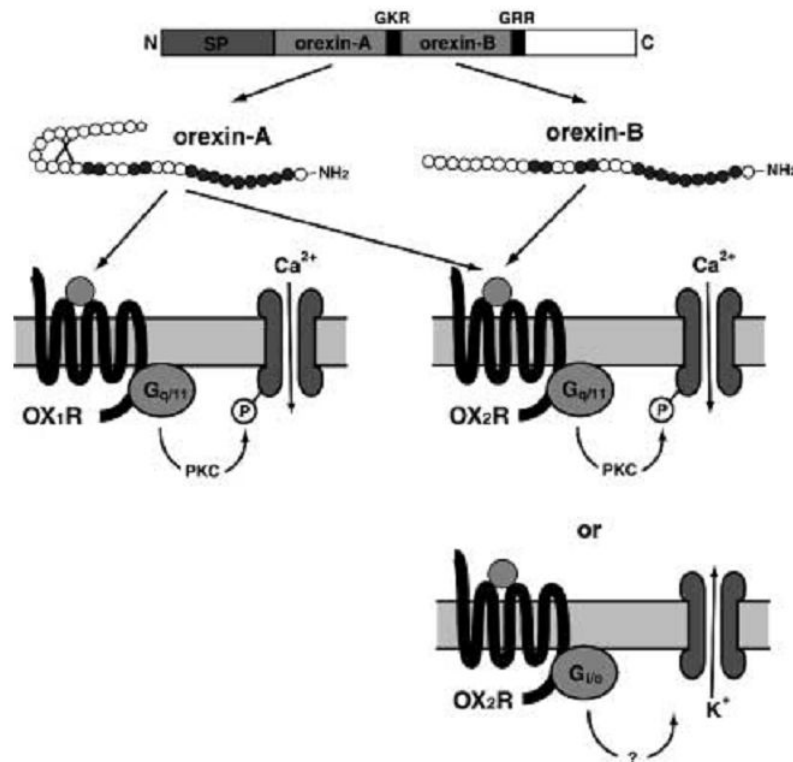


FIGURE I.18 – De la pré-orexine à la liaison de l’orexine sur son récepteur couplé aux protéines G. *D’après Beuckmann and Yanagisawa, 2002*

périeures (Trivedi et al., 1998, Bayer et al., 2004). Certains auteurs ont suggéré l’existence de récepteurs pré-synaptiques sur les afférences thalamocorticales dans le cortex préfrontal mais ces résultats n’ont pas été confirmés dans l’ensemble des aires corticales (Lambe and Aghajanian, 2003).

De la régulation de l’appétit à la narcolepsie

Les neurones à orexine étant ségrégués dans l’hypothalamus dorsal, une région impliquée dans le contrôle de l’appétit, l’équipe de Yanagisawa a tout d’abord testé l’implication de l’orexine dans les comportements alimentaires (Sakurai et al., 1998). Chez la souris, l’injection d’orexine dans les ventricules latéraux entraîne une augmentation de la prise alimentaire, confirmant cette hypothèse. C’est à l’issue de cette expérience que l’orexine reçoit ce nom qui en grec signifie appétit (*orexis*). Néanmoins, une étude ultérieure indique que la prise totale de nourriture sur la journée est inchangée, l’augmentation temporaire de la prise alimentaire n’étant associée qu’à une augmentation temporaire de l’activité de la souris (Ida et al.,

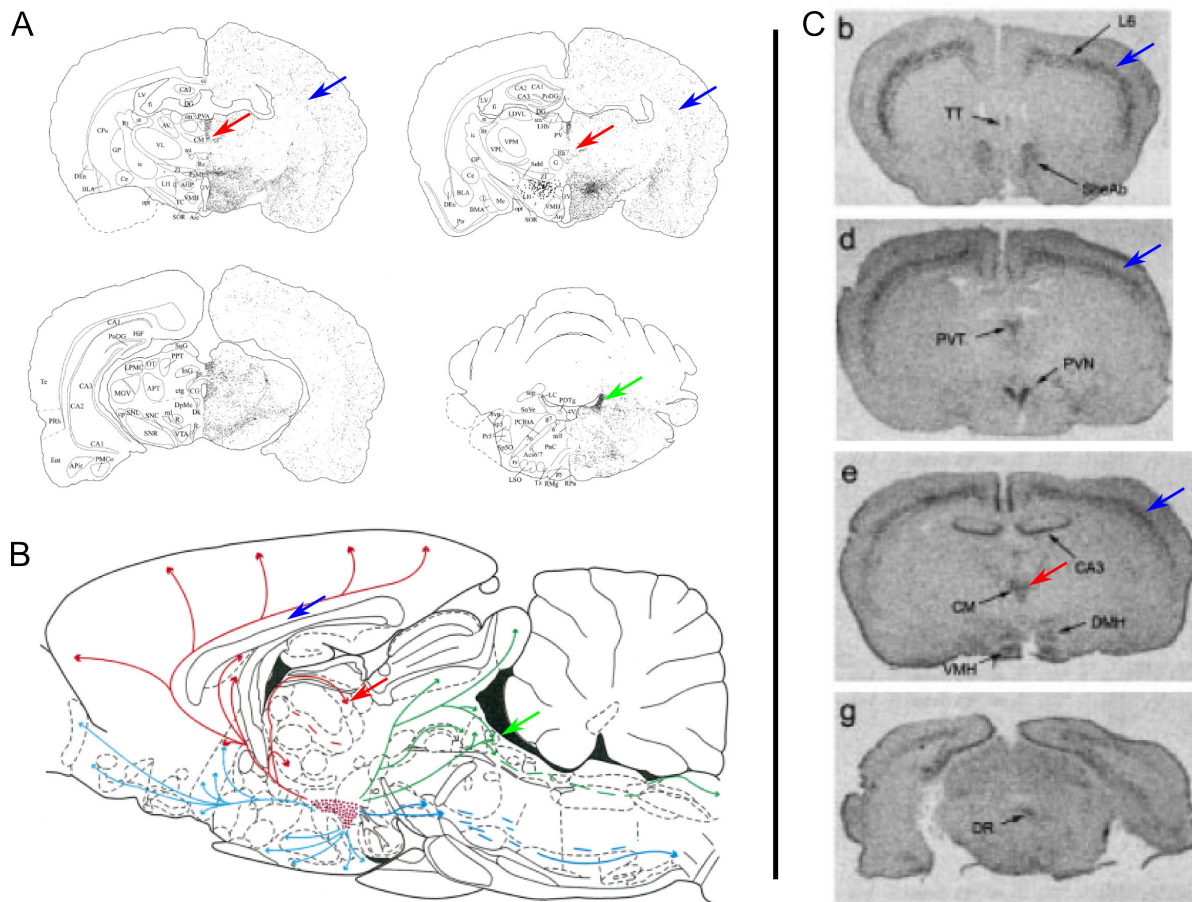


FIGURE I.19 – **A et B.** Projections des fibres orexinergiques en coupes coronales (**A**) et schéma récapitulatif en coupe sagittale (**B**). *D'après Peyron et al., 1998.* **C.** Répartition des ARNm du récepteur ox2r. Flèches : **couche VIb**, **noyaux centromédian et rhomboïde du thalamus** et **locus coeruleus**. *D'après Trivedi et al., 1998.*

1999).

L'hypothalamus a également une activité périodique qui fluctue avec le rythme circadien et dès la fin de l'année 1998, un lien entre l'orexine et la narcolepsie, une maladie pouvant dans certains cas présenter un caractère héréditaire récessif était établi par les généticiens. La narcolepsie, dont l'incidence de l'ensemble du spectre est de 1/2000, se caractérise par des assoupissements, des entrées pathologiques dans le sommeil paradoxal (pendant la période d'éveil ou à des moments inattendus du cycle de sommeil) ou encore dans certains cas graves des crises de cataplexie, souvent associées à des émotions fortes.

Une lignée de chiens dobermann, étudiée bien avant la découverte de l'orexine,

présente des symptômes de narcolepsie sévère. Les études génétiques avaient conclu à une mutation dans une région du chromosome 6 dans la région du gène CANARC-1 qui avait donnée son nom à la lignée. En affinant leur recherche par la technique du *positional cloning*, l'équipe d'Emmanuel Mignot a finalement montré que la mutation affectait le gène du récepteur 2 à l'orexine (OX2R, Lin et al., 1999). Plus récemment, il a été montré que deux modifications de séquence, une en amont de l'exon 4 et une à la terminaison de l'exon 6 causaient une délétion de ces deux exons dans l'ARNm, empêchant ainsi la synthèse de la protéine. Dans le même temps, l'étude de la souris KO pour l'orexine montre que ces souris ont un phénotype comportemental et un électroencéphalogramme similaire à celui observé chez les chiens canarc-1 et chez les patients narcoleptiques (Chemelli et al., 1999). Ils observent également que l'application du modafinil, un médicament utilisé dans le traitement de la narcolepsie mais aux cibles mal connues, active les neurones à orexine (Chemelli et al., 1999).

Les cas de narcolepsie génétique sont cependant rares et les quelques cas illustrés présentent une forme très handicapante de narcolepsie précoce avec de nombreux épisodes de catalepsie, des paralysies du sommeil très prononcées et des hallucinations hypnagogiques (Peyron et al., 2000). Les autres formes de narcolepsie qui apparaissent en général vers l'adolescence seraient dues à une réaction auto-immune conduisant à la destruction des neurones à orexine. En effet, 95% des patients possèdent une prédisposition génétique influencée par le sous-type HLA : DQB1*0602. De plus, l'hybridation *in situ post mortem* montre que le transcrit de la préprohypocrétine est absent dans l'hypothalamus latéral des patients narcoleptiques. L'hypothalamus latéral ne comprenant que 15000 à 20000 neurones à orexine répartis dans l'ensemble de la structure, cette dégradation s'accompagne pas d'une gliose importante, c'est pourquoi elle est longtemps passée inaperçue. Le dosage de l'orexine présent dans les fluides cérébraux montre également une très faible concentration d'orexine dans le cerveau des patients par rapport aux sujets sains (Peyron et al., 2000).

Une étude publiée en 2003 par l'équipe de Yanagisawa et Sakurai tente de concilier les deux rôles de l'orexine en constatant qu'une portion des neurones à orexine est sensible à la concentration de glucose extra-cellulaire et les auteurs proposent que ces neurones réguleraient l'éveil en fonction de la balance énergétique (Yamanaka et al., 2003). Bien qu'aujourd'hui on considère principalement l'orexine dans le cadre de la modulation des cycles veille-sommeil, il faut garder en tête que les souris orexine KO ont des troubles du métabolisme et présentent des symptômes d'obésité et d'hypométabolisme.

Rôle de l'orexine dans le cycle veille-sommeil

Le rythme veille-sommeil

Le cycle veille-sommeil se décompose en trois phases principales chez le rongeur : l'éveil, le sommeil paradoxal ou *rapid eye movement* (REM) et le sommeil profond à ondes lentes ou non-REM (SWS). Le sommeil à ondes lentes est subdivisé chez l'Homme en quatre phases qui correspondent schématiquement à des sommeils plus ou moins profonds. A l'inverse, le sommeil REM est caractérisé par une activité cérébrale intense et une atonie musculaire. Deux phases de transition ont également été décrites ; l'une nommée t-SWS délimite la phase entre l'éveil et le SWS, tandis que l'autre nommée t-REM est la phase de transition entre le SWS et le REM.

Les rythmes veille-sommeil sont gouvernés par des structures dites *wake-ON*, *sleep-OFF* et d'autres dites *wake-OFF*, *sleep-ON*. Parmi les structures *wake-ON*, *sleep-OFF*, on compte les noyaux monoaminergiques : locus coeruleus, raphé dorsal et noyau tubéromammillaire, mais aussi les noyaux cholinergiques basaux et du mésencéphale (PPTg et LDTg) et les neurones à orexine. Dans la seconde catégorie, on trouve principalement le VLPO.

Les structures *wake-ON*, *sleep-OFF* sont globalement actives le jour et silencieuses la nuit, même si certaines comme les noyaux cholinergiques présentent également une activité pendant le sommeil paradoxal.

De la modulation de l'architecture du sommeil à la modulation des états d'attention

L'application d'orexine ou l'utilisation d'animaux KO pour l'orexine ou ses récepteurs entraîne des modifications de l'architecture du sommeil. L'injection d'orexine A en intra-cérébro-ventriculaire (ICV) induit une augmentation de l'activité locomotrice ainsi qu'une augmentation des périodes d'éveil chez la souris sauvage quand l'injection est effectuée au début de la période de sommeil (Hagan et al., 1999). L'étude des différents KO du système orexinergique : orexine KO, obtenu en modifiant le gène codant la préprorexine, OX1R KO et OX2R KO a permis de disséquer finement ces dérèglements. On observe dans les trois cas une fragmentation du sommeil, une absence de sommeil REM et des éveils moins longs que chez le KO (Figure I.20 et Chemelli et al., 1999, Diniz Behn and Booth, 2010, Mieda and Sakurai, 2011). Néanmoins, les symptômes sont notablement moins marqués chez le mutant du récepteur OR1X que chez celui du récepteur OR2X ou chez l'orexine KO. On observe en particulier que les KO orexine passent plus de temps dans un état de transition entre l'éveil et le sommeil SWS (Diniz Behn and

Booth, 2010).

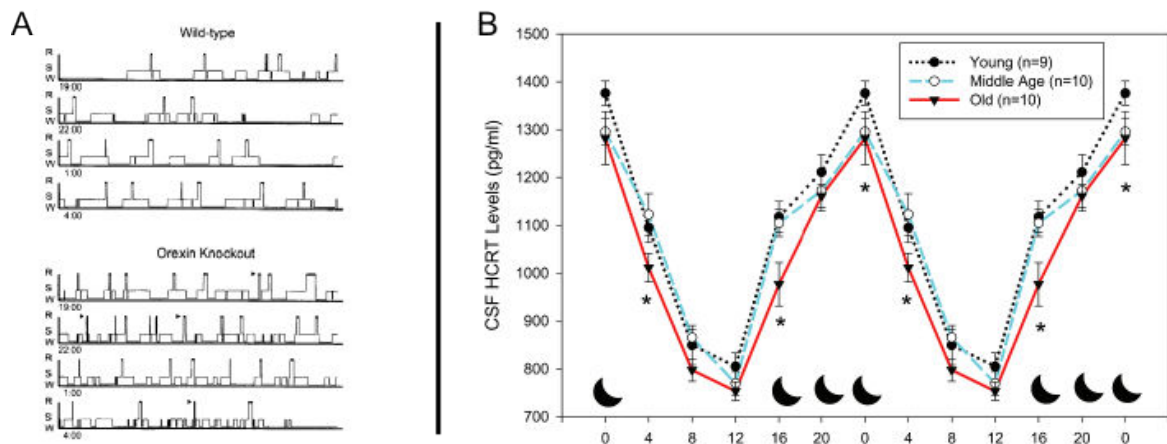


FIGURE I.20 – **A.** Architecture des états de veille-sommeil chez la souris sauvage et le KO orexine. On peut observer une fragmentation du sommeil et une augmentation du sommeil REM. *D’après Chemelli et al., 1998.* **B.** Sécrétion d’orexine au cours du cycle circadien. Noter que le taux d’orexine est maximum pendant la nuit ce qui correspond à la période d’éveil de la souris. *D’après Desarnaud et al., 2004.*

Plus récemment, le développement des outils d’optogénétique a permis d’agir directement sur le système orexinergique *in vivo*. Le domaine de recherche sur l’orexine est depuis toujours à la pointe en matière de développement des outils génétiques. Dès 2000, on disposait des principales lignées de souris KO : orexine, OX1R, OX2R, puis l’équipe de Sakurai a développé une lignée rapportrice chez laquelle l’orexine est fusionnée à une protéine fluorescente (GFP, Yamanaka et al., 2003). Enfin la première étude utilisant l’optogénétique pour répondre à une question biologique a porté sur la régulation du cycle veille-sommeil par l’orexine. Pour cette étude, l’équipe de L. de Lécéa a injecté un lentivirus contenant le gène de la channelrhodopsine sous le promoteur de la prépro-orexine dans l’hypothalamus latéral (Adamantidis et al., 2007). Plus récemment encore, une lignée exprimant de façon constitutive la version inhibitrice de la channelrhodopsine, l’halorhodopsine (hRP), dans les neurones orexinergiques a été développée (Tsunematsu et al., 2011). Ces études montrent que la photostimulation des neurones à orexine augmente la probabilité d’avoir une transition sommeil-éveil que l’on parte du sommeil REM ou du SWS (Carter et al., 2009) alors que l’inhibition des neurones promeut le SWS (Tsunematsu et al., 2011).

L’influence de l’orexine sur le cycle circadien a également été étudiée par la mesure directe de l’activité des neurones à orexine au cours du temps. Initialement, la quantification de l’expression du marqueur d’activité neuronale cFOS a montré que le nombre de cellules à orexine actives doublait la nuit pendant la période

d'activité de la souris (Estabrooke et al., 2001). Cette augmentation de marquage touche particulièrement l'aire périfornicale et l'hypothalamus médian, la partie la plus latérale ne présentant pas de variation d'activité au cycle circadien. Ces résultats corroborent l'hypothèse de Abrahamson et Moore qui supposent une organisation topographique des neurones à orexine avec des rôles physiologiques différents (Abrahamson and Moore, 2001). On aurait alors ici une spécialisation des neurones de l'aire périfornicale dans le contrôle du cycle veille-sommeil. Enfin, cette étude montre que la déprivation de sommeil entraîne une forte augmentation de marquage des neurones dans la période de sommeil, semblant indiquer que le réseau orexinergique répond au déséquilibre homéostatique par une aide au maintien de l'éveil. Plus récemment, par enregistrement électrophysiologique chez le rat vigile à la tête fixée et par double marquage biocytine et orexine, l'équipe de B. Jones a montré une activité régulière (environ 3 Hz) des neurones à orexine pendant l'éveil actif, caractérisé par un important tonus musculaire et un rythme d'oscillations θ soutenu. En revanche, en éveil passif, cette activité chute en dessous de 1 Hz et les neurones sont virtuellement silencieux pendant les périodes de sommeil (REM et SWS, Lee et al., 2005).

L'activité des neurones à orexine est soumise à des régulations des nombreuses et redondantes structures impliquées dans le contrôle des cycles. Ainsi, comme nous l'avons évoqué précédemment, certaines régions dont les neurones libèrent principalement des neuromodulateurs comme les monoamines ont une activité qui dépend fortement du cycle circadien. Or ces structures sont toutes inter-connectées donc s'influencent réciproquement. En particulier, les neurones à orexine reçoivent des projections des structures *wake-ON*, *sleep-OFF* et *wake-OFF*, *sleep-ON*. Parmi les substances libérées par les structures *wake-OFF*, *sleep-ON*, on notera que l'adénosine a un effet inhibiteur marqué sur les neurones à orexine (Liu and Gao, 2007).

En contrepartie, les neurones à orexine agissent également sur les différents noyaux impliqués dans l'éveil. Les deux cibles principalement étudiées sont les neurones noradrénergiques du LC et les neurones histaminergiques du NTM dont nous avons vu précédemment qu'ils expriment respectivement OX1R et OX2R (Hagan et al., 1999, Bourgin et al., 2000, Eriksson et al., 2001). Le LC est une région clé dans la modulation des états d'attention et du cycle veille-sommeil. En effet, inactifs pendant le sommeil, les neurones noradrénergiques et histaminergiques déchargent pendant l'éveil et le sommeil REM. Récemment, une étude d'optogénétique menée par Carter et collaborateurs a confirmé que la stimulation spécifique des neurones orexinergiques entraîne une activation du NTM et du LC (marquage c-FOS) qui pourrait soutenir la transition sommeil-éveil (Carter et al., 2009). De la même façon, Diniz-Behn et collaborateurs décrivent un modèle dans lequel les neurones à orexine, en activant les centres promoteurs de l'éveil empêchent la fragmentation du sommeil et permettent le maintien de l'éveil

(Diniz Behn et al., 2008).

Enfin, l'activité des neurones à orexine est soumise à des contraintes environnementales. Nous avons ainsi précédemment vu que la déprivation de sommeil entraînait une augmentation du marquage c-FOS dans les neurones à orexine (Estabrooke et al., 2001). Il semble également que l'âge de l'individu joue sur la libération d'orexine puisque la concentration d'orexine est inférieure de 10% à chaque instant du cycle chez le sujet âgé, ce qui d'après les auteurs pourraient expliquer pourquoi les sujets âgés ont plus de difficultés à maintenir leur éveil et ont tendance à s'assoupir (Desarnaud et al., 2004 et Figure I.20).

Modulation de l'activité corticale par l'orexine

L'orexine agit sur le réseau cortical via des mécanismes directs et indirects. En effet, d'une part, elle active toutes les voies régulatrices sous-corticales projetant vers le cortex, et d'autre part elle a une action directe sur certains neurones corticaux et sur les terminaisons pré-synaptique des fibres thalamo-corticales non-spécifique dans le mPFC.

Parmi les modulations des voies ascendantes, plusieurs études ont montré que les neurones du Raphé, du LC et de la VTA qui projettent spécifiquement vers les aires corticales et en particulier vers le cortex préfrontal possèdent une sensibilité accrue à l'orexine (Del Cid-Pellitero and Garzón, 2011a,b, Cid-Pellitero and Garzón, 2011). De la même façon, les neurones du noyau paraventriculaire, appartenant donc au thalamus non-spécifique, projettent vers le cortex préfrontal et possèdent une sensibilité accrue à l'orexine (Huang et al., 2006). Enfin la stimulation des noyaux thalamiques intralaminaires par l'orexine améliorerait les performances des animaux dans des tâches de mémoire complexes via l'action directe de ces noyaux sur le mPFC (Mair and Hembrook, 2008).

D'autre part, comme nous l'avons mentionné précédemment, les neurones à orexine projettent de façon diffuse dans l'ensemble des aires corticales (Peyron et al., 1998). Dans les cortex moteur, somatosensoriel, visuel et cingulaire, seuls les neurones de la couche VIb présentent une sensibilité à l'orexine B via les récepteurs OX2R (Marcus et al., 2001, Bayer et al., 2004). Dans le cortex préfrontal, les neurones de différentes couches présentent une sensibilité à l'orexine. L'innervation orexinergique du cortex préfrontal est très hétérogène, les régions ventrales du cortex préfrontal infra- et pré-lobique recevant une densité de fibres plus importante que les régions dorsales. De plus, on y observe une hétérogénéité laminaire de la répartition des fibres orexinergiques avec une densité plus importante dans les couches supragranulaires (couche I et II) et infragranulaires (couche V et VI) qu'en couche IV. Il est intéressant de noter que ce profil est similaire à celui des projections cholinergiques et du thalamus non-spécifique. Les neurones pyrami-

daux de la couche V du cortex préfrontal possèdent des récepteurs OX1R qui leur confèrent une sensibilité à l'orexine A (Song et al., 2005). Cette sensibilité serait médiée soit par la fermeture d'une conductance potassique (Xia et al., 2005), soit par l'ouverture d'une conductance calcique via les canaux de type L (Xia et al., 2009) ou soit encore par la fermeture des canaux HCN dans les dendrites des pyramides (Li and Steinbach, 2010). Enfin, une étude récente suggère que l'orexine pourrait également activer directement les pyramides des couches II/III dans le mPFC (Yan et al., 2012).

La troisième voie de régulation de l'activité corticale par l'orexine est l'excitation spécifique des terminaisons pré-synaptiques des afférences sous-corticales. Cette excitation a été mise en évidence dans le mPFC par imagerie confocale et suggère que l'acétylcholine et l'orexine ciblent les mêmes terminaisons pré-synaptiques des neurones thalamocorticaux provenant des noyaux non-spécifiques (Lambe et al., 2005). L'activation des terminaisons pré-synaptiques par l'orexine permettrait une augmentation des performances cognitives via une augmentation du niveau d'attention (Lambe et al., 2007). Enfin, plus récemment, il a été montré un contrôle pré-synaptique de fibres glutamatergiques non définies projetant vers les interneurons FS du mPFC, suggérant une modulation ciblée de certains types d'interneurones par l'orexine (Aracri et al., 2013).

En conclusion, l'orexine agirait sur l'activité corticale par trois mécanismes complémentaires : activation des voies afférentes, activation spécifique de certaines populations de neurones corticaux et enfin régulation pré-synaptique de libération du glutamate dans le mPFC. Ces trois mécanismes permettent ainsi une modulation fine des états d'attention corticaux.

Deuxième partie

Méthodes

1 | Etudier une synapse

On peut remonter l'histoire de l'étude de la synapse et de la transmission synaptique à la fin du XVIII^{ème} siècle et les travaux de Galvani montrant l'existence d'une électricité intrinsèque à l'animal. Cette histoire a ensuite été émaillée de controverses dont les plus célèbres sont celle portant sur la nature du neurone : entité discrète ou partie d'un syncytium, et celle sur la nature de la transmission synaptique : chimique ou électrique.

Les réactions noires à l'argent chromé de Ramon y Cajal dans les années 1930 permirent de résoudre la première controverse en montrant que les axones se terminent de façon libre à la surface des autres cellules. Ces entités cellulaires prirent le nom de neurone d'après une proposition émise par Waldeyer dès 1891. Il souligna aussi les bases du principe de polarisation du neurone et le concept de connexions spécifiques entre les types neuronaux.

De même, les travaux de Langley et de ses étudiants dans les années 1900-1920 appuyèrent la théorie de la transmission chimique grâce à l'étude de la transmission synaptique à la jonction neuromusculaire montrant l'existence d'une communication chimique entre le neurone et la fibre musculaire. Par la suite, la démonstration de Kuffler permettra d'affirmer l'existence de synapses chimiques entre neurones. Cette démonstration repose sur trois points : les délais synaptiques, l'effet de l'altération du potentiel d'action pré-synaptique sur l'EPSP et les effets de la stimulation *sub-threshold* du neurone pré-synaptique sur la cellule cible. Dans le même temps, Eccles défenseur de la théorie d'une synapse de nature électrique abandonnera sa théorie qui se heurtait au problème théorique de la synapse inhibitrice. Il faudra attendre Furshpar et Potter en 1957 pour montrer la co-existence dans le système nerveux de synapses chimiques et électriques.

C'est néanmoins le nom de Katz qui reste le plus célèbre dans l'étude de la transmission synaptique. Parachevant la démonstration de Kuffler, il pose les bases de l'étude moderne de la synapse.

Dans ce chapitre, nous aborderons brièvement les différentes méthodes d'enregistrement des courants synaptiques puis nous détaillerons deux analyses qui ont été utilisées au cours de mes travaux de thèse.

Enregistrer des courants synaptiques

Les courants synaptiques sont classiquement étudiés de plusieurs façons complémentaires.

La première méthode consiste à enregistrer les événements spontanés (sEPSCs) ou miniatures (mEPSCs) au niveau post-synaptique. Les événements spontanés sont générés par l'émission d'un potentiel d'action dans la cellule pré-synaptique et la libération de vésicules synaptiques sans stimulation de la cellule pré-synaptique. Ces événements sont assez fréquents puisqu'une cellule pyramidale reçoit environ trois sEPSCs par seconde et qu'un interneurone FS peut en recevoir dix par seconde en tranche. Néanmoins, les vésicules étant libérées par le passage d'un potentiel d'action, les événements enregistrés ne sont pas nécessairement quantaux. Pour enregistrer des événements quantaux, les potentiels d'action sont bloqués par l'application de tétrodontoxine (TTX), les événements synaptiques sont alors issus de la fusion spontanée d'une vésicule synaptique avec la membrane plasmique. La probabilité que ces événements, nommés mEPSCs, soit quantaux est alors élevée. Certaines synapses, comme par exemple les synapses glycinergiques ou nicotiques, ont un taux de fusion des vésicules synaptiques très faible, ce qui limite la possibilité d'enregistrer les mPSCs. Pour les observer, on peut alors forcer la fusion des vésicules en utilisant des toxines comme la lathrotoxine. Cette première méthode permet donc d'enregistrer des événements dans un contexte physiologique mais ne permet pas de discriminer quelle synapse parmi des centaines est activée.

Une deuxième façon d'enregistrer des courants synaptiques consiste à stimuler spécifiquement une voie d'intérêt. Cette stimulation peut être électrique ou lumineuse. La stimulation électrique permet une certaine spécificité si le faisceau de fibres stimulé est bien ségrégué. C'est par exemple le cas de la stimulation des fibres thalamocorticales dans les tranches du même nom. Néanmoins, cette ségrégation est rarement présente et la stimulation reste trop imprécise pour la caractérisation de voies spécifiques. L'ajustement de l'intensité de la stimulation électrique permet de diminuer le nombre de fibres recrutées. On peut ainsi s'approcher de la stimulation d'une seule fibre, qui est supposé être atteint lorsque 50% des stimulations seulement induisent un courant post-synaptique, on parle de stimulation minimale. Les outils d'optogénétique permettent d'étudier de façon très spécifique une unique voie de fibres. L'ajustement de l'intensité et de la durée de la photostimulation permet également de recruter un faible nombre de fibres et de s'approcher d'une stimulation minimale. Néanmoins, la forme du potentiel d'action pré-synaptique induit par la photostimulation nous est inaccessible et pourrait affecter les propriétés de libération des neurotransmetteurs. Cette méthode permet donc une très grande spécificité de la voie recrutée mais est moins physiologique que l'enregistrement des mEPSCs.

La façon la plus propre de quantifier les propriétés d'une synapse spécifique consiste à enregistrer des paires de neurones connectés. Dans ces conditions, la transmission synaptique est étudiée par la stimulation intracellulaire de la cellule pré-synaptique. Cette stimulation permet d'étudier une synapse avec un très haut taux de spécificité bien qu'elle ne permette pas de discriminer si un ou plusieurs sites de libération sont activés. Cette méthode présente aussi l'inconvénient majeur de ne permettre d'enregistrer que des paires de neurones très proches car la probabilité de connexion diminue très vite avec la distance. C'est pourquoi des techniques de stimulation optique développées actuellement visent à augmenter la probabilité de trouver des paires connectées en augmentant le nombre de cellules pré-synaptiques testées. Pour cela, on couple optogénétique et stimulation lumineuse laser qui permettent de cibler précisément le soma de la cellule fluorescente à stimuler tout en enregistrant les courants synaptiques au niveau de la cellule post-synaptique.

Enfin, la méthode du décaageage de glutamate par rayonnement ultraviolet bi-photonique permet de stimuler spécifiquement une synapse grâce à la précision micrométrique de la stimulation laser. Cette technique permet de stimuler de façon spécifique un bouton synaptique et ainsi d'étudier la conduction des courants synaptiques le long de l'arbre dendritique puisque la distance entre le bouton et le soma est mesurable. Enfin, cette technique permet d'évaluer les influences exercées par les boutons entre eux puisque les boutons peuvent être activés successivement à grande vitesse. Cependant, cette stimulation ne permet pas de savoir à quelle voie appartient la synapse testée et le décaageage du glutamate, même s'il mime la libération de glutamate dans la fente synaptique, ne reproduit pas exactement les conditions physiologiques de libération et diffusion du glutamate dans la fente.

En conclusion, l'ensemble de ces techniques présente des avantages et des inconvénients qu'il convient de peser soigneusement afin de choisir la technique la plus appropriée à la question posée.

Caractéristiques des transmissions synaptique et volumique

Quelques notions élémentaires permettent de distinguer la transmission volumique de la transmission synaptique. La transmission volumique correspond à une libération de neurotransmetteurs/neuromodulateurs dans l'espace extracellulaire, sans cible cellulaire définie. Cette libération a lieu en général au niveau de varicosités qui sont des espaces membranaires différenciés et les modulateurs libérés sont principalement contraints dans des vésicules (c'est le cas des catécholamines par exemple) mais ils peuvent aussi diffuser librement à travers la membrane (c'est

le cas du monoxyde d'azote). À l'inverse, la transmission synaptique se caractérise par la présence d'une cellule-cible, et les deux acteurs de cette communication présentent une différenciation membranaire. La transmission synaptique fait partie d'une famille de transmission plus large nommée en anglais, transmission *wired*, qui contient également la transmission électrique par jonction gap. Les principales caractéristiques des transmissions volumique et *wired* sont résumées dans le tableau suivant (Agnati et al., 2006, Sarter et al., 2009).

	Volume	Wired
Distribution of AChR and release sites	Non-junctional complex	Junctional complex
Transmission specificity	Transmission 'privacy' is limited to the specificity of the neurotransmitter and the selectivity of receptors	Transmission 'privacy' is based on the presence of a transmission channel dedicated to this neurotransmitter at this synapse
Ratio of pre- to postsynaptic sites	One source of neurotransmitter release affects many targets	One-to-one neurotransmission
Transmission timeline	Long transmission delay	Minimal transmission delay
Type of coded information	Produces widespread, general effects on 'arousal', 'readiness for processing', vigilance or somnolence	Inserts discrete and essential information into target circuits
Mimicking transmission mode	Effects of released neurotransmitter can typically be reproduced by administering direct agonists at target receptors or drugs that elevate extracellular levels of the neurotransmitter (for example, uptake inhibitors)	As direct receptor agonists or drugs that elevate extrasynaptic neurotransmitter levels do not reproduce the phasic pattern of neurotransmission that typically codes the information transferred to the target neuron, such drugs typically fail to reproduce the effects of endogenously released neurotransmitter
Energy costs	Low energy demands; opportunistic transmission along energy gradients is used for other purposes	Consumes more space and involves higher energy costs

FIGURE II.1 – Comparaison des transmissions volumique et *wired*. D'après Sarter et al., 2009

Caractérisation des récepteurs impliqués dans la synapse chimique

Les récepteurs impliqués dans une synapse peuvent être de nature ionotropique ou métabotropique. Pour déterminer leur nature, il existe différentes approches complémentaires.

Analyse électrophysiologique

La pharmacologie des récepteurs est un champ d'investigation majeur de l'industrie pharmaceutique. Les molécules peuvent agir de différentes manières sur le récepteur : ainsi il existe des antagonistes du site de liaison, des antagonistes allostériques ou encore des agonistes inverses qui agiront sur des régions différentes

du récepteur. L'approche pharmacologique peut rarement être exclusive car peu d'antagonistes présentent une sélectivité totale pour un récepteur.

Au niveau post-synaptique, la transmission synaptique se caractérise par une modification du flux ionique : ouverture/fermeture d'une ou plusieurs conductances qui peuvent être Cl^- , Na^+ , Ca^{2+} , K^+ ou mixte. L'étude de la dépendance courant-voltage (I-V) de cette conductance apporte donc des renseignements sur la nature des récepteurs impliqués. De plus, cette courbe I-V est souvent modulable par divers paramètres comme les concentrations internes ou externes en ions, comme le Mg^{2+} ou la présence de polyamines, qui peuvent être ajoutées de façon artificielle dans la pipette de patch sous forme de spermine et qui informent également sur la nature du récepteur impliqué.

Analyse moléculaire

L'expression des différents récepteurs peut également être étudiée au niveau cellulaire par RT-PCR sur cellule unique (Lambolez et al., 1992). Cette technique consiste à prélever le cytoplasme d'une cellule en l'aspirant dans la pipette d'enregistrement électrophysiologique. Les ARNm présents dans le cytoplasme sont protégés par l'ajout d'un RNAsine qui bloque les RNase, et sont *reverse-transcrits* par l'ajout d'une reverse transcriptase. Les ADNc produits sont ensuite amplifiés par PCR.

Enfin la nature des récepteurs peut être analysée par immunohistochimie et toutes les techniques se basant sur l'utilisation d'anticorps ciblant spécifiquement un récepteur. Dans ce dernier cas, la forte homologie entre certains récepteurs, comme c'est le cas pour les récepteurs nicotiques, rend la synthèse d'anticorps spécifiques impossible. D'autre part, si certains anticorps se révèlent efficaces en western blot, en revanche ils sont inefficaces en immunohistochimie. Enfin, certains anticorps se lient à des régions protéiques parfois cachées dans le tissu, qui nécessite alors un traitement préalable.

Quantification électrophysiologique des paramètres de la synapse chimique

De nombreux paramètres biophysiques de la synapse peuvent être extraits par analyse des courants post-synaptiques, en particulier par analyse du bruit synaptique ou des cinétiques du courant.

Mesure de ratio

Dans les synapses où deux canaux se côtoient, il peut être intéressant de déterminer l'importance relative des différents courants. C'est en particulier le cas pour les synapses glutamatergiques contenant des récepteurs AMPA et des récepteurs NMDA. En effet, l'ouverture des récepteurs NMDA est dépendante du potentiel de membrane et elle sera donc conditionnée, entre autres, par la dépolarisation induite par l'ouverture des canaux AMPA.

Physiologiquement, une variation du ratio AMPA/NMDA au sein des synapses a été observée au cours du développement ainsi que dans de nombreuses situations pathologiques. De plus, les courants NMDARs ont été impliqués dans la mise en place d'activités persistantes ainsi que dans des phénomènes de plasticité. Il est par conséquent intéressant de mesurer l'évolution de ce ratio dans de nombreuses conditions.

Le ratio AMPA/NMDA peut aisément s'évaluer du fait des cinétiques très différentes de ces deux canaux. De plus, les courants NMDAs sont bloqués par le Mg^{2+} intracellulaire aux potentiels hyperpolarisés, ce qui autorise une mesure fiable du courant AMPA. Une façon classique de mesurer le ratio est d'enregistrer le courant AMPA à -90 mV et les courants AMPA et NMDA à $+50$ mV. Puis la composante AMPA à $+50$ mV est soustraite en prenant comme postulat que la courbe I-V du courant AMPA est linéaire. Le courant NMDA peut être évalué au pic ou pendant la décroissance du courant (Figure II.2). Si le courant est évalué au pic, il est nécessaire de bloquer les courants AMPAs au préalable afin de ne pas fausser la mesure (Myme et al., 2003).

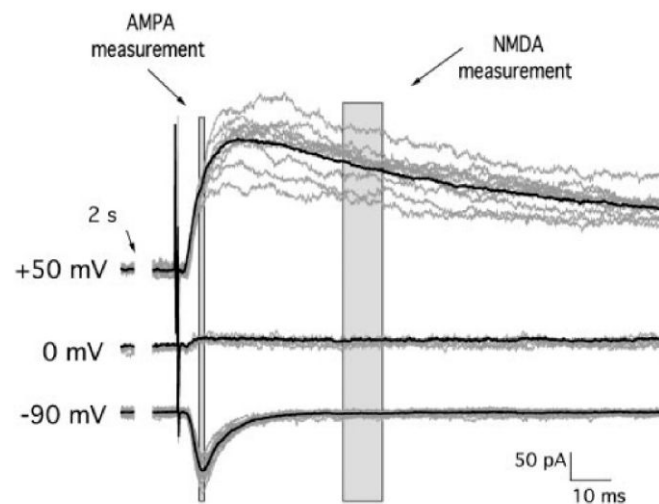


FIGURE II.2 – Mesure du ratio AMPA/NMDA. *D'après Myme et al., 2003*

L'analyse de bruit non-stationnaire

L'analyse de bruit non-stationnaire permet d'évaluer le nombre de canaux recrutés dans la synapse ainsi que leur probabilité d'ouverture. Cette analyse peut être utile pour déterminer le niveau de saturation d'une synapse. En outre, elle permet d'estimer la concentration en ligand dans la synapse si elle couplée avec une courbe dose-réponse donnant la relation entre la concentration en ligand et la probabilité d'ouverture.

Cette analyse a été beaucoup utilisée dans les années 1980 afin de déterminer les paramètres biophysiques des différents types de synapses : nombre de canaux impliqués, saturation des récepteurs, concentration synaptique. Elle a également permis de déterminer les paramètres biophysiques de canaux non-synaptiques impliqués dans les courants sodiques par exemple (Sigworth, 1980). Au cours de ma thèse, j'ai eu l'occasion d'utiliser cette analyse pour les courants AMPA et NMDA de la synapse thalamocorticale du thalamus non-spécifique et pour les courants $\alpha 4\beta 2$ de la synapse nicotinique de la couche VI.

Cette analyse se base sur la variation de la cinétique de descente des EPSCs d'un essai à l'autre. Par conséquent, un minimum une cinquantaine d'évènements synaptiques pour un même neurone est nécessaire pour pouvoir effectuer cette analyse (Figure II.3A). Les courants sont normalisés par rapport à l'amplitude maximale et la variance du courant moyen est ensuite extraite sur toute la durée du *decay* selon l'équation :

$$Var_t = \frac{1}{n-1} \sum_{x=1}^n (I_{x(t)} - I_{mean(t)})^2 \quad (1.1)$$

où $I_{mean(t)}$ est l'amplitude moyenne du courant au temps t , n est le nombre de PSCs évoqués et $I_{x(t)}$ est l'amplitude du courant au temps t pour la trace x . Une mesure de la variance du bruit basal est également effectuée et est soustraite de la variance du courant moyen. On pourra noter que pour des potentiels hyperpolarisés, la variance du bruit basal est assez faible ($\sim 1 - 2 \text{ pA}^2$) alors qu'elle est beaucoup plus élevée pour les potentiels supérieurs à 0 mV ($\sim 10 \text{ pA}^2$). Les valeurs de la variance sont ensuite reportées sur un graphique en fonction de l'amplitude du courant. La relation qui lie l'amplitude et la variance peut s'écrire de la façon suivante :

$$Var_t = \frac{1}{N} (iI_{mean(t)} - I_{mean(t)}^2) \quad (1.2)$$

où i est le courant élémentaire du canal et N le nombre total de canaux dans la synapse. On obtient finalement la conductance unitaire, γ du canal grâce à la relation :

$$\gamma = \frac{i}{V_m - E_{Rev}} \quad (1.3)$$

où V_m est le potentiel de membrane et E_{Rev} est le potentiel de réversion du canal.

Cette analyse permet donc d'obtenir une indication sur le nombre de canaux mis en jeu dans la synapse, leur probabilité d'ouverture et sur leur conductance unitaire. Elle peut également permettre d'avoir une idée de la concentration en ligand au niveau de la membrane post-synaptique puisque la probabilité d'ouverture est liée à la concentration en ligand (Figure II.3 et Mangin et al., 2003).

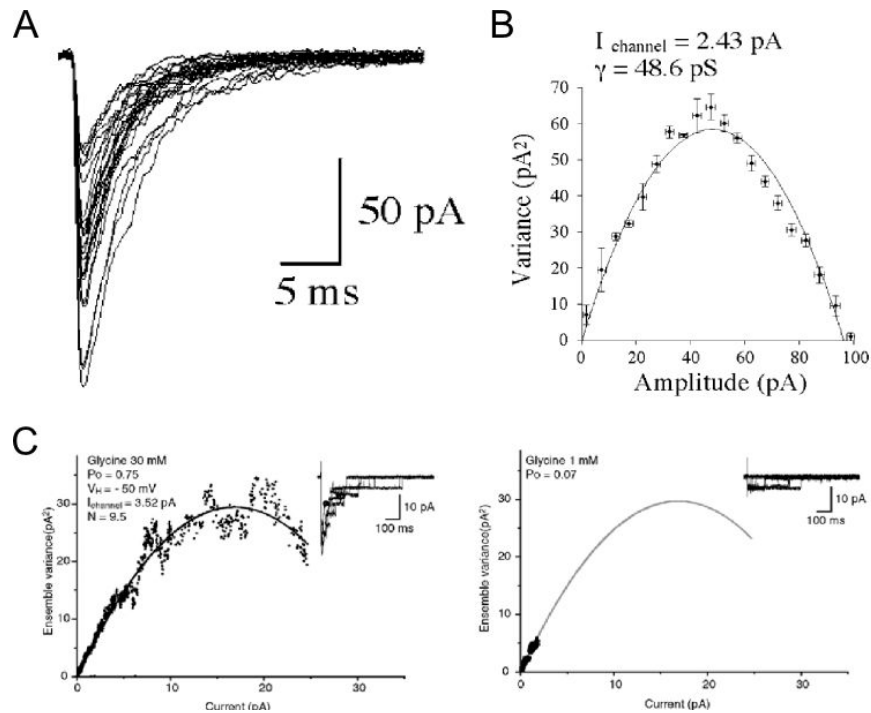


FIGURE II.3 – Analyse de bruit non-stationnaire sur des courants synaptiques glycinergiques. **A** mIPSCs glycinergiques induits par fusion des vésicules synaptiques en utilisant la lathrotoxine. **B** Analyse de bruit non-stationnaire sur les courants présentés en **A** normalisés. La relation entre la variance et l'amplitude des courants s'écrit grâce à une fonction parabolique à partir de laquelle on peut extraire les paramètres post-synaptiques. D'après Mangin et al., 2003. **C** Analyse de bruit non stationnaire à partir de courants glycinergiques induits par applications courtes de glycine. On notera que la probabilité d'ouverture des canaux dépend fortement de la concentration de glycine appliquée. D'après Rigo et al., 2003

2 | L'optogénétique : un outil pour l'étude spécifique de voies neuronales

L'optogénétique est un terme très général qui regroupe tous les outils codés génétiquement modulables par la lumière. Ce terme inclut donc les protéines canaux photo-activables de type channelrhodopsine mais aussi les sondes rapportrices codées génétiquement comme les sondes PKA, AMPc, ATP, GMPc, Ca^{2+} , glucose ou lactate (Gervasi et al., 2007, Hepp et al., 2007, Hu et al., 2011) ou les récepteurs photomodulables développés dans les équipes de Kramer et de Bramberg (Pour revue, voir Kramer et al., 2013). Dans cette partie, nous nous focaliserons sur l'outil le plus populaire de cette famille : la channelrhodopsine.

La Channelrhodopsine

Les channelrhodopsines ont été découvertes par Nagel et collaborateurs dans l'équipe de Bramberg (Nagel et al., 2002, 2003). Elles sont issues d'une algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* et appartiennent à la sous-famille des opsines, protéines à sept segments trans-membranaires (TM). Les opsines se lient de façon covalente au rétinol pour former une protéine photo-sensible : les rhodopsines. Ce sont des protéines couplées aux protéines G qui activent une voie dépendante des protéines G aboutissant à l'hydrolyse de GTP en GMPc et à l'hyperpolarisation des cellules. Contrairement aux rhodopsines, les channelrhodopsines sont des protéines-canal qui s'associent en dimères pour former le pore du canal (Figure II.4A et Kato et al., 2012).

La première channelrhodopsine à avoir été caractérisée est la ChR1. Son cœur est analogue à une pompe à protons d'origine bactérienne. Elle présente 15-20% d'homologie avec les *archeal sensory rhodopsines*, l'*ion transporter bacteriorhodopsine* et l'halorhodopsine. Comme toutes les protéines de la famille des opsines, elle possède un motif consensus LDxxxKxxW de liaison au trans-rétinal. Son pore est

sélectif du H^+ , elle est par conséquent sensible au pH (Nagel et al., 2002).

La ChR2, quant à elle, forme un pore perméable aux cations (Nagel et al., 2003). La conductance du canal est d'environ 3.10^4 ions/s. Le potentiel de réversion de la ChR2 est le même que celui des canaux cationiques non-spécifiques (0mV). Le spectre d'excitation de la ChR2 montre un pic à 473 nm. Lors d'une stimulation lumineuse prolongée, l'excitation de la ChR2 induit un pic de courant entrant dû à une entrée cytosolique massive de Ca^{2+} qui décroît à cause de l'ouverture de canaux Cl^- - Ca^{2+} dépendant. Ce pic est suivi d'un courant de plateau qui décroît progressivement du fait de l'inactivation progressive de la ChR2. La ChR2 désensibilise quand elle est stimulée en continu mais sa conductance reste élevée. Bien que l'ouverture de la ChR2 nécessite l'absorption de deux photons, le canal est rapide : son temps de montée est de 200 μs ou moins. L'ouverture du canal est due à un changement conformationnel induit par l'isomérisation du trans-rétinal en présence de lumière.

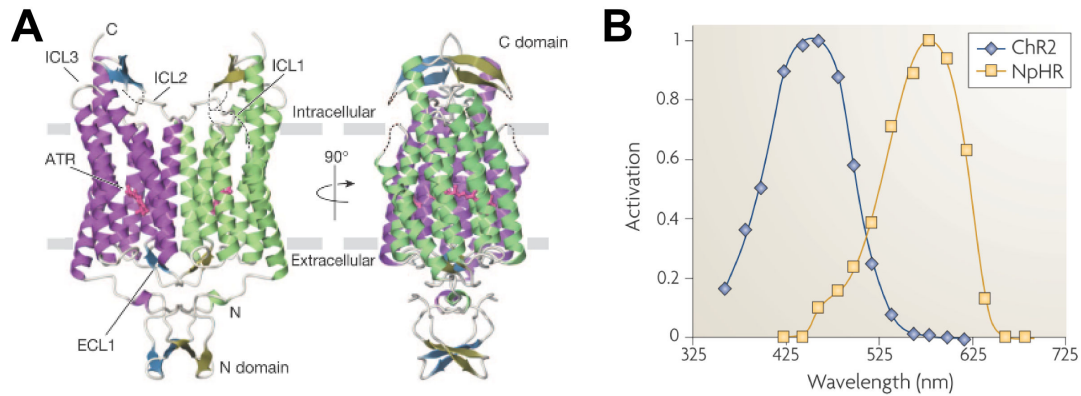


FIGURE II.4 – **A.** Étude cristallographique montrant la structure 3D de la ChR2. D'après Kato et al., 2012. **B.** Spectre d'excitation de la ChR2. D'après Zhang et al., 2007.

Variations autour de ChR2

La ChR2 est un outil récent et de nombreuses études de mutagenèse dirigée cherchent à en améliorer les propriétés. Les variants aujourd'hui décrits restent généralement très proches de la version isolée de *Chlamydomonas reinhardtii*, n'en différant que d'un ou deux acides aminés. Néanmoins, on compte également quelques chimères comprenant des régions de ChR1 et de ChR2 ainsi qu'une nouvelle ChR2 isolée de *Volvox couteri*. Les principaux paramètres pris en compte pour les améliorations de cette protéine photo-sensible sont la photo-sensibilité,

les cinétiques, la désensibilisation et la longueur d'onde d'excitation (Tableau 2.1). Elles se traduisent en général par des mutations sur les segments TM3 et TM4 ou sur les différents acides aminés formant la poche de liaison au trans-rétinal.

Dans le tableau suivant sont répertoriées les propriétés principales des différents variants de la ChR obtenus par mutagenèse dirigée, par fabrication de chimères ou isolés à partir d'autres organismes.

mutation	photo-sensibilité	cinétiques (τ_{off})	désensibilisation	λ excitation
WT	+	++ (10 ms)	+	470 nm
H134R	++	– (25 ms)	--	450 nm
CaTCh (L132C)	+++	-- (60 ms)	++	474 nm
ChETA (E123T)	–	+++ (5 ms)	– – –	500 nm
ChIEF	++	++ (10 ms)	--	450 nm
TC (T159C)	++	++ (10 ms)	--	450 nm
ChETA x TC	+	++ (10 ms)	--	450 nm
VChR1	++	-- (125 ms)	–	589 nm

TABLE 2.1 – Propriétés de ChR2 et de ses divers mutants. En rouge, une chimère de ChR1 et ChR2. En bleu, une ChR issue de *Volvox couteri*. Pour CaTCh, voir Kleinlogel et al., 2011; pour TC et ChETA x TC, voir Berndt et al., 2011; pour VChR1, voir Zhang et al., 2008; et pour tous, voir Deisseroth, 2011, Zhang et al., 2007, Knöpfel, 2012, Mattis et al., 2012

3 | Transfert viral

Le transfert viral est la méthode la plus efficace pour introduire un gène d'intérêt dans une cellule neuronale spécifique. Au cours de ma thèse, j'ai eu l'occasion de travailler avec trois types de virus : un virus à expression rapide : le *Sindbis* (Sb), et deux virus à expression lente : l'*Adeno-associated virus* (AAV) et le *Lentivirus* (Lv). La barrière hématoencéphalique étant un barrage efficace contre la plupart des infections virales, la transduction des cellules nerveuses par ces trois virus nécessite l'injection intra-crânienne des particules virales. Dans le cas du sindbis et sur des animaux jeunes (P12-P16), il est possible de mettre les tranches en survie et de déposer le virus directement sur la tranche, ce qui évite l'étape d'injection stéréotaxique.

Un vecteur viral à expression rapide : le Sindbis

Le Sb appartient à la famille des arbovirus. C'est un virus à ARN simple brin relativement long (11,7 kb dans sa forme native) qui n'est pas rétrotranscrit dans la cellule-hôte. Il possède une cap en 5' et une queue poly-A en 3' qui lui permettent d'être reconnu comme un ARNm par la cellule-hôte et donc d'être directement traduit. La région 5' contient des ARN non structurants qui sont impliqués dans la production d'un nouvel ARN génomique. C'est un virus de petite taille qui est entouré d'une enveloppe.

Ce virus possède un cycle d'expression très rapide. En général 12 h suffisent pour avoir un bon taux d'expression du gène d'intérêt. Il est donc injecté directement en intra-cranial ou déposé sur des tranches en survie. Le maintien en survie étant délicat pour des tranches issues d'animaux adultes, on utilise la technique de tranche en survie avant P14 et des injections stéréotaxiques pour P14 et ultérieurement. Au laboratoire, sindbis sert à faire exprimer des sondes : calcium (aéquorine), PKA, AMPc, lactate, ATP, glucose. Il peut également servir à faire exprimer la ChR2 ou dans des expériences de restauration d'un gène muté (Cf Annexe 2).

Des vecteurs viraux à expression lente : le Lentivirus et l'Adéno-associated virus

Les lentivirus

Les vecteurs basés sur le virus de l'immunodéficience humaine de type I (HIV) sont utilisés depuis plus de 20 ans. Au milieu des années 1990, l'amélioration du pseudotypage des virus (utilisation de la protéine G du *vesicular stomatitis virus* VSV-G) et la transduction de cellules de mammifères quiescentes ont lancé une vague d'amélioration de ces vecteurs, les rendant plus sûrs et plus efficaces (Quinonez and Sutton, 2002). Les Lv étant des rétrovirus à double brin d'ARN, ils possèdent un gène de reverse transcriptase qui leur permet de passer sous forme d'ADN et ainsi de s'intégrer à l'ADN de la cellule-hôte. Ils possèdent aussi une enveloppe virale composée majoritairement de glycoprotéines qui entourent la capsid. Les Lv sont des virus relativement gros : 100-120 nm de diamètre environ, ce qui leur confère une grande capacité de clonage puisqu'on peut introduire une séquence d'intérêt allant jusqu'à 9 kb.

Afin d'obtenir un bon taux d'expression du gène d'intérêt, un temps d'incubation de 4 semaines est nécessaire avant utilisation des animaux. Ce virus peut être utilisé pour induire l'expression de la ChR2 (Cf Publications 1 et 2) ou pour restaurer l'expression d'un gène comme dans les projets de récepteurs nicotiques dans la VTA auxquels j'ai eu l'occasion de participer au cours de ma thèse (Cf Annexe 1). Dans ces expériences, l'expression du gène d'intérêt peut être ubiquitaire ou conditionnelle.

Les adéno-associated virus

Les AAV appartiennent à la famille des parvovirus. Ce sont les plus petits virus connus, avec une capsid d'environ 22 nm de diamètre et pas d'enveloppe virale. Ces virus infectent les humains, environ 80-90 % des adultes sont séropositifs, mais ils ne sont pas connus pour transmettre des maladies. Le génome des AAV ne s'intègre pas à l'ADN mais reste sous forme d'extra-chromosome. Ces deux dernières particularités en font un très bon candidat pour la thérapie génique. Plusieurs essais ont déjà été menés en particulier pour les pathologies de la rétine. Néanmoins, il possède une faible capacité de stockage ce qui apporte une contrainte sur la taille du gène d'intérêt, le génome des AAV ne mesurant qu'environ 4,8 kb.

Au laboratoire, nous utilisons un AAV hybride de sérotype 2.1, ce qui signifie que la particule virale contient une capsid de sérotype 1 et une réplicase de sérotype 2. Nous utilisons ce virus pour faire exprimer la ChR2 spécifiquement dans les neurones cholinergiques, c'est pourquoi il possède un système d'expression condi-

tionnelle (Cf Publication 3). Quatre semaines après l'injection stéréotaxique, la ChR2 est suffisamment exprimée pour obtenir la libération d'acétylcholine endogène dans le néocortex.

Avantages et inconvénients de ces deux vecteurs viraux

Lv et AAV sont utilisés différemment en fonction des besoins et des contraintes de chaque expérience. Plusieurs paramètres doivent être pris en compte pour choisir le bon système d'expression viral :

Volume du virus : L'AAV est environ 100 fois moins volumineux que le Lv, par conséquent il diffuse beaucoup plus. Le Lv sera privilégié pour des injections dans des sites précis et l'AAV pour des sites plus larges ou sous forme conditionnelle.

Taille de l'insert : Le Lv a une grande capacité de clonage (jusqu'à 9 kb) alors que l'AAV a une capacité beaucoup plus faible (son propre génome ne faisant que 4.8 kb). On choisira donc un Lv pour des gènes d'intérêt volumineux.

Intégration du génome viral : Le génome de l'AAV ne s'insère pas dans celui de la cellule-hôte mais reste sous forme d'extra-chromosome, à l'inverse de celui du Lv qui s'y insère. L'AAV aura donc *a priori* une durée d'expression plus courte car l'extra-chromosome est détruit progressivement. Néanmoins le promoteur du Lv est généralement peu à peu éteint donc l'expression diminue aussi après un certain temps. De plus l'ADN du Lv peut s'intégrer dans n'importe quel endroit du génome pouvant occasionner des dégradations dans les séquences codantes et donc bloquer l'expression de certains gènes. Il faudra donc choisir entre une expression potentiellement plus stable et une dégradation potentielle de l'ADN de la cellule-hôte.

Modification du tropisme : Nous en reparlerons à la partie suivante mais le tropisme du Lv peut être modifié par pseudotypage et celui de l'AAV par le choix du sérotype.

Le cycle du virus et la conception de virus compétents à la phase répllicative

Le cycle du virus

Le cycle du virus est composé de deux grandes phases, dites pré- et post-intégrative. La phase pré-intégrative comprend les étapes allant de l'abord de la cellule-hôte à l'intégration du matériel génétique du virus dans le génome de la cellule-hôte. La phase post-intégrative comprend les étapes allant de la transcrip-

tion de l'ADN au bourgeonnement des particules virales. La figure II.5 expose un cas classique de cycle viral par l'exemple du cycle du rétrovirus HIV.

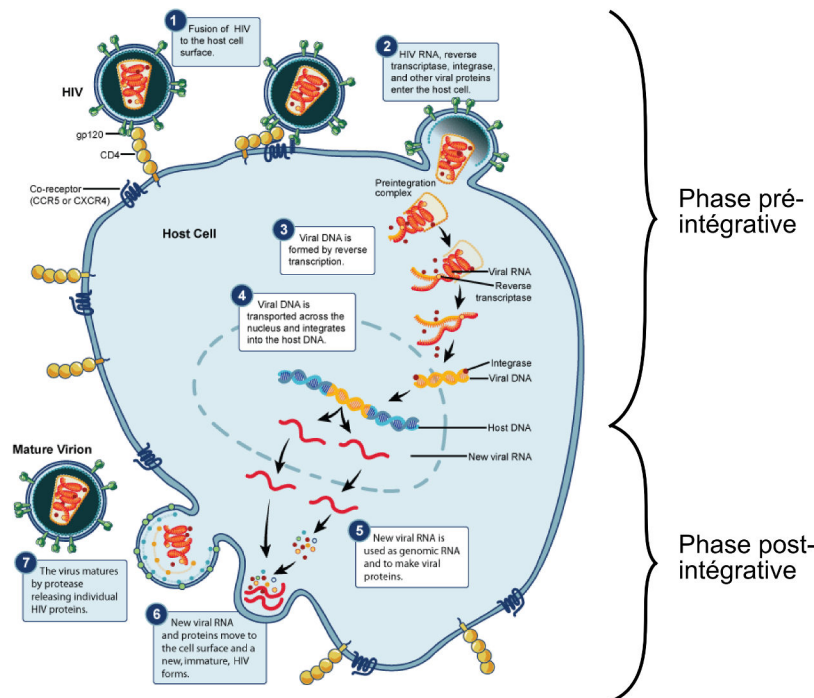


FIGURE II.5 – Le cycle du virus HIV. Phase pré-intégrative : fixation, entrée dans la cellule, décapsidation, rétrotranscription, intégration de l'ADN. Phase post-intégrative : transcription, traduction, assemblage, bourgeonnement, le tout par détournement de la machinerie de la cellule hôte. *Adaptation d'un schéma provenant du site du NIH.*

Fabrication d'un virus incompetent à la réplication

Les virus utilisés pour le transfert viral ne peuvent faire que la phase pré-intégrative du cycle viral, en effet ils ne possèdent pas les gènes essentiels à la réplication et à la formation de la capsid virale. C'est pourquoi ils sont dits "incompétents à la réplication". De nombreuses mesures de sécurité sont prises lors de la conception et de la fabrication des particules virales pour éviter qu'elles ne deviennent aptes à entrer dans la phase post-intégrative. Voici exposée brièvement la stratégie de fabrication d'un virus afin de garantir un maximum de sécurité.

La production des virus Lv, AAV et Sb suit le même principe général. Le génome du virus est réparti sur deux ou trois plasmides distincts. Un plasmide, dit de transfert, contient le gène d'intérêt et la séquence qui permet l'encapsidation

du matériel génétique (séquence Ψ). Pour les Lv, ce plasmide contient également une séquence cPPT (*central polypurine tract*) nécessaire à la rétrotranscription et à l'import nucléaire ainsi que les LTR (U3, U5 et R) indispensables à la rétrotranscription. Pour les AAV, le plasmide contient des *inverted terminal repeat* (ITR) nécessaire entre autres à l'encapsidation et à la multiplication de la séquence. Cette séquence sera la seule contenue dans la particule virale finale. L'autre ou les deux autres plasmides contiennent les séquences dites de *packaging*. Ils contiennent les gènes des protéines de structure et de production de nouveaux virions. De plus, pour les Lv et les Sb, ils contiennent les gènes de l'enveloppe du virus. Pour le Lv et l'AAV, les plasmides sont co-transfectés dans des lignées cellulaires et la machinerie de la cellule va permettre la transcription et la traduction des gènes. Dans le cas du Sb, les plasmides sont d'abord transcrits in vitro et les ARN produits sont électroporés dans des lignées cellulaires. Les particules virales sont ensuite récupérées dans le surnageant et peuvent être concentrées et purifiées.

Afin de garantir que les virus ne peuvent se répliquer, nous avons donc une séparation en plusieurs plasmides du génome du virion. De plus, les plasmides de *packaging* ne possèdent pas les séquences LTR et ITR qui sont remplacées par un promoteur ubiquitaire et une queue poly-A. Ces délétions permettent d'éviter la rétrotranscription des plasmides. De plus, dans le vecteur de transfert des lentivirus, la région U3 en 3' est supprimée ; lors de la rétrotranscription, la délétion U3 est reportée en 5' ce qui inactive les deux promoteurs selon le principe classique de la délétion des vecteurs SIN (*self-inactivation vector*).

Expression spécifique du gène d'intérêt dans la cellule cible

L'expression du gène dans un type spécifique de cellules dépend de trois paramètres principaux : le sérotype ou le pseudotype du virus, le promoteur du gène d'intérêt et la présence ou l'absence d'un système d'expression conditionnelle (de type LoXP par exemple).

Pseudotypes et sérotypes : déterminer le tropisme du virus

Les AAV sont usuellement classifiés selon leur sérotype et il a été montré que certains sérotypes ciblent particulièrement un type cellulaire. L'AAV de sérotype 2 est le plus généralement utilisé dans le CNS il possède un bon tropisme neuronal. Le sérotype 5 possède une palette plus large puisqu'il transduit aussi bien les neurones que les cellules gliales. L'AAV de sérotype 9 a également un tropisme neuronal mais il a de plus l'avantage de pouvoir passer la barrière hématoencépha-

lique, permettant de transduire les neurones par une simple injection systémique. D'autres AAV comme le sérotype 7 ne transduisent pas les cellules du CNS mais ciblent d'autres organes comme le foie.

Contrairement aux AAVs, les Lv possèdent une enveloppe composée majoritairement de glycoprotéines et sont rarement classifiés en fonction d'un sérotype. Le jeu de protéines d'enveloppe des Lv est souvent modifié par l'ajout d'une glycoprotéine virale provenant d'un autre type viral. Ce Lv à l'enveloppe modifiée est appelée virus pseudotypé. La glycoprotéine ajoutée détermine le tropisme du Lv. Le pseudotype le plus courant pour les Lv est le VSV-G qui permet la transduction des cellules du SNC. D'autres pseudotypes ont été développés pour cibler les cellules nerveuses et obtenir une expression stable du gène d'intérêt au cours du temps. Ils utilisent des glycoprotéines issues entre autres des virus de la leucémie murine, de la rage ou du virus Mokola apparenté à la rage (Watson et al., 2002). Ces différents sérotypes ont des tropismes neuronaux (comme le VSV-G) ou plus gliaux (comme le Mokola).

Choix du promoteur pour l'expression du gène d'intérêt

Le choix du promoteur peut également permettre une modulation de l'expression du gène d'intérêt dans un type cellulaire particulier. Néanmoins, plus il y a de restrictions sur les conditions d'expression du gène d'intérêt, plus le taux d'expression de la protéine d'intérêt sera faible. Les promoteurs les plus ubiquitaires sont celui de la phosphoglycérate kinase (PGK) ou celui du cytomégalovirus (CMV), qui permettent une expression neuronale et gliale. Pour cibler plus précisément les neurones, on peut utiliser les promoteurs *enolase neuron-specific* (NSE) ou PDGF- β pour *platelet derived growth factor β -chain*. Pour cibler les glies, on utilisera classiquement un promoteur *Glial fibrillary acidic protein* (GFAP). D'autres promoteurs sont aujourd'hui très couramment utilisés : *human synapsin* (hsyn) qui cible très spécifiquement les neurones, CaMKII qui cible les neurones pyramidaux du cortex (néocortex, hippocampe, etc.) ou encore *elongation factor I- α* (EF-I α) qui est ubiquitaire. De façon encore plus spécifique, un Lv possédant le gène de la ChR2 sous le contrôle du promoteur de l'orexine a été développé. Ce virus permet l'expression de la ChR2 uniquement dans les neurones à orexine (Adamantidis et al., 2007).

Expression conditionnelle via le système loxP

Une régulation drastique de l'expression du gène d'intérêt peut être effectuée par l'utilisation d'un système d'expression conditionnelle comme le système Cre-Lox. La recombinaison CRE-Lox permet d'obtenir des délétions, additions, inversions ou translocations de séquence site-spécifique. Dans notre cas, le système se

base sur l'inversion. Le gène d'intérêt dans le génome du virus est inversé par rapport au cadre de lecture, ce qui bloque sa transcription. Deux sites LoxP entourent le gène. En présence d'une enzyme d'origine bactérienne nommée CRE recombinase, qui reconnaît les deux LoxP, la séquence d'intérêt va être inversée permettant sa lecture et donc l'expression du gène. Afin de sélectionner un type cellulaire, des lignées de souris transgéniques possédant le gène de la CRE recombinase ont été développées. Ce gène est placé sous un promoteur spécifique du type cellulaire voulu. Dans l'exemple de la figure II.6, le virus conditionnel est injecté dans une souris PV-CRE permettant une expression spécifique de la ChR2 les interneurons de type FS (Cardin et al., 2010).

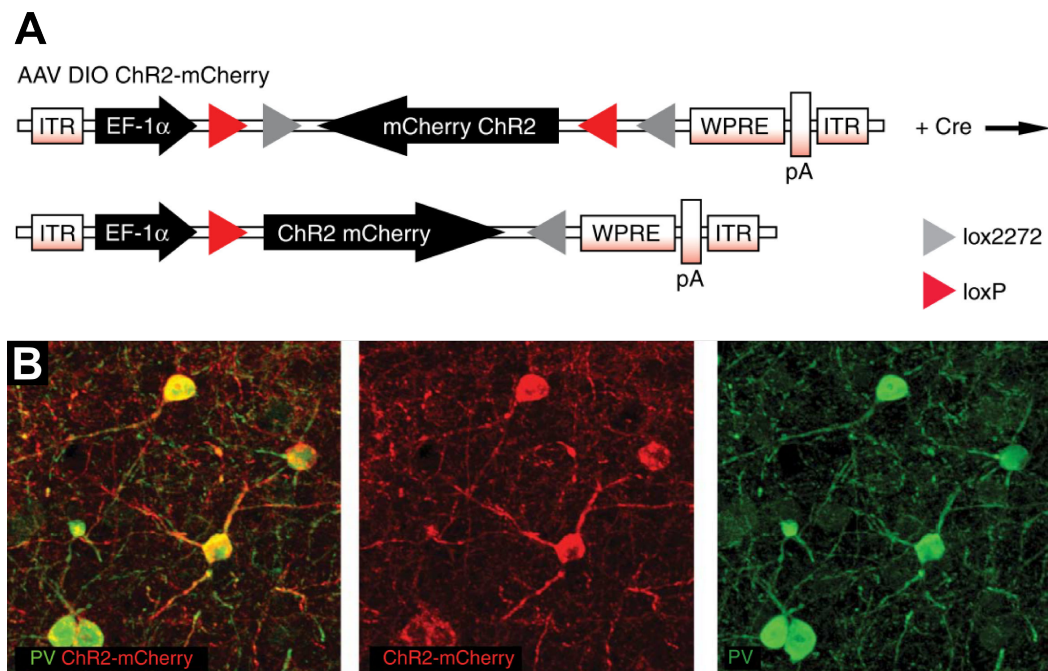


FIGURE II.6 – Expression conditionnelle de ChR2 dans les neurones PV. **A** Construction de l'AAV conditionnel. **B** Expression de la ChR2 dans les neurones PV de la souris PV-CRE. *Adapté de Cardin et al., 2010.*

Troisième partie

Résultats

1 | Présentation de l'article : "Target interneuron preference in thalamocortical pathways determines the temporal structure of cortical responses."

Introduction

Le thalamus est subdivisé en noyaux spécifiques et noyaux non-spécifiques. Les noyaux spécifiques sont la principale voie d'entrée des informations sensorielles du néocortex tandis que le rôle physiologique des noyaux du thalamus non-spécifique reste largement inexploré.

Les noyaux spécifiques ou noyaux relais projettent principalement vers les aires sensorielles suivant une topographie précise : le IGN qui relaie les informations visuelles projette vers le cortex visuel, etc. L'intégration des informations sensorielles transmises par ces noyaux présente donc une précision spatiale qui est également couplée à une précision temporelle. En effet, une stimulation sensorielle entraîne une excitation très brève du néocortex, qui est suivie d'une inhibition du réseau cortical. Cette brièveté de la réponse est due aux projections massives du thalamus sur les interneurons de type FS dont les cinétiques sont très rapides. L'activation des FS par les fibres thalamocorticales induit un phénomène d'inhibition très rapide, nommée inhibition antérograde qui bloque l'excitation récurrente du réseau cortical. Par conséquent, la réponse corticale à une stimulation sensorielle est restreinte à une étroite fenêtre temporelle.

À l'inverse, les noyaux du thalamus non-spécifique projettent de façon plus diffuse vers une ou plusieurs aire(s) corticale(s), chaque aire pouvant être innervée par un ou plusieurs noyau(x) (Berendse and Groenewegen, 1991, Van der Werf et al., 2002, Vertes, 2006). De façon intéressante, ces noyaux projettent préférentiellement

vers les aires corticales associatives, mais le rôle fonctionnel de ces projections est encore très mal connu. De plus, les cibles cellulaires des neurones du thalamus non-spécifique restent totalement inexplorées.

Récemment, des données comportementales et électrophysiologiques sont venues apporter un regard nouveau sur le rôle des noyaux du thalamus non-spécifique et en particulier des MTNs. La dense innervation orexinergique (Bayer et al., 2002a), cholinergique (Deutch et al., 1987) et μ -opioïde (Brunton and Charpak, 1998) des MTNs renforce l'idée que ces noyaux ont une activité très dépendante des états d'éveil et peuvent aussi participer à la modulation des états d'éveil et d'attention. De plus, des études comportementales avec ou sans lésion du Re/Rh, menées par l'équipe du Dr. Cassel (Loureiro et al., 2012, Cholvin et al., 2013) et par le Dr. Mair (Hembrook and Mair, 2011, Hembrook et al., 2012) ont montré l'importance de ces deux noyaux dans les processus mnémoniques. En effet, ils seraient impliqués dans le dialogue entre l'hippocampe et différentes régions corticales, dont le mFPC et le pariétal, régions impliquées dans les mémoires de travail et à long terme.

Au cours de ce travail, j'ai cherché à apporter une preuve physiologique de l'impact du rhomboïde sur le réseau cortical. Jusqu'à récemment, l'absence de préparation de tranches de cerveau conservant les projections thalamocorticales non-spécifique avaient empêché leur étude. Mais ce problème a été surmonté avec le développement des outils d'optogénétique qui permettent une stimulation spécifique d'une voie d'afférence. J'ai donc utilisé cette technique pour activer spécifiquement les neurones du rhomboïde et enregistrer dans le cortex la résultante de leur photo-activation.

Dans un premier temps, j'ai analysé les différentes composantes de la synapse thalamocorticale non-spécifique qui n'avait jamais été étudiée. Ces analyses montrent que cette synapse est très similaire à celle du thalamus spécifique ou aux synapses corticocorticales avec une expression conjointe de récepteurs AMPA et NMDA. J'ai ensuite dressé un profil des projections du rhomboïde sur les différentes couches corticales et au sein de ces couches sur plusieurs sous-types neuronaux. Cette étude montre que le rhomboïde projette de façon robuste sur les couches profondes du cortex pariétal. De façon intéressante, l'activation des fibres du thalamus spécifique (VB) induit un courant exciteur d'amplitude comparable dans les couches profondes du néocortex. Ce résultat indique qu'au niveau des couches profondes du cortex pariétal, les entrées du thalamus non-spécifique ont un poids synaptique comparable à celles du thalamus spécifique, ce qui va à l'encontre de l'idée d'un thalamus projetant de façon diffuse dans les aires corticales. De plus, mes résultats indiquent que les projections du Rh évitent systématiquement la couche IV qui est la principale voie d'entrée des informations sensorielles.

J'ai ensuite cherché à caractériser les cibles cellulaires des projections du Rh.

Mes résultats indiquent que les interneurones de type FS sont faiblement recrutés par le rhomboïde contrairement aux noyaux relais du thalamus qui projettent massivement sur ces interneurones. À l'inverse, le rhomboïde contacte fortement les interneurones lents de type Ad, qui sont une cible privilégiée des projections corticocorticales mais qui sont très peu contactés par les neurones du thalamus spécifique. La conséquence du faible recrutement des FS est l'induction d'une inhibition antérograde retardée par rapport à ce qu'on observe dans le cas de la stimulation des fibres du thalamus spécifique. Ce retard de l'inhibition peut sembler peu conséquent puisqu'il n'est que de 4 ms mais ces conséquences physiologiques sont importantes. En effet, l'inhibition arrive alors en même temps que l'excitation récurrente et les deux entrent en compétition, ce qui autorise le réseau à générer des activités persistantes et désynchronisées susceptibles de soutenir la mise en place de traces mnémoniques.

Afin de confirmer mes résultats expérimentaux, mes données ont été incorporées dans un modèle de champ moyen par Jérémie Naudé, post-doctorant dans l'équipe de Philippe Faure. Ce modèle, qui donne une information sur le taux de décharge moyen des différentes populations de neurones confirme qu'une stimulation du thalamus spécifique entraîne une activation forte des neurones excitateurs et FS dans une fenêtre temporelle étroite tandis qu'une stimulation du rhomboïde entraîne une activation prolongée de l'ensemble des types neuronaux du réseau cortical.

Ce travail met donc en évidence un rôle jusque là ignoré des interneurones Ad dans la modulation de la dynamique corticale et souligne la différence fondamentale de l'impact des thalamus spécifique et non-spécifique sur le réseau cortical. Ces résultats sont cohérents avec les rôles physiologiques supposés des deux thalamus : le thalamus spécifique, impliqué dans l'intégration temporelle des stimulus sensitifs, a un impact fort dans une courte fenêtre temporelle sur le cortex tandis que le thalamus non-spécifique, qui donne des informations plus contextuelles, a un impact de longue durée sur le réseau cortical.

Article

Title:

Target interneuron preference in thalamocortical pathways determines the temporal structure of cortical responses

Authors:

Y. Audrey Hay, Jérémie Naudé, Philippe Faure, Bertrand Lambolez

Affiliations:

Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UM CR 18, Neuroscience Paris Seine, F-75005, Paris, France

Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), UMR 8246

Institut national de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), UMR-S 1130

One Sentence Summary:

Differential targeting of interneuron types by specific and non-specific thalamic inputs underlies opposite dynamics of cortical responses.

Abstract:

Sensory processing relies on fast detection of changes in the environment, as well as integration of contextual cues over time. The mechanisms by which local circuits of the cerebral cortex simultaneously perform these two opposite processes remain obscure. Thalamic “specific” nuclei relay sensory information, whereas “non-specific” nuclei convey information on the environmental and behavioral context. We expressed channelrhodopsin in specific (sensory) or non-specific (contextual) thalamus. By selectively activating each thalamic pathway, we found that non-specific inputs powerfully activate adapting (slow-responding) interneurons but weakly connect fast-spiking interneurons, whereas specific inputs exhibit opposite interneuron preference. Specific inputs thereby induce rapid feedforward inhibition that limits response duration, whereas, in the same area of the cortex, non-specific inputs elicit delayed feedforward inhibition that allows lasting recurrent excitation. Hence, target choice between slow and fast inhibitory neurons endows cortical networks with a simple and powerful computational solution to perform both sensory detection and integration.

Main text:

Cortical circuits can respond to incoming signals with high temporal precision, but can also exhibit persistent activity after removal of the stimulus (1). The cellular and network properties allowing different inputs to induce brief or long-lasting responses in the same cortical area are still poorly understood. The thalamus is the major information gateway to the cerebral cortex. It comprises “specific” nuclei that convey sensory inputs and “non-specific” nuclei that are believed to signal information on the environmental and behavioral context (2,3). Cortical inhibitory neurons shape the dynamics of cortical responses and are broadly classified as fast-spiking (FS) and adapting (Ad, also termed regular-spiking) interneurons (4,5,6). Specific thalamocortical (TC) inputs strongly excite FS interneurons responsible for a prominent feedforward inhibition that translates into brief cortical responses, well suited to detect changes in the sensory flow [(7,8,9), see *Fig.S1A*]. Although Ad interneurons are diverse, they collectively exhibit conspicuously slower intrinsic and synaptic activation time constants than FS interneurons (4,5,10,11) and are thought to mediate primarily cortico-cortical feedback inhibition (12,13). The tortuosity of non-specific TC projections has hampered dissection of their properties in TC slices, but the development of optogenetic tools now allows overcoming this limitation (14,15). Projections of the non-specific rhomboid (Rh) nucleus, involved in spatial cognition (16,17,18), and of the ventrobasal (VB) somatosensory relay nucleus converge onto associative area of the parietal cortex (2,19). Using optogenetic paradigms in slices of parietal cortex coupled with a computational approach, we show that specific VB and non-specific Rh inputs both robustly connect excitatory neurons, but differentially recruit FS and Ad interneurons with opposite consequences on neuronal network dynamics.

Expression of channelrhodopsin in Rh neurons

Transduction of Rh neurons with a lentivirus driving expression of channelrhodopsin 2 (ChR2) fused to YFP (20) resulted in strong labeling of the Rh nucleus (*Fig.1A*). YFP+ cell bodies were circumscribed to the Rh nucleus, whereas fluorescence observed in neighbor centromedian and reuniens nuclei was essentially due to labeled fibers. Transduced Rh neurons exhibited rebound depolarization and action potential bursts typical of thalamic neurons [(21,22), *Fig.1A*, n=8] and expressed ChR2-YFP at the plasma membrane. Likewise, photostimulation (see methods) consistently induced bursts of action potentials (n=8) and trains of photostimuli (10 Hz) elicited repetitive inward currents of sustained amplitude (*Fig.1A*, n=3). The identity of transduced Rh neurons was further assessed by their responsiveness to orexin [(20,23), *Fig.S2*]. Hence, a large proportion of Rh neurons expressed functional ChR2 without conspicuous alteration of their membrane properties.

Rh TC inputs strongly target infragranular cortical layers

We recorded neurons in the medial parietal cortex, which receives Rh TC projections with large vertical extent [(19,20), *Fig.1B* and *Fig.S3*]. All neurons recorded throughout this study were morphologically examined following revelation of intracellular biocytin. The mean density of YFP+ Rh TC fibers was maximal in layer VIa (L6a), smoothly decreased to reach minimal value in L2/3 and showed a sharp peak in L1 (n=6 slices, *Fig.1B* and *Fig.S3*). Light pulses (1-2 ms) consistently evoked photo-induced EPSCs (pEPSCs) in L6a pyramidal neurons (n=41). The pEPSCs were blocked by application of glutamatergic antagonists

CNQX and AP-5 (n=9) or TTX (n=6, *Fig.S4*), showing they were due to glutamate release elicited by photoactivation of ChR2-expressing Rh axons. We used two strategies to isolate direct pEPSCs (i.e. the Rh TC synapse) from recurrent corticocortical activity [(20), *Fig.S4*]. We performed recordings in the presence of TTX and 4-AP, which allows the triggering of presynaptic glutamate release by ChR2 while blocking network activity (24,25). Alternatively, because TTX-4AP precludes high frequency stimulation and alters kinetics of glutamatergic transmission, we reduced photostimulus intensity to obtain monosynaptic events with little contamination from recurrent polysynaptic activity. Using this latter protocol, we found that Rh TC synapses involve both AMPA and NMDA receptors and markedly depress upon repetitive stimulation, similar to TC synapses from specific nuclei [(20,26-28), *Figs. S5, S6, S7*]. In order to compare Rh TC inputs to different cortical layers, we recorded 3-5 cells in a vertical row of each slice in the presence of TTX-4AP (*Fig.1B*). Cells were identified as excitatory or inhibitory based on their morphology, electrophysiological properties and dendritic spine density, with subclassification into FS and Ad interneurons assessed by the presence (FS) or absence (Ad) of parvalbumin [(4,5,20,29), *Fig.1B, Figs.S8-S9*]. Responsiveness of neurons roughly followed the profile of Rh TC fiber density with significant differences between layers (*Fig.1B*; e.g. L6a > each other layer, L4 < layers I, V and VIa, $p < 0.05$). Responses were minimal in layers II/III and IV (24.2 ± 10.3 pA and 13.3 ± 3.9 pA, n=12 and 13, respectively) with substantial proportions of unresponsive neurons (25 and 31 %, respectively). Responsiveness increased in L5 (57.9 ± 19.3 pA, 13% unresponsive cells, n=15), reached a maximum in L6a (185.1 ± 39.4 pA, 5 % unresponsive cells, n=21) and declined in L6b (11.6 ± 3.6 pA, 14 % unresponsive cells, n=7). All cells in L1, which contains only interneurons, responded to photostimulation, consistent with the peak of Rh fiber density in this layer, but with moderate intensity (35.7 ± 7.9 pA, n=10). Responsiveness of L2/3 interneurons was similar to that of L2/3 pyramids (7.3 ± 2.2 pA, 33 % unresponsive cells, n=12). Hence, Rh TC inputs strongly target infragranular layers but virtually avoid L4, similar to other non-specific nuclei but in marked contrast with specific inputs, which prominently connect L4 in addition to infragranular layers (30-33). This suggests that non-specific thalamic nuclei generally have little influence on the primary integration of sensory information in L4, but participate in its downstream processing by infragranular layers.

Rh and VB TC inputs exhibit opposite preference for FS and Ad interneurons

Photostimulation of Rh TC fibers elicited responses in a majority of FS and Ad interneurons of infragranular layers in TTX-4AP condition (87% of FS and 94% of Ad neurons, n=15 and n=33, respectively), but of markedly smaller amplitude in FS interneurons. Indeed, the response amplitude of Ad interneurons (159 ± 40 pA) was comparable to that of pooled infragranular pyramidal neurons (132 ± 26 pA, n=36), whereas responses of FS interneurons were significantly smaller (37 ± 11 pA, $p < 0.05$, *Fig.2A*). Further experiments performed in L6a under control condition confirmed that Rh TC connections onto pyramidal and Ad neurons are much stronger than on FS interneurons, which nonetheless receive prominent recurrent excitation [(20), *Fig.S10*]. The contrasting situation reported for specific TC inputs, which powerfully connect FS interneurons (8,34), prompted us to compare the effects of selective photostimulation of Rh and VB TC fibers on neurons of infragranular layers of the parietal cortex [(20), *Fig.S3*]. Action potentials followed stimulation in all FS neurons tested, but with a much shorter delay for VB than for Rh inputs (delay-to-spike= 4.1 ± 0.5 ms and

10.6 ± 1.5 ms, n=6 and 11, respectively, p<0.05, Fig.2B). This is consistent with a direct excitation of FS neurons by VB inputs and an indirect excitation of these neurons by Rh inputs. Conversely, spikes occurred in a majority of Ad neurons (6 out of 9) upon Rh fibers stimulation but only in a very small part of these neurons (1 out of 11) upon VB fibers stimulation. These results demonstrate that Rh inputs preferentially target Ad over FS interneurons and confirm that VB inputs exhibit opposite preference (13,34), as summarized in *Fig.S1B*.

Rh and VB TC inputs elicit different temporal sequences of excitation/inhibition

Spikes elicited by Rh inputs in Ad neurons occurred with a longer delay (8.9 ± 1.5 ms, n=6) than those triggered by VB inputs in FS neurons (4.1 ± 0.5 ms, n=6, p<0.05, Fig.2B), consistent with the different onset slopes of pEPSCs and spikes in these neurons (*Fig.S11*). We thus explored the consequences of differential targeting of FS and Ad interneurons by the two thalamocortical pathways on the inhibition of L6a pyramidal neurons. The onset of IPSCs was markedly delayed upon Rh fiber stimulation as compared to VB fiber stimulation (8.4 ± 1.0 ms and 4.5 ± 0.1 ms, respectively; p<0.05; Fig.2C) in spite of similar amplitudes (414 ± 116 pA and 629 ± 139 pA, n=16 and 15, p=0.2). Conversely, pEPSCs elicited by Rh and VB inputs did not differ significantly (delays to onset: 2.9 ± 0.2 ms and 2.6 ± 0.2 ms, amplitudes: 287 ± 85 pA and 269 ± 61 pA, n=16 and n=15, respectively; p > 0.2 for both). These results indicate that the differential recruitment of FS and Ad neurons by VB and Rh inputs results in fast and delayed feedforward inhibition, respectively. The post-stimulus time distribution of excitatory and inhibitory events (*Fig.2D*) shows that, upon VB stimulation, pyramidal cell EPSCs, FS neuron spiking and pyramidal cell IPSCs were arranged sequentially in a narrow time window. These results are consistent with VB inputs triggering rapid and synchronous firing of FS neurons, leading to fast feedforward inhibition that temporally limits network excitation, as described (7,8). Upon Rh TC stimulation, this well-arranged sequence was not observed and events occurred in a far broader time-window (*Fig.2D*). The largely overlapping distributions of EPSCs and IPSCs in pyramidal cells, and of these IPSCs and interneuron spiking, suggest that IPSCs resulted from both feedforward recruitment of Ad neurons and recurrent excitation of FS cells. These results indicate that the different weights of VB and Rh inputs onto FS and Ad interneurons result in different inhibition kinetics with opposite results on cortical dynamics.

Rh TC inputs induce sustained recurrent excitation

We next compared the decays of network activity evoked by VB and Rh TC inputs, by measuring response duration at 33 % of maximal amplitude (*Fig.3A*) in L6a pyramidal neurons. We found that 33% widths of Rh TC-induced EPSCs and IPSCs (51.5 ± 13.2 ms and 131.2 ± 17.9 ms, respectively; n=15) were about twice those measured upon VB TC stimulation (26.5 ± 2 ms and 61.4 ± 8.4 ms, n=14, p<0.05). The occurrence of sustained recurrent excitation upon Rh TC fiber stimulation was assessed by plotting action potentials recorded in L6a pyramidal neurons as a function of time after stimulus (n=6, *Fig.3B*). The plot of time-to-action potential exhibited a broad distribution with a maximum at 20 ms, with 82 % of action potentials being emitted within 40 ms post-stimulus, and action potential frequency only returning to values close to 0 after 60 ms post-stimulus. These results indicate that Rh inputs induce prolonged recurrent activities of the cortical network, in contrast with VB inputs.

Differential activation of FS and Ad interneurons in a mean-field model of the cortex

In order to assess the causal role of target interneuron preference in network response, we built a neural population model (Fig.3C) of the parietal cortex using the mean-field approach (35,36). The analytical solution of a reduced model comprising an excitatory population and an interneuron population with variable parameters (20) predicts the evolution of network activity as a function of interneuron properties (membrane time constants and strength of inhibitory feedback). FS have a faster membrane time constant than Ad interneurons, and a stronger coupling with pyramidal cells. We found that parameters corresponding to pyramidal-FS or pyramidal-Ad couples both result in stable systems that return to initial state but markedly differ in their characteristic relaxation time-constants (Fig.3C and *Fig.S12*). Following thalamic stimulation, the pyramidal-FS network quickly relaxes to its basal activity. In contrast, the pyramidal-Ad network slowly decays to its initial state due to recurrent activity. The decay is associated with damped oscillations, whose frequency depends on the biophysical properties of interneurons (*Fig.S12*). We next simulated a detailed mean-field model comprising the three populations (pyramidal, FS and Ad), and additionally taking synaptic dynamics into account (20). Rh and VB inputs equally target pyramidal cells, but preferentially activate Ad (Rh) or FS (VB) interneurons, according to experimental data. Upon VB stimulation the model rapidly relaxes to its initial state (Fig.3D) as a consequence of FS interneuron-mediated fast feedforward inhibition. Conversely, Rh stimulation evokes a long-lasting recurrent activity of the network with an oscillatory component (Fig.3D and *Fig.S12*), confirming that targeting of Ad interneurons is responsible for prolonged responses of the networks as a result of delayed feedforward inhibition.

Our findings reveal an unsuspected role of interneuron diversity and of thalamic target-preference in the variety of cortical dynamics underlying sensory processing. The distinctive intrinsic and synaptic activation time-constants of FS and Ad interneurons are well described (4,5,10,11), but the consequences of their differential recruitment on the time course of cortical responses have been overlooked. Earlier studies established the critical role of FS interneuron-mediated fast feedforward inhibition in limiting the duration of cortical responses to specific thalamic inputs (7,8). These brief responses are well adapted to the detection of sensory stimuli with high temporal fidelity. We now show that Ad interneurons do not merely serve in cortico-cortical inhibition, but are also major targets of Rh inputs mediating delayed feedforward inhibition that permits prolonged cortical responses (*Fig.S1B*). Non-specific thalamic inputs convey information on the behavioral and environmental context that likely relies on persistent activity in cortical circuits. We found that Rh inputs induce a slowly decaying recurrent excitation, which forms a mnemonic trace of past activation on a time scale relevant to behavior. This lasting response presumably modifies the processing of specific sensory thalamic information by the cortical network, as reported for responses to non-specific contralateral TC inputs (37), and may thus underlie cortical integration of contextual information. We demonstrate that differential targeting between FS and Ad interneurons is the key determinant of the different duration of cortical responses to VB and Rh inputs. Hence, our results show that target choice between slow- and fast-activating interneurons endows cortical circuits with a simple and powerful computational solution to perform both sensory detection and integration. The co-existence of neurochemically distinct slow- and fast-activating inhibitory neurons is assessed in multiple regions of the central nervous system (38-

40) and thus appears to be a widespread built-in property of neural networks. This suggests that the differential targeting of inhibitory neuron populations by incoming projection pathways can implement two complementary computations, derivation and integration, in local microcircuits throughout the central nervous system.

References and notes:

1. A. Goel, D. V. Buonomano, *Philos Trans Soc Lond B Biol Sci* **369**, 1637 (2014).
2. E. Jones, in *The Thalamus 2nd Edition*, E. Jones, Eds (Cambridge University Press, Cambridge, 2007), vol. 1, pp. 87-170.
3. Y. D. Van der Werf, M. P. Witter, H. J. Groenewegen, *Brain Res Brain Res Rev* **3**, 107 (2002).
4. Y. Kawaguchi, *J Neurosci* **15**, 2638 (1995).
5. B. Cauli *et al.*, *J Neurosci* **17**, 3894 (1997).
6. G. A. Ascoli *et al.*, *Nat Rev Neurosci* **9**, 557 (2008).
7. H. A. Swadlow, *Cereb Cortex* **13**, 25 (2003).
8. L. Gabernet, S. P. Jadhav, D. E. Feldman, M. Carandini, M. Scanziani, *Neuron* **48**, 315 (2005).
9. R. M. Bruno, B. Sakmann, *Science* **312**, 1622 (2006).
10. J. R. Geiger, J. Lübke, A. Roth, M. Frotscher, P. Jonas, *Neuron* **6**, 1009 (1997).
11. H. Hu, M. Martina, P. Jonas, *Science* **327**, 5961 (2010).
12. C. Kapfer, L. L. Glickfeld, B. V. Atallah, M. Scanziani, *Nat Neurosci* **6**, 743 (2007).
13. M. Beierlein, J. R. Gibson, B. W. Connors, *J Neurophysiol* **90**, 2987 (2003).
14. F. Zhang, A. M. Aravanis, A. Adamantidis, L. de Lecea, K. Deisseroth, *Nat Rev Neurosci* **8**, 577 (2007).
15. S. J. Cruikshank *et al.*, *J Neurosci* **32**, 17813 (2012).
16. J. R. Hembrook, R. G. Mair, *Hippocampus* **21**, 815 (2011).
17. M. Loureiro *et al.*, *J Neurosci* **32**, 9947 (2012).
18. T. Cholvin *et al.*, *J Neurosci* **33**, 8772 (2013).
19. R.P. Vertes, W. B. Hoover, A. C. Do Valle, A. Sherman, J. J. Rodriguez, *J Comp Neurol* **499**, 768 (2006).
20. Materials and methods are available as supporting material on *Science Online*.
21. H. Jahnsen, R. Llinás, *J Physiol* **349**, 205 (1984).
22. V. Crunelli, J. S. Kelly, N. Leresche, M. Pirchio, *J Physiol* **384**, 603 (1987).
23. L. Bayer *et al.*, *J Neurosci* **22**, 7835 (2002).
24. L. Petreanu, T. Mao, S. M. Sternson, K. Svoboda, *Nature* **457**, 1142 (2009).
25. C. Hull, H. Adesnik, M. Scanziani, *J Neurosci* **29**, 8991 (2009a).
26. Z. Gil, Y. Amitai, *J Neurophysiol* **76**, 2547 (1996).
27. M. Beierlein, B. W. Connors, *J Neurophysiol* **88**, 1924 (2002).
28. N. J. Bannister *et al.*, *J Neurosci* **25**, 5259 (2005).
29. A. Peters, E. G. Jones, in *Cerebral cortex*, A. Peters, E. G. Jones, Eds. (Plenum, New York, 1984), vol. 1, pp. 107-121.
30. M. Herkenham, *Science* **207**, 532 (1980).
31. V. C. Wimmer, R. M. Bruno, C. P. de Kock, T. Kuner, B. Sakmann, *Cereb Cortex* **20**, 2265 (2010).
32. H. S. Meyer *et al.*, *Cereb Cortex* **20**, 2287 (2010).
33. C. M. Constantinople, R. M. Bruno, *Science* **340**, 1591 (2013).
34. S. J. Cruikshank, T. J. Lewis, B. W. Connors, *Nat Neurosci* **10**, 462 (2007).
35. H. R. Wilson, J. D. Cowan, *Biophysic J* **12**, 1 (1972).
36. P. Dayan, L. F. Abbott, in *Theoretical neuroscience*, P. Dayan, L. F. Abbott, Eds. (The MIT press, Cambridge, 2001), vol. 1, pp. 1-150.
37. R. R. Llinas, E. Leznik, F. J. Urbano, *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 449 (2002).
38. Y. Kawaguchi, C. J. Wilson, S. J. Augood, P. C. Emson, *Trends Neurosci* **18**, 527 (1995).
39. L. Sosulina, S. Graebenitz, H. C. Pape, *J Neurophysiol* **104**, 617 (2010).
40. T. Yasaka, S. Y. Tiong, D. I. Hughes, J. S. Riddell, A. J. Todd, *Pain* **151**, 475 (2010).

41. U. Maskos *et al.*, *Nature* **436**, 103 (2005).
42. F. J. Sigworth, *J Physiol* **307**, 97 (1980).
43. A. Destexhe, Z. F. Mainen, T. J. Sejnowski, in *Methods in Neuronal Modeling*, C. Koch, I. Segev, Eds (The MIT press, Cambridge, 1998), pp. 1-25.
44. N. Brunel, X. J. Wang, *J Neurophysiol* **90**, 415 (2003).
45. A. Karagiannis *et al.*, *J Neurosci* **39**, 3642 (2009).
46. J. R. Gibson, M. Beierlein, B. W. Connors, *Nature* **402**, 75 (1999).
47. G. Tamas, E. H. Buhl, P. Somogyi, *J Neurosci* **17**, 6352 (1997).
48. P. Ascher, P. Bregestovski, L. Nowak, *J Physiol* **399**, 207 (1988).

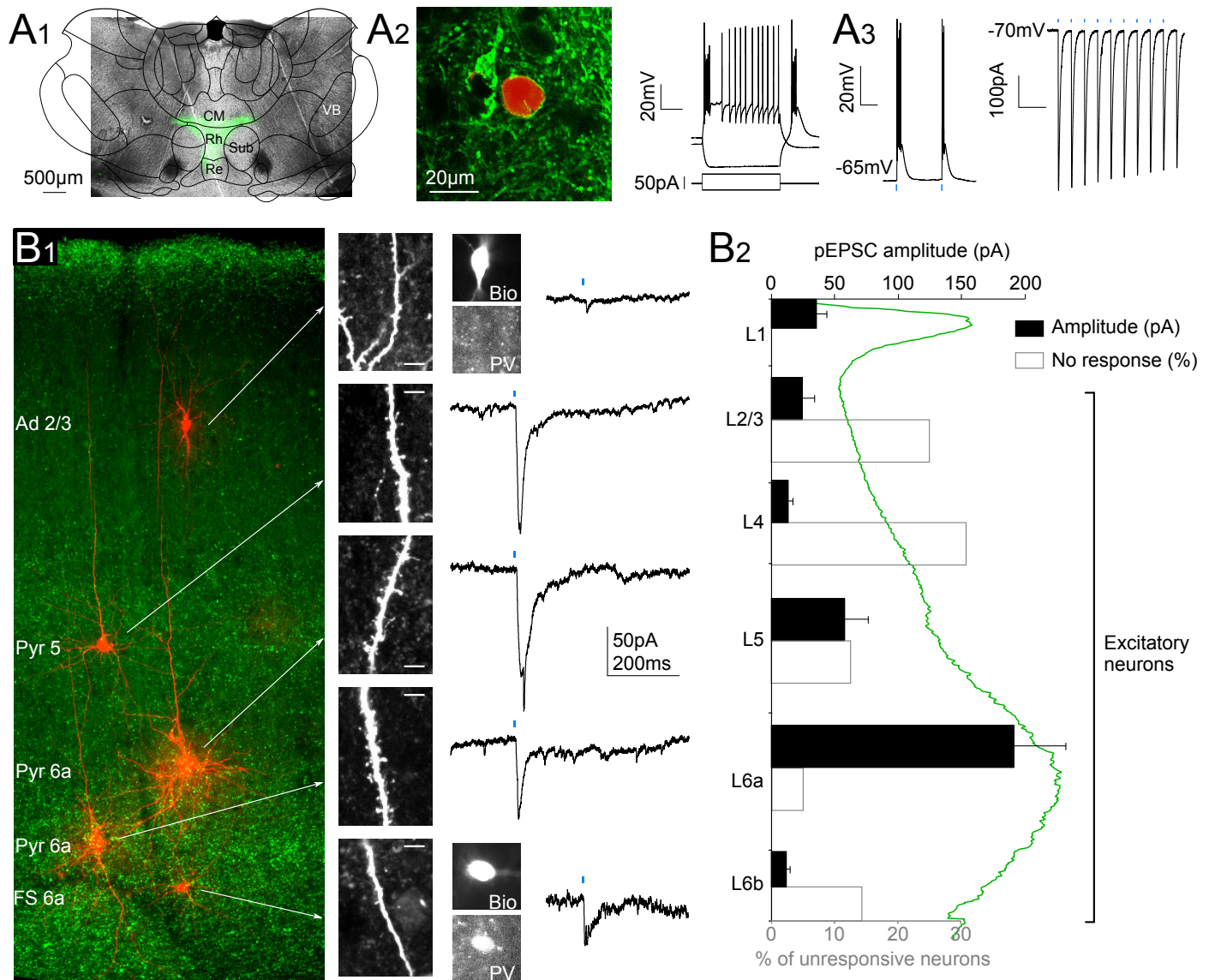


Figure 1: Optogenetic mapping of the cortical targets of Rh thalamic neurons

(A1) Combined infrared and fluorescence picture showing expression of ChR2-YFP (green) in the Rh nucleus after viral transduction. The superimposed section of the rat brain atlas delineates thalamic nuclei (CM: centromedian, Re: reuniens, Sub: submedialis). (A2) Single confocal section of a recorded Rh neuron (red) expressing ChR2-YFP at the plasma membrane and responses of this neuron to current step injections. (A3) Responses of ChR2-expressing Rh neurons to photostimulation (1ms light pulses, blue bars). (B1) *Left*: Composite confocal reconstruction of a strip of parietal cortical slice showing ChR2-expressing Rh TC fibers (green) in all layers and neurons (red) recorded in the presence of TTX and 4AP. Recorded cells were identified according to dendritic spine density as excitatory neurons (high density) or interneurons (low density). The sparsely spiny L2/3 cell was classified as Ad interneuron based on its absence of parvalbumin (PV) immunolabeling, whereas the PV+ aspiny cell in L6a was identified as an FS interneuron. *Right*: Direct pEPSCs recorded in these neurons upon photostimulation (blue bars) of Rh fibers in the presence of TTX and 4AP. (B2) Mean amplitude of direct pEPSCs recorded in the presence of TTX and 4AP and proportion of neurons showing no response to photostimulation across layers in L1 interneurons and L2-6 excitatory neurons. Note that neuron responsiveness roughly followed the mean fluorescence intensity profile of Rh fibers (green, n=5 slices) and was minimal in layer IV.

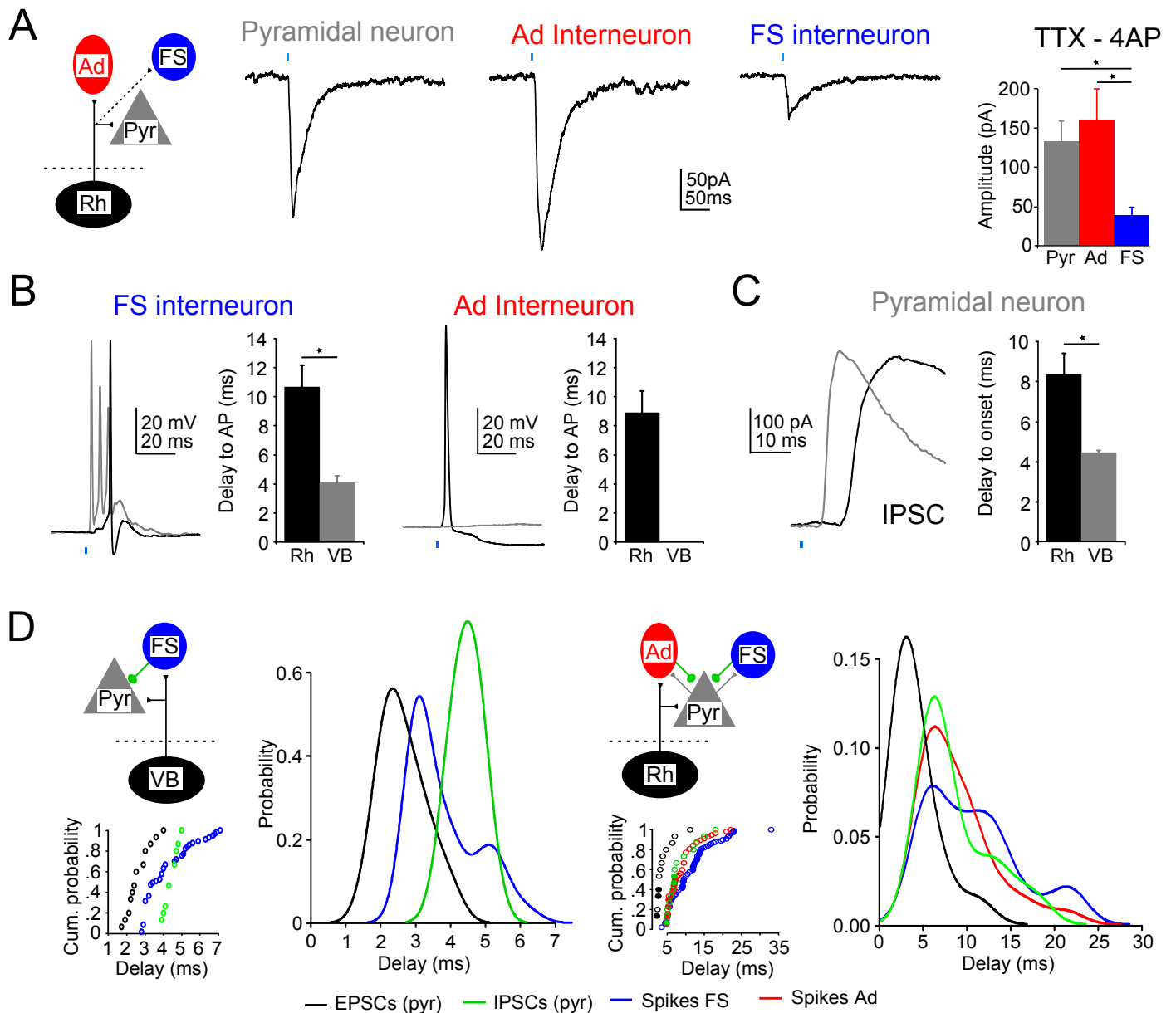


Figure 2: Rh and VB TC inputs differentially target FS and Ad interneurons and elicit different temporal sequences of excitation/inhibition

(A) **Left:** Examples of Rh TC pEPSCs recorded in TTX-4AP conditions in infragranular pyramidal, Ad and FS neurons. **Right:** Mean amplitude of direct Rh TC pEPSCs in the three neuron types. (B) Examples of FS and Ad interneurons activation and mean delay-to-spike upon Rh or VB fiber photostimulation. Note that action potential (AP) discharge in FS interneurons is delayed upon Rh stimulation compared to VB stimulation and that VB stimulation does not induce firing of Ad interneurons. (C) Post-stimulus latencies of IPSCs in pyramidal neurons. (D) Plots summarizing delays-to-onset of EPSCs and IPSCs in pyramidal neurons and delays-to-spike in FS and Ad interneurons for the two thalamocortical pathways. Upon VB stimulation, EPSC, FS firing and IPSC are arranged sequentially in a narrow time-window. Upon Rh stimulation, events occur in broad time-window and their distributions largely overlap.

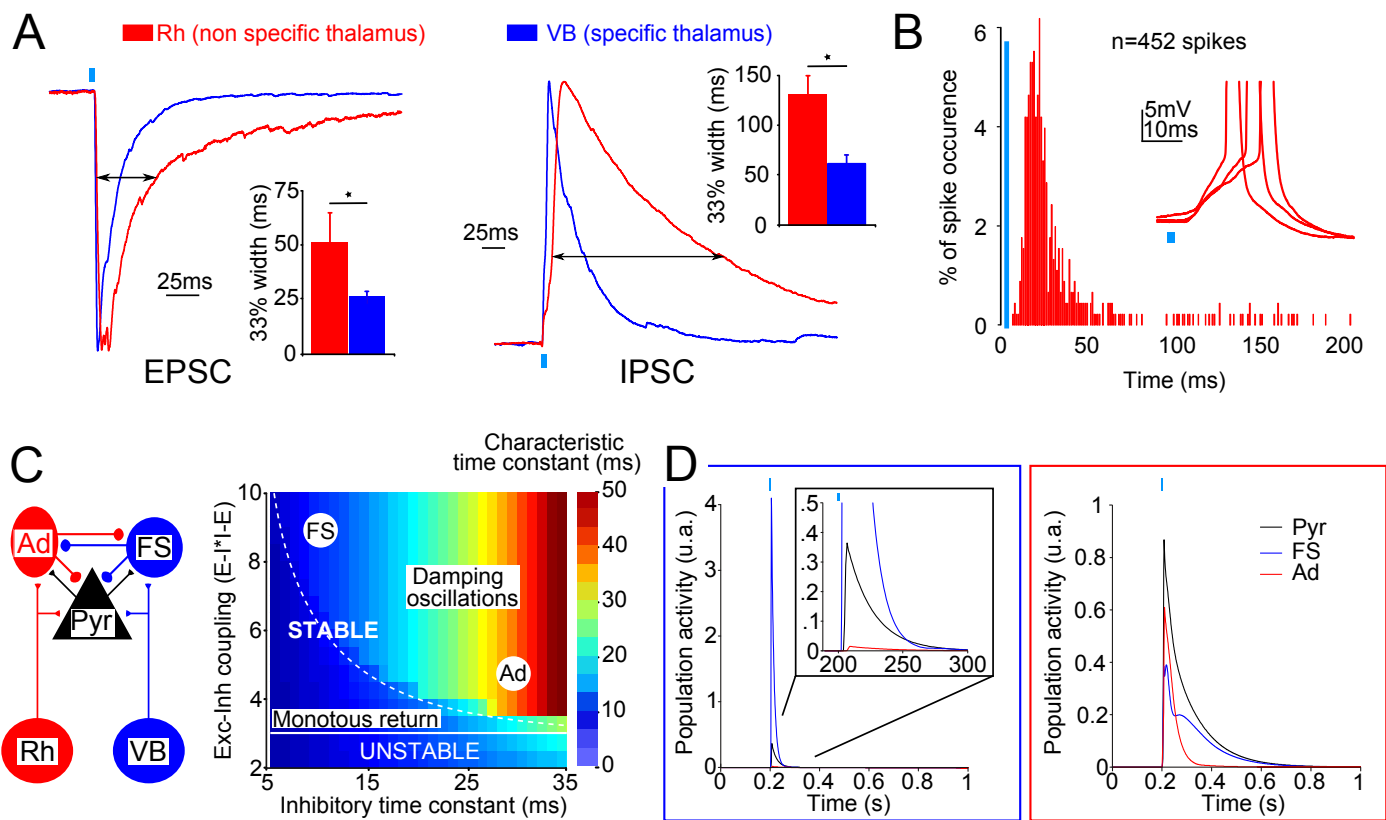


Figure 3: Differential activation of FS and Ad interneurons leads to distinct time-course of cortical responses

(A) Superimposed traces of normalized EPSCs and IPSCs elicited in L6 pyramidal neurons by stimulation of either VB or Rh TC fibers and plot of their mean durations at one third of maximal amplitude (black arrows on traces). (B) Post-stimulus latencies of action potentials recorded in L6 pyramidal neurons ($n=6$) following Rh fiber stimulation. Note the broad distribution of spike latencies, exemplified in inset, and that the spike frequency only returned to 0 after 60 ms post stimulus. (C) *Left*: cartoon depicting the two thalamocortical circuits used to build a mean-field model that predicts the firing rates of the neuronal populations as a function of their intrinsic properties, cortical connectivity and thalamic inputs. *Right*: a reduced model comprising only an excitatory and an inhibitory population predicts that the system is unstable below a certain inhibitory feedback, but otherwise returns to its initial state (stable) with a time constant that depends on the properties of inhibitory neurons. Note that parameters corresponding to pyramidal-FS and pyramidal-Ad couples result in stable systems that markedly differ in their relaxation time-constants. (D) Examples of the responses of a detailed mean-field model comprising the three neuronal populations following VB (left) and Rh (right) input stimulation (light blue bars, 1ms). Note the different time courses of pyramidal neuron population activity elicited by VB and Rh inputs.

Supplementary materials

Materials and Methods p1

Supporting Results p9

Supplemental References p14

Supplemental Figure Legends p15

MATERIALS AND METHODS

Expression of Channelrhodopsin in neurons of the rhomboid and ventrobasal thalamic nuclei

All experiments were carried out in accordance with the guidelines published in the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and animal protocol has been approved by the local ethic committee (Ce5/2014/00189). Recombinant lentivirus was chosen as an expression vector for these experiments because of its large size/small diffusion. Lentivirions encoding a fusion protein containing channelrhodopsin 2 (ChR2) and a yellow variant (YFP) of the green fluorescent protein (GFP) from *Aequoria victoria* [pLenti-synapsin-hChR2(H134R)-EYFP-WPRE, (14)] were prepared by the platform of the Network for Viral Transfer of the Ecole des Neurosciences de Paris (P24 titer: 50-150 mg/mL) as described (41). Male wistar rats (Janvier, 12-13 days old) were deeply anesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine and xylazine (25 mg and 2.5 mg per kg body weight respectively). Rats were restrained in a stereotaxic apparatus (David Kopf instruments). The skull was exposed under aseptic conditions and a small burr hole was drilled at coordinates AP = -1.8 mm and ML = 1.8 mm relative to bregma for the rhomboid (Rh) nucleus and AP = -1.8 mm and ML = 2.6 mm relative to bregma for the ventrobasal (VB) nucleus. The lentivirion suspension (0.8 to 1.5 μ L) was injected with a canula (36G70 (canula) and 26G50 (guide) from Cooper) at a depth of 5.5 mm and with an angle of 20° from the medial plane in the Rh nucleus or at a depth of 5.1 mm without angle in the VB nucleus. The canula was slowly pulled out 5 minutes after the end of the injection and the skull skin was sutured. Animals were allowed to recover with their mother and were housed in a BL-2 facility for at least 3 weeks with free access to food and drink.

Slice preparation

Three to four weeks after injection, rats were deeply anesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine and xylazine (100 mg and 25 mg per kg body weight respectively) and 120 U of heparine (Sigma) was injected in the left heart to prevent coagulation. Then, rats were intracardiacally perfused with cold (4°C) sucrose artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing (in mM): sucrose 30, glucose 2.5, NaCl 126, 2.5 KCl, NaHPO₄ 26, NaH₂PO₄ 3, MgCL₂ 3 and kynurenic acid 3. Brains were quickly removed and coronal slices (300 μm thick) were prepared in sucrose ACSF using a vibratome (VT1000S, Leica). Slices were transferred in a chamber containing standard ACSF saturated with 95% O₂ and 5% CO₂. The composition of the standard ACSF was (in mM): 126 NaCl, 2.5 KCl NaHPO₄ 26, NaH₂PO₄ 3, MgCL₂ 1, CaCl₂ 2, sucrose 10, glucose 10. Slices were allowed to recover for 1 hour at 37°C and were then incubated at room temperature (20–25°C) until recording.

Photostimulation

ChR2-YFP-expressing neuronal somata and fibers were visualized with a 535 nm LED (CoolLed) and an YFP filter set (YFP-2427B-000, Semrock). Photoactivation of ChR2 (1-2 ms light pulses) was performed through a GFP filter set (Olympus) using a 465 nm LED (maximal light power, 1.5 mW/mm²) driven by the data-acquisition software pClamp 10.2 (Molecular Devices) through the Digidata interface board.

Whole-cell recordings

Slices were transferred to a recording chamber and continuously superfused at 2 ml/min with oxygenated standard ACSF at room temperature. Patch pipettes (3–6 MΩ) were pulled from borosilicate glass (Harvard Apparatus LTD) on a micropipette puller (Model PP-83, Narishige) and filled with 8 μl of internal solution containing (in mM): 144 K-gluconate, 3 MgCl₂, 10 HEPES, 0.5 EGTA and 3 mg/mL biocytin. The pH was adjusted to 7.2 and the osmolarity to 295 mOsm. For some experiments, we used a Cs-based internal solution containing (in mM): 130 Cs-gluconate, 3 MgCl₂, 10 HEPES, 10 EGTA and 2 mg/mL biocytin. Recordings began 8-10 minutes after passing into whole-cell configuration to allow the diffusion of the cesium and the blockade of potassium channels. Whole-cell patch-clamp recordings were made from neurons visualized under infrared videomicroscopy with Nomarski optics. Whole-cell recordings were performed at room temperature (20-25°C) using a patch-clamp amplifier (Multiclamp 700B, Molecular Devices) connected to a Digidata 1440A interface board (Molecular Devices). Signals were amplified and collected using the

data-acquisition software pClamp 10.2. Resting membrane potential was measured just after passing into whole-cell configuration, and only cells with a resting membrane potential more hyperpolarized than -50 mV were selected. Membrane potentials were not corrected for junction potential. For the test of their firing behavior, cells were maintained at -60 mV by continuous current injection and submitted to depolarizing current pulses. For the recording of post-synaptic potentials, cells showing a variation of access resistance of more than 20% were excluded from the study. Recordings of post-synaptic currents were performed at a holding potential of -60 mV unless otherwise stated. Signals were filtered at 1-5 kHz, digitized at 20 kHz, saved to a personal computer, and analyzed off-line with Clampfit 10.2 software (Molecular Devices). Responses to single or repetitive photostimulation were quantified with respect to the baseline immediately preceding the photostimulus. Delays-to-onset of EPSCs were measured from the beginning of the photostimulus. Results are presented as mean \pm standard error of mean. Between-group comparisons were performed using Mann-Whitney nonparametric or parametric test that does not assume equal standard deviations. A p.value below 0.05 was considered statistically significant.

AMPA/NMDA ratio

To determine the AMPA/NMDA ratio of thalamocortical EPSCs, layer VI pyramidal neurons were recorded with an intracellular solution containing (in mM): 130 CsGluconate, 3 MgCl₂, 10 HEPES, 10 EGTA and 2 mg/mL biocytin. The pH was adjusted to 7.2 and the osmolarity to 295 mOsm. Recordings began 8-10 minutes after passing into whole-cell configuration to allow the diffusion of the intracellular solution and the blockade of potassium channels. Photo-induced EPSCs (pEPSCs) were recorded at -70 and $+50$ mV, corresponding to -81 and $+39$ mV after correction of the junction potential (11 mV in our conditions) in the presence of GABA_A receptor antagonist (Gabazine, 1 μ M). Repetitive photostimulation (150-300 trials, interstimulus interval 1.5 s) was performed at each potential. The intensity of the photostimulation was adjusted just below the threshold generating polysynaptic activity and mixed mono/polysynaptic events that sometimes occurred were discarded from the analysis. Only EPSCs occurring within 5ms after the photostimulus were considered. Measurements of AMPAR and NMDAR-mediated currents were based on the assumptions that (i) currents measured at -70 mV are AMPAR-mediated (due to the voltage-dependent block of NMDAR currents), (ii) the time-to-peak of AMPAR currents is the same at -70 mV and at $+50$ mV, and (iii) NMDAR currents can be measured at $+50$ mV due to their slower decay with respect to AMPAR currents. Baseline-subtracted pEPSCs (20 to 150 individual events) were averaged

at each potential. The time-to-peak of the AMPA current was measured at -70 mV. The amplitude of the AMPA current at +50 mV was measured at its extrapolated time-to-peak. The NMDA current was measured on a 10 ms time-window beginning 40 ms after the photostimulus.

Non-stationary noise analysis

To determine the properties of single channels involved in AMPAR- and NMDAR-mediated pEPSCs, non-stationary noise analysis was performed on fully discriminated mono-synaptic events as described (42). pEPSCs were recorded at -70 mV using KGluconate intracellular solution (AMPA) or at +50 mV using CsGluconate intracellular solution (NMDAR). The intensity of the photostimulation (150-300 trials, interstimulus interval 1.5 s) was adjusted just below the threshold generating polysynaptic activity (corresponding to 1-3% of maximal light intensity) and mixed mono/polysynaptic events that sometimes occurred were discarded from the analysis. Only EPSCs occurring within 5ms after the photostimulus were considered. Roughly 100 individual pEPSCs were selected for the non-stationary noise analysis of each neuron. pEPSCs were aligned on the photostimulus and analysis was performed on the decaying phase of pEPSCs. Currents were normalized to the mean peak amplitude and the variance over time of the decay phase was determined using the clampex software (Molecular Devices). Baseline noise variance was subtracted. A time-to-time plot of the variance at time t ($\sigma^2(t)$) as a function of the averaged current amplitude at time t ($I_{Amp(t)}$) was fitted by a parabolic curve (2 magnitude polynomial function) of the form:

$$\sigma^2(t) = -I_{Amp}^2(t)/N + i \cdot I_{Amp}(t)$$

where i is the elementary current of the receptor channel, N is the total number of channels and $\sigma^2_{baseline}$ is the variance of the baseline noise. Then, the single channel conductance (γ) was calculated as follows:

$$\gamma = i \cdot (V_{hold} - E_{Na^+/Ca^{2+}})$$

where $V_{hold} = -80mV$ after correction for the junction potential (11mV) and $E_{Na^+/Ca^{2+}} = 0mV$.

Drugs

Drugs and chemicals were obtained from Sigma Aldrich except tetrodotoxin (TTX) from Latoxan and orexin B from Tocris. All drugs were applied through the bath perfusion.

Intracellular labeling and immunohistochemistry

After electrophysiological recordings, slices were fixed overnight at 4 °C in 4 % paraformaldehyde/ 0.1 M phosphate buffer pH 7.4 and then rinsed in phosphate buffer saline (PBS). Residual aldehyde was inactivated by incubation with 50 mM NH₄Cl/PBS solution for 10 min at room temperature followed by several washes in PBS. Slices were blocked for 2h in PBS-GT (gelatine, 2%; triton, 0.25%) and then incubated with chicken anti-GFP antibody (1:2000, Aves labs) and mouse anti-PV (1:1000, Sigma Aldrich) for 3 days at 4°C. After several wash in PBS-GT, slices were incubated overnight at 4°C with donkey anti-chicken Alexafluor488 (1:400; Jackson immunoresearch), anti-mouse Alexafluor 647 (1:400; Invitrogen) and streptavidin Alexafluor 555 (1:400, Invitrogen) diluted in PBS-GT. Slice were washed in PBS, then incubated 20 min with DAPI (100 ng/mL, Invitrogen) and thereafter extensively washed in PBS. Finally, slices were mounted on gelatin-coated slides in Fluoromount-G (Southernbiotech). Fluorescence images were acquired with a laser scanning confocal microscope (SP5, Leica) using 488 and 561 nm lasers, and analyzed using ImageJ.

Mean field modeling of thalamic inputs onto the cortical network

In order to assess the computational and functional consequences of the experimental data, we built a neural population model of the parietal cortex using the mean-field approach (35,36). In a first time, we aim at deciphering the dynamical consequences of the biophysical properties of the different interneurons of the parietal cortex. We consider the simplest possible models for excitatory-inhibitory interactions, with a single inhibitory population, where the instantaneous firing rates of each population at time t , $R_a(t)$, is given by:

$$\tau_a \frac{dR_a(t)}{dt} = -R_a(t) + [J_{a,e}R_e(t) - J_{a,i}R_i(t)]_+ \quad (1)$$

where τ_a denotes the time constant of firing dynamics of the neurons in population $a =$ (*excitatory, inhibitory*), the strength $J_{a,b}$ represents the average synaptic conductance from neural population b to a , and $[\]_+$ is the static transfer function, that we assumed to be threshold-linear ($[\ x]_+ = x$ if $x \geq 0$, and 0 otherwise) for simplicity. We used standard methods to solve the system analytically for expressing the steady state of network activity, its stability and the eigenvalues $\lambda_{1,2}$ in terms of biophysical parameters of the interneurons population:

$$\lambda = \frac{1}{2} \left(\frac{J_{ee}-1}{\tau_e} - \frac{J_{ii}+1}{\tau_i} \pm \sqrt{\left(\left(\frac{J_{ee}-1}{\tau_e} + \frac{J_{ii}+1}{\tau_i} \right)^2 - \frac{4FB}{\tau_e \tau_i} \right)} \right) \quad (2)$$

with $FB = J_{ie}J_{ei}$ is the strength of the coupling between inhibitory and excitatory populations. For this qualitative investigation, we chose a network with balanced excitation and inhibition ($J_{ee} + J_{ie} = J_{ei} + J_{ii}$) and non-trivial recurrent excitation ($J_{ee} > 1$ and for the figure in the Results, $J_{ee} = J_{ii} = 2$). We set $\tau_e = 20$ ms for the rest of this study. Then, equation (2) can be written as a function of the main differing parameters of the interneurons populations, τ_i and FB . Hence, we can express the dynamical properties of the model in terms of interneurons' biophysical parameters, as we briefly explain just below (see (35) for more information on stability analysis of network models). If one of the eigenvalues is positive, the system is unstable and the network's activity exponentially diverges from its initial condition. In this model, the instability arises from the excitatory feedback onto the excitatory population itself. If both eigenvalues are negative, the system is stable and the network's activity converges towards its steady state, which is silent in this model for simplicity. The eigenvalues describe the speed of exponential convergence (or divergence if the system is unstable) and provide the characteristic time constant of the system, here expressed as $\tau_c = \frac{1}{|\Re(\lambda)|}$. This time constant is of particular importance in this study, as it markedly differs for the networks embedding the different interneurons populations. If the eigenvalues are complex (i.e. with a non zero imaginary part) the behaviour of the network near its fixed point is oscillatory. In this model, oscillations arise in the case of a stable fixed point, hence the network's activity spirals into the fixed point, corresponding to damped oscillations. The imaginary part of the eigenvalue, divided by 2π , determines the frequency of the oscillations near the fixed point ($\omega = \frac{\Im(\lambda)}{2\pi}$).

We then investigated the dynamics of a more detailed mean-field model of cortical network, composed of three populations of neurons, one excitatory (pyramidal neurons, P) and two inhibitory (fast spiking F , and adapting A). The three populations ($i = P, F, A$) received average, time-dependent thalamic inputs from the non-specific rhomboid nucleus (Rh), $I_{a,Rh}(t)$ and from the specific ventrobasal (VB) nucleus $I_{a,VB}(t)$. These thalamic inputs are excitatory (Fig. 3), hence both $I_{a,Rh}(t)$ and $I_{a,VB}(t) \geq 0$ for $a = P, F, A$ and all t , but markedly differ in amplitude for the three populations, as we show in the rest of this study. The dynamics of thalamo-cortical synapses are included in the time-dependence of the input

currents. As we aim at providing a computational comparison of the two types of feedforward inhibition, we did not consider the dynamics induced by corticothalamic feedback. All other types of connections (recurrent and feedback) are potentially present in this model, with strength $J_{a,b}$ representing the average synaptic conductance from neural population b to a . In this case, the firing rates of each population at time t , $R_a(t)$ are:

$$\tau_a \frac{dR_a(t)}{dt} = -R_a(t) + [I_{a,Rh}(t) + I_{a,VB}(t) + J_{a,P}S_{a,P}(t) - J_{a,F}S_{a,F}(t) - J_{a,A}S_{a,A}(t)]_+ \quad (3)$$

where $S_{a,b}$ are the average synaptic currents from neural population b to a . Synaptic kinetics is known can play a fundamental role for the dynamical consequences of feedforward inhibition. We thus modelled synaptic currents dynamics by the following equations (43,44):

$$\tau_{X_{a,b}} \frac{dX_{a,b}(t)}{dt} = -X_{a,b}(t) + R_b(t - D_{a,b}) \quad (4a)$$

$$\tau_{S_{a,b}} \frac{dS_{a,b}(t)}{dt} = -S_{a,b}(t) + X_{a,b}(t) \quad (4b)$$

where $\tau_{S_{a,b}}$ and $\tau_{X_{a,b}}$ are respectively the decay and rise times of average synaptic currents from population b to a , and $D_{a,b}$ the delay-to-onset (from presynaptic spike to the onset of the post-synaptic current). Mean-field models of cortical networks usually consider two populations, one excitatory (represented by pyramidal neurons in this study) and one inhibitory. As demonstrated by our experiments, the inhibitory interneurons can be divided in two classes, as they differ by both their responses to thalamic inputs, and by their intrinsic properties. Fast-spiking (F) interneurons have a lower firing time constant ($\tau_F = 10$ ms) than pyramidal ones ($\tau_P = 20$ ms), and receive mostly specific thalamic inputs from the VB. Firing time constant of Adapting (A) interneurons is larger $\tau_A = 30$ ms. Furthermore, the A population receives a larger input from the non-specific thalamus (Rh nucleus). Thalamic inputs $I_{a,Rh}(t)$ and $I_{a,VB}(t)$ were built using the same equations (4a,b) as for cortical synaptic currents, with R_b reflecting the activation of the thalamic population ($b = Rh, VB$) during 1 ms. Parameters were fitted from this study, if available, or taken from the literature (5,8,13,27,45-47).

Parameters for the detailed model were

$J_{P,P} = 2$; $J_{P,F} = J_{F,P} = 1,5$; $J_{P,A} = J_{A,P} = J_{F,F} = J_{F,A} = J_{A,F} = J_{A,A} = J_{P,VB} = J_{P,Rh} = J_{A,Rh} = 1$;
 $J_{A,VB} = 0,1$; $J_{F,Rh} = 0,1$; $\tau_{X_{P,P}} = \tau_{X_{F,P}} = \tau_{X_{A,P}} = \tau_{X_{A,A}} = 1$ ms; $\tau_{X_{P,F}} = \tau_{X_{F,F}} = 1,5$ ms; $\tau_{X_{P,A}} = \tau_{X_{A,P}} = 2$
ms; $\tau_{X_{P,A}} = \tau_{X_{F,A}} = 2$ ms; $\tau_{X_{A,F}} = 3$ ms; $\tau_{S_{P,P}} = \tau_{S_{A,P}} = 7$ ms; $\tau_{S_{F,P}} = 4$ ms; $\tau_{S_{P,F}} = 10$ ms; $\tau_{S_{F,F}} = 6$ ms;
 $\tau_{S_{A,F}} = \tau_{S_{A,A}} = 23$ ms; $\tau_{S_{P,A}} = 12$ ms; $\tau_{S_{F,A}} = 8$ ms; all decay and rise times of thalamocortical
synapses were taken as 1 ms; except decay times of thalamocortical onto pyramidal cells, set
at 4,5 ms. All axonal delays of corticocortical connections were set at 1 ms. The detailed
model was solved numerically using forward Euler method with time step $dt = 0.01$ ms in
Matlab.

SUPPORTING RESULTS

Transduced neurons are sensitive to orexin

The midline Rh nucleus is a preferred thalamic target of the wake-promoting neuropeptides orexins (23). The identity of transduced Rh neurons was thus assessed by testing their sensitivity to orexin. In all transduced neurons tested ($n = 7$), application of orexin B (100 nM) converted responses to repetitive photostimulation into a tonic action potential discharge (**Fig.S2**), consistent with the slow and long-lasting effect of orexin B on the excitability of these neurons (23).

TC fiber density across cortical layers

Throughout this study, recordings were performed in the medial parietal cortex, which receives Rh TC fiber innervation with larger vertical extent than other cortical areas (19). The mean density of Rh TC fibers was estimated by measuring cortical anti-GFP immunofluorescence intensity following expression of ChR2-YFP in the Rh nucleus. Immunofluorescence was maximal in layer VIa, smoothly decreased to reach minimal value in layer II/III and showed a sharp peak in layer I ($n = 5$ slices, **Fig.S3A**). This result is consistent with the known distribution of Rh TC fibers across layers in this area (19). Conversely, the mean density of VB TC fibers in this area was maximal in layer IV and exhibited a smaller peak in layer VIa ($n = 6$, **Fig.S3B**), in agreement with earlier observations (31,32). To ensure localization of cortical layers, anti-GFP immunofluorescence was combined with DAPI staining, whose mean fluorescence profile peaked in layer IV ($n = 5$) where the maximal density of VB TC fibers was observed (**Fig.S3B**).

Responses to Rh TC fiber photostimulation

Throughout this study, neurons were visually selected based on their morphology, which was systematically confirmed using post-hoc revelation of intracellular biocytin. Pre- and post-synaptic properties of Rh TC synapses were characterized on pyramidal neurons of layer VIa, which exhibits the highest Rh TC fiber density. Brief light pulses (1-2 ms) consistently evoked photo-induced EPSCs (pEPSCs) in all recorded neurons ($n = 41$, **Fig.S4**). Application of glutamatergic antagonists CNQX and AP-5 abolished the pEPSCs, showing their glutamatergic nature ($n = 6$, **Fig.S4B**). While some pEPSC traces exhibited an essentially monophasic decay, others clearly showed the occurrence of polysynaptic activity. Indeed, the plot of mean delay-to-onset values obtained at maximal stimulation intensity ($n = 41$) showed

a main peak centered around 3 ms presumably corresponding to direct EPSC and responses with longer delays-to-onset consistent with indirect polysynaptic responses (**Fig.S4E**). In order to discriminate direct pEPSCs (i.e. the Rh TC synapse) from recurrent corticocortical activity, we used two strategies. First, we performed recordings in the combined presence of TTX and 4-AP (1 μ M and 1 mM, respectively, **Fig.S4C**) that allows the triggering of presynaptic glutamate release by ChR2 while blocking network activity (24,25). Responses were abolished upon application of TTX. Additional application of 4AP restored monophasic responses of roughly same amplitude as the direct pEPSCs recorded in control condition, but with slower onset and decay kinetics. Similar results were obtained on 5 additional neurons tested using this protocol. These effects of TTX and 4AP on light-induced currents are consistent with earlier observations (25). Although this protocol provides a reliable measure of direct pEPSC amplitude, it does not allow high frequency stimulation and deeply alters the kinetic properties of glutamatergic transmission. We thus used a second approach to reduce polysynaptic activity by decreasing stimulation intensity. When the stimulus intensity was gradually declined, the delay-to-onset remained stable until stimulation intensity was 20% of the maximum, and then smoothly increased to reach 7.6 ± 1 ms at 1% of maximal stimulation intensity (n = 6, **Fig.S4E**). A roughly parallel increase of pEPSC failure rate occurred to reach 25 ± 9 % at 1% of maximal intensity, consistent with a decrease of the release probability of the Rh TC synapse at weak stimulus intensity. We found that photostimulation intensities corresponding to 1-3% of the maximum were just below the threshold generating polysynaptic activity in layer VI neurons. Indeed, comparison of pEPSC waveforms at maximal and weak (1-3%) stimulus intensity showed a clear reduction of pEPSC complexity. The pEPSCs obtained at weak intensities exhibited essentially monotonous decays, indicating they were direct monosynaptic events with little contamination from recurrent polysynaptic activity. In order to define time-windows of direct events at weak (1-5%) stimulus intensity, we calculated the delay-to-onset of pooled pEPSCs (5.3 ± 0.45 ms, n = 6 neurons). We used a 5 ms window after weak stimulation to select direct pEPSCs whereas more delayed events were considered polysynaptic.

NMDA/AMPA ratio at the Rh TC synapse

The contribution of glutamate receptor-channel subtypes to Rh TC synapses onto layer VIa pyramidal cells was investigated using weak stimulation (see methods and above). pEPSCs were recorded at -70 mV (i.e. -81 mV after correction of the junction potential), where the contribution of NMDAR-mediated currents is minimal, and at +50 mV (i.e. +39 mV), where

both AMPAR and NMDAR contribute to synaptic currents. Indeed, pEPSCs recorded at -70 mV exhibited rapid decays, consistent with the fast kinetics of AMPARs, and were blocked by the AMPAR antagonist CNQX (10 μ M, n = 4, **Fig.S5**). Conversely, currents recorded at +50 mV additionally comprised a slow phase mediated by NMDARs, which was abolished by the NMDAR antagonist AP-5 (50 μ M, n = 4). An index of the NMDAR/AMPA current ratio at +50 mV was determined (see Methods), based on the observation that the mean time-to-peak of AMPAR-mediated currents exhibited similar values at -70 mV and +50 mV in the presence of AP-5 (5.3 ms and 5.6 ms respectively, n = 3). The extrapolated AMPAR-mediated current was 22.2 ± 6.4 pA and the NMDAR-mediated current measured on a 10 ms time-window beginning 40 ms after the photostimulus was 13.1 ± 3.9 pA, yielding an NMDA/AMPA ratio of 0.77 ± 0.06 (n = 11, **Fig.S5**). These synaptic properties are similar to those reported for inputs from specific thalamic nuclei and corticocortical synapses (26).

Properties of unitary AMPAR and NMDAR channels at the Rh TC synapse

Non-stationary noise analysis [(42), see Methods] was used to determine the properties of unitary AMPAR and NMDAR channels involved at the Rh TC synapse onto layer VIa pyramidal cells. This analysis was performed on responses obtained at -70 mV (AMPA) or +50 mV (NMDAR) as exemplified in **Fig.S6A** and **B**. For the neuron clamped at -70 mV, pEPSC amplitudes ranged between 13 pA and 58 pA (mean amplitude = 28.5 pA, **Fig.S6**). The mean variance of the baseline noise (1.51 pA², **Fig.S6**) was subtracted from the variance of pEPSC currents. The plot of the variance versus the mean amplitude was fitted with a parabolic equation, from which we calculated values of AMPAR single channel conductance, number of channels and their maximal probability of opening. Mean values of AMPAR single channel conductance, number of channels and maximal probability of opening were 11.5 ± 1.8 pS, 32 ± 6 and 0.90 ± 0.05 , respectively (n = 18), consistent with earlier report (Bannister et al., 2005). For pEPSCs recorded at +50 mV, similar analysis as above yielded values of NMDAR single channel conductance (40.5 ± 2.9 pS), number of channels (17 ± 4) and maximal probability of opening (0.87 ± 0.02 , n = 18, **Fig.S6**), in agreement with previous report (48).

Short-term depression of Rh TC inputs

The behavior of Rh TC responses upon trains of photostimuli was investigated in neurons from layers I and V-VI in control condition. Repetitive stimulation was performed in conditions (1 ms pulse, 10 Hz, 1s) where ChR2 desensitization is minimal (see **Fig.1**). Only

cells showing putative monosynaptic Rh TC responses (i.e. pEPSCs occurring within 4 ms post-stimulus, see plot in **Fig.S4E**) were considered. The amplitude at the first peak of the response or at the first marked inflexion of the onset slope was taken as an index of the amplitude of the monosynaptic pEPSC. Excitatory cells from layers V-VI were pooled (n=24) and layer I (n=6), FS (n=8) and Ad (n=18) interneurons analyzed separately. FS cells were segregated from Ad interneurons by their low input resistance, thin spikes, large after hyperpolarization, high maximal spiking frequency and parvalbumin immunoreactivity [(4,5), **Fig.S9**]. Examples of each group are shown in **Fig.S7**. In all cells, the amplitude of pEPSCs strongly decreased along the train. This decrease occurred already at the 2nd pulse except in the Ad interneuron. In this Ad interneuron, a slow inward current gradually developed during the train, whereas responses to each photostimulus returned to values close to baseline in the other cells exemplified. This slow inward current, which may result from the activation of metabotropic glutamate receptors, was observed in 4 out of 27 Ad interneurons but never in the other groups. In all cell groups, the mean amplitude of pEPSCs gradually decreased along the train to reach a roughly stable value at the 5th pulse (**Fig.S7**). These results are reminiscent of the short-term depression observed at TC synapses from specific thalamic nuclei (27). The pEPSC decrease occurred more rapidly in layer I and FS interneurons, in which responses to the 2nd pulse were markedly depressed, whereas the depression of excitatory and Ad neurons responses only became pronounced at the 3rd pulse. After the 4th pulse, the decrease of pEPSCs became similar in the four cell groups. These results suggest that the time course of short-term depression at Rh TC synapses exhibits moderate cell type-dependence.

FS and Ad interneurons exhibit different membrane properties

Interneurons were identified from their non-pyramidal morphology with aspiny/sparse spiny dendrites and were classified as parvalbumin-positive or -negative after post-hoc labeling (**Fig.S9**). Parvalbumin-positive interneurons presumably corresponded to FS neurons and conversely, parvalbumin-negative interneurons were considered as Ad interneurons (4,5). Furthermore, electrophysiological properties assessed identification of recorded cells as FS or Ad interneurons. In control conditions with K-gluconate intracellular solution, spike waveforms and firing patterns readily allowed discriminating between the two interneuron classes (4,5), as shown in **Fig.S9** for their action potential durations (0.68 ± 0.03 vs. 1.36 ± 0.06 ms at half amplitude, $p < 0.05$) and maximal firing rates (102 ± 5 vs. 38 ± 4 Hz, $p < 0.05$, for FS and Ad interneurons, n=13 and 18, respectively). Notably also, FS interneurons had a lower input resistance than Ad interneurons (223 ± 31 vs. 361 ± 26 M Ω , n=13 and 18,

respectively; $p < 0.05$) and this difference was also observed with Cs-gluconate intracellular solution (150 ± 17 vs. 248 ± 18 M Ω , $n=6$ and 6 , respectively; $p < 0.05$) or in the presence of TTX-4AP (198 ± 17 vs. 290 ± 30 M Ω , $n=10$ and 10 , respectively; $p < 0.05$). Finally, the occurrence of spontaneous EPSCs was higher in FS than in Ad interneurons (9.4 ± 1.5 vs. 2.1 ± 0.3 Hz, $n=19$ and 24 , respectively; $p < 0.05$).

Rh TC inputs onto pyramidal and Ad neurons are stronger than on FS interneurons

The relative strength of Rh TC inputs onto layer VIa FS, Ad and pyramidal neurons was probed in control condition by estimating the relative weight of direct and recurrent excitation onto these neurons. This was performed by measuring the ratio of putative direct (i.e. occurring within 4 ms time-window, see plot **Fig.S4E**) versus maximal response amplitudes (**Fig.S10**). The amplitude at the first peak of the response or at the first marked inflexion of the onset slope was taken as an index of the amplitude of the direct pEPSC. A high ratio was found in responses of both pyramidal neurons and Ad interneurons (0.93 ± 0.03 , $n = 42$ and 0.91 ± 0.03 , $n = 27$; respectively, **Fig.S10**), consistent with monosynaptic excitation by Rh TC inputs. In contrast, responses of FS interneurons exhibited a low ratio (0.31 ± 0.07 , $n = 21$), consistent with a preferential activation by recurrent excitation. We next examined the reliability of direct Rh TC inputs onto these three cell types by decreasing photostimulation intensity to the minimal value yielding pEPSCs in more than 90 % of trials. In pyramidal neurons ($n = 6$) and Ad interneurons ($n = 6$), direct pEPSCs persisted in virtually all responses obtained at weak stimulation intensity. In contrast, in FS interneurons ($n = 7$), weak stimulation strongly reduced direct pEPSCs, which were abolished in 35 ± 14 % of responses, while recurrent pEPSCs persisted in 92 ± 4 % of responses (**Fig.S10**). These results indicate that Rh TC inputs are able to recruit monosynaptically pyramidal and Ad neurons whereas FS interneurons are preferentially recruited by recurrent excitation from the cortical network.

SUPPLEMENTAL REFERENCES

4. Y. Kawaguchi, *J Neurosci* **15**, 2638 (1995).
5. B. Cauli *et al.*, *J Neurosci* **17**, 3894 (1997).
13. M. Beierlein, J. R. Gibson, B. W. Connors, *J Neurophysiol* **90**, 2987 (2003).
14. F. Zhang, A. M. Aravanis, A. Adamantidis, L. de Lecea, K. Deisseroth, *Nat Rev Neurosci* **8**, 577 (2007).
19. R.P. Vertes, W. B. Hoover, A. C. Do Valle, A. Sherman, J. J. Rodriguez, *J Comp Neurol* **499**, 768 (2006).
23. L. Bayer *et al.*, *J Neurosci* **22**, 7835 (2002).
24. L. Petreanu, T. Mao, S. M. Sternson, K. Svoboda, *Nature* **457**, 1142 (2009).
25. C. Hull, H. Adesnik, M. Scanziani, *J Neurosci* **29**, 8991 (2009a).
26. Z. Gil, Y. Amitai, *J Neurophysiol* **76**, 2547 (1996).
27. M. Beierlein, B. W. Connors, *J Neurophysiol* **88**, 1924 (2002).
31. V. C. Wimmer, R. M. Bruno, C. P. de Kock, T. Kuner, B. Sakmann, *Cereb Cortex* **20**, 2265 (2010).
32. H. S. Meyer *et al.*, *Cereb Cortex* **20**, 2287 (2010a).
35. H. R. Wilson, J. D. Cowan, *Biophysic J* **12**, 1 (1972).
36. P. Dayan, L. F. Abbott, in *Theoretical neuroscience*, P. Dayan, L. F. Abbott, Eds. (The MIT press, Cambridge, 2001), vol. 1, pp. 1-150.
41. U. Maskos *et al.*, *Nature* **436**, 103 (2005).
42. F. J. Sigworth, *J Physiol* **307**, 97 (1980).
43. A. Destexhe, Z. F. Mainen, T. J. Sejnowski, in *Methods in Neuronal Modeling*, C. Koch, I. Segev, Eds (The MIT press, Cambridge, 1998), pp. 1-25.
44. N. Brunel, X. J. Wang, *J Neurophysiol* **90**, 415 (2003).
45. A. Karagiannis *et al.*, *J Neurosci* **39**, 3642 (2009).
46. J. R. Gibson, M. Beierlein, B. W. Connors, *Nature* **402**, 75 (1999).
47. G. Tamas, E. H. Buhl, P. Somogyi, *J Neurosci* **17**, 6352 (1997).
48. P. Ascher, P. Bregestovski, L. Nowak, *J Physiol* **399**, 207 (1988).

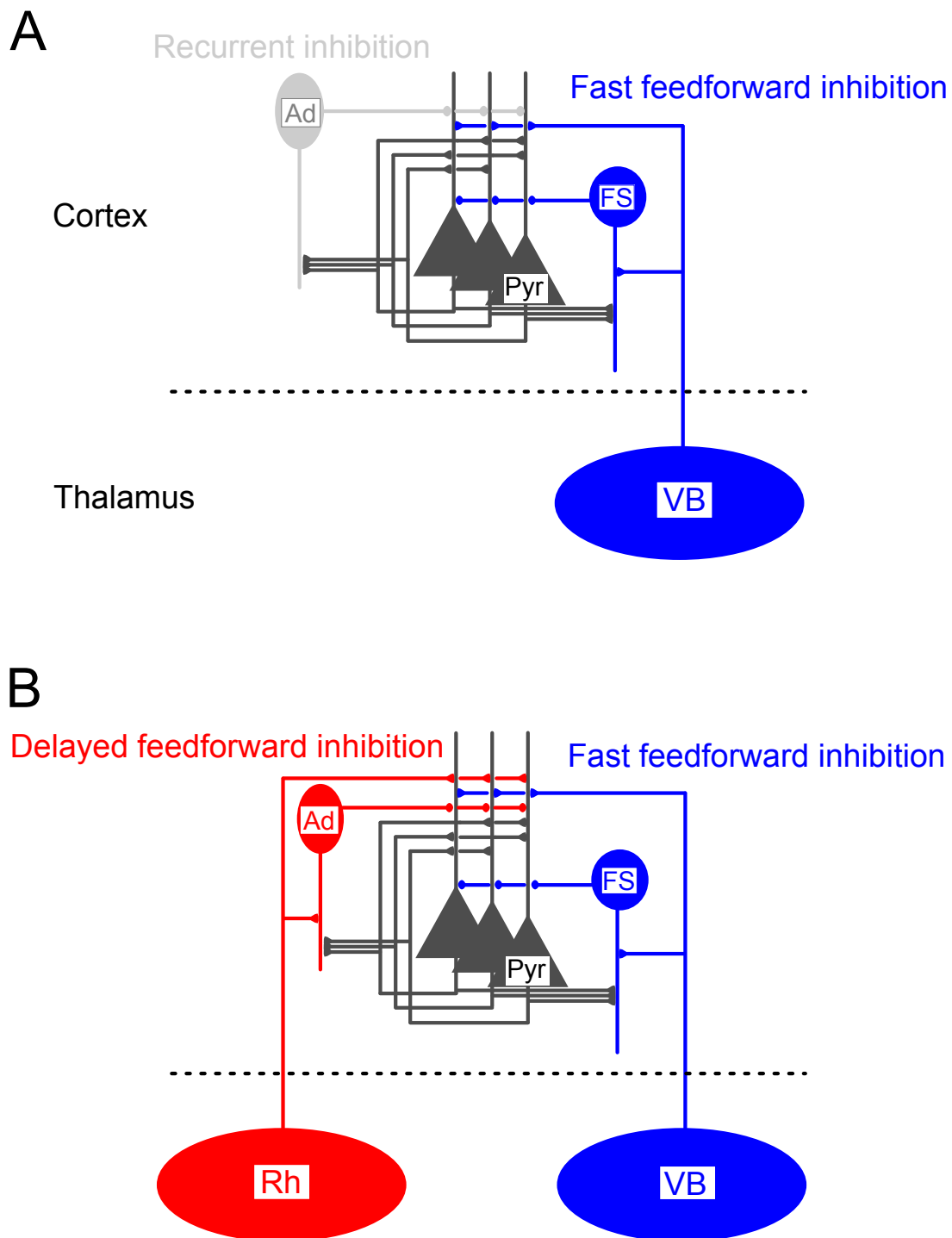


Figure S1: Thalamocortical circuits

(A) Key elements of the thalamocortical circuit underlying the effect of specific nuclei on the cortical network. The strong connection of VB neurons onto FS interneurons is responsible for a rapid feedforward inhibition that hampers recurrent excitation and limits the duration of cortical response. Note that Ad interneurons are primarily involved in recurrent inhibition and thus do not contribute significantly to the response. (B) Salient properties of specific (VB) and non-specific (Rh) thalamocortical circuits summarizing the main findings of the study. The preferential connection of Rh neurons onto Ad interneurons elicits delayed feedforward inhibition that opens a time window for lasting recurrent excitation. Note that FS interneurons are preferentially recruited via recurrent excitation.

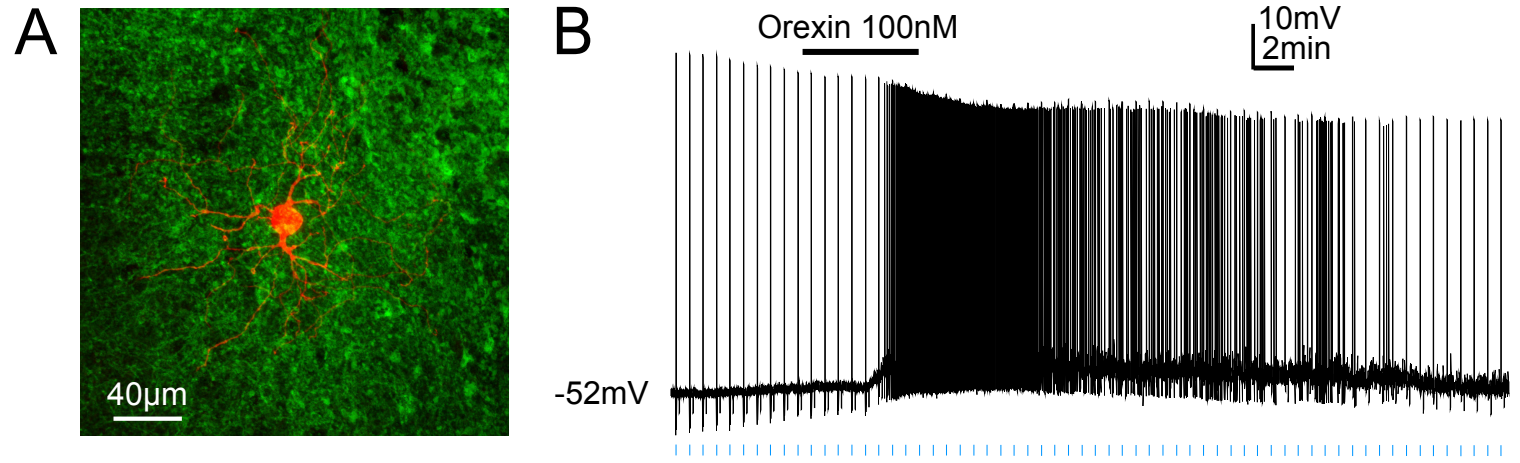


Figure S2: Rh neurons expressing ChR2 are sensitive to orexin

(A) Confocal reconstruction of a Rh neuron expressing ChR2-YFP and surrounded by YFP-positive fibers. (B) Transient responses of this neuron to light pulses (blue bars, 1 ms) and tonic action potential discharge induced by orexin B (100 nM).

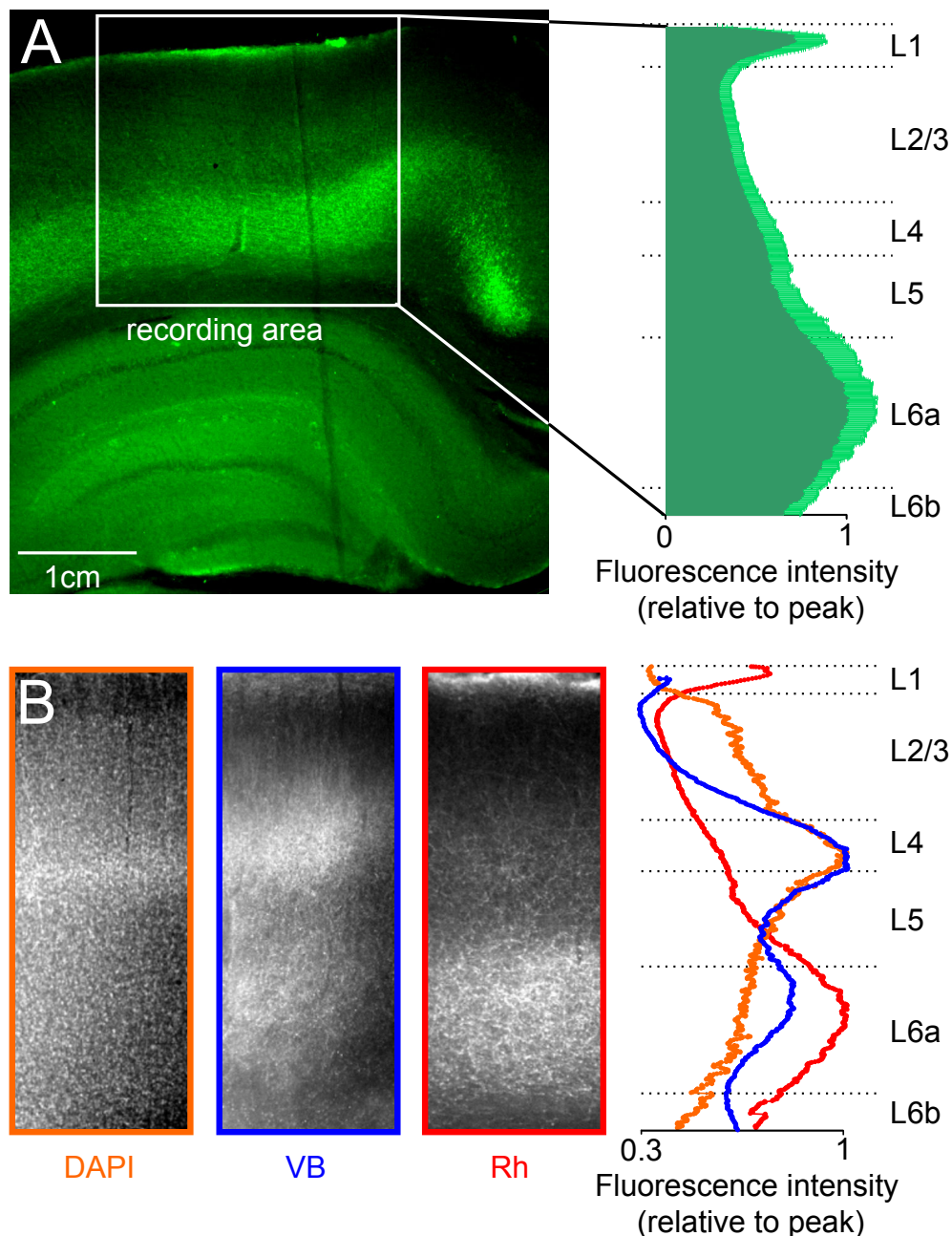


Figure S3: Distribution of Rh and VB TC fibers across layers of the parietal cortex

(A) Whole-field fluorescence picture of a coronal slice showing ChR2-YFP+ Rh TC fibers (green) in the recording area of the medial parietal cortex and plot of the mean fluorescence intensity across layers (n=5). (B) *Left:* Whole-field fluorescence pictures illustrating the distribution of DAPI staining and ChR2-YFP+ Rh or VB TC fibers in coronal slices of the parietal cortex. *Right:* Plots of mean fluorescence intensity across cortical layers for DAPI (n=5), Rh TC fibers (n=5) and VB TC fibers (n=6). The peak of DAPI fluorescence corresponds to the highest density of neurons, which occurs in layer IV, and to the main peak of VB fibers density. The main peak of Rh fibers density is located in layer VIa and roughly coincides with a minor peak of VB fibers.

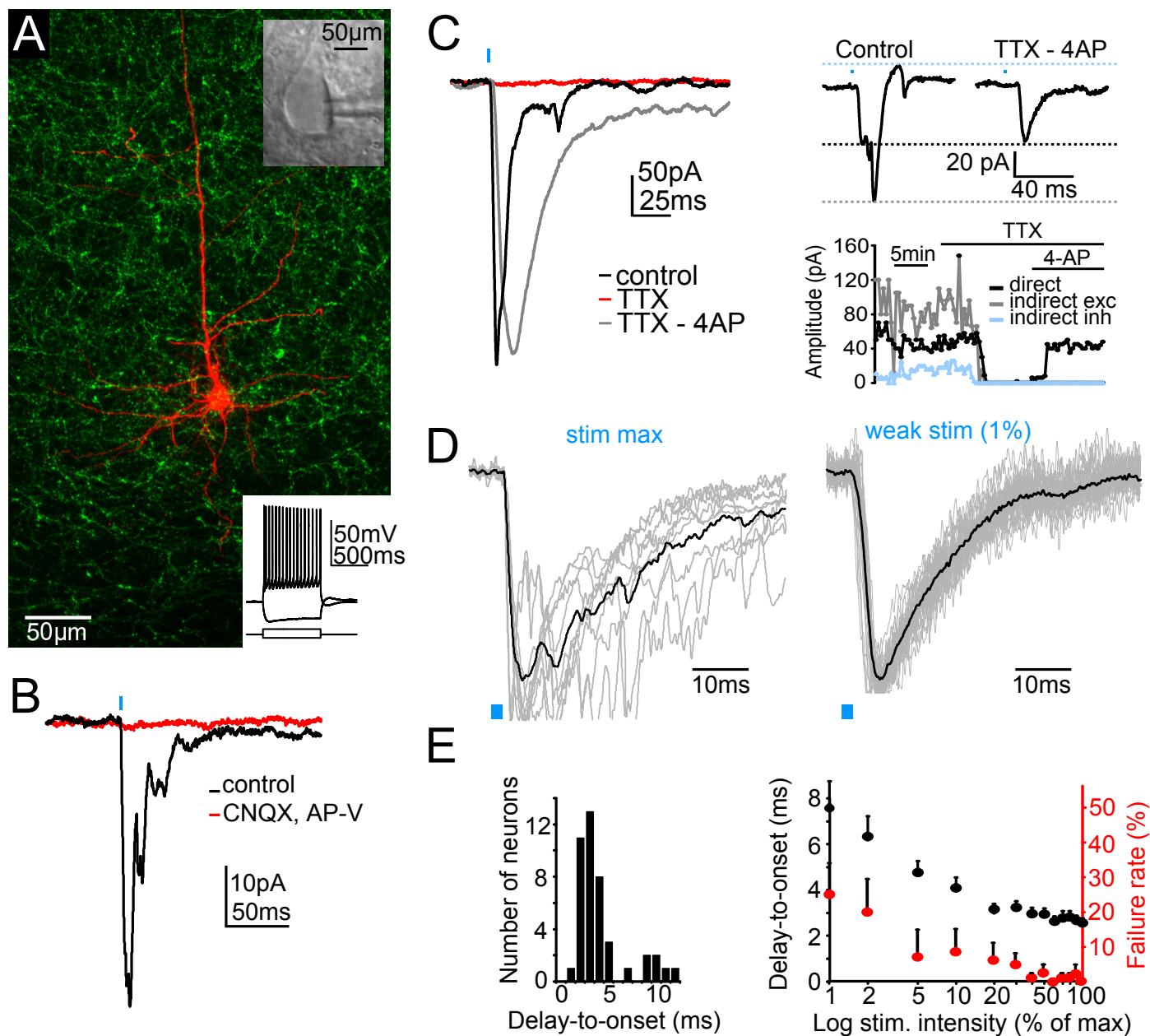


Figure S4: Responses of layer VIA pyramidal cells to photostimulation of Rh TC fibers

(A) Confocal reconstruction of a recorded layer VI pyramidal cell filled with biocytin (red) and surrounded by ChR2-YFP+ Rh TC fibers (green). *Insets*: Infrared picture and responses of the same neuron to intracellular current injection. (B) Photostimulation (blue bar) induced transient inward currents, which were abolished by glutamate receptor antagonists (CNQX, 10 μ M; AP-V, 50 μ M). (C) *Left*: Light induced responses were blocked by TTX (1 μ M) and recovered in the additional presence of 4AP (1mM). Note that TTX-4AP converted polyphasic responses into essentially monophasic ones, but markedly slowed down pEPSC kinetics. *Right*: Recurrent excitation and inhibition were blocked by TTX and 4AP; while the amplitude of direct excitation was roughly similar in control and TTX-4AP conditions. (D) Superimposed pEPSCs normalized to the first peak (gray) and mean pEPSC (black) obtained at different stimulus intensities. (E) *Left*: distribution of pEPSC delays-to-onset measured on 41 layer VI pyramidal neurons at maximal photostimulation intensity. *Right*: delay-to-onset and failure of direct pEPSCs as a function of photostimulation intensity (n = 6 neurons).

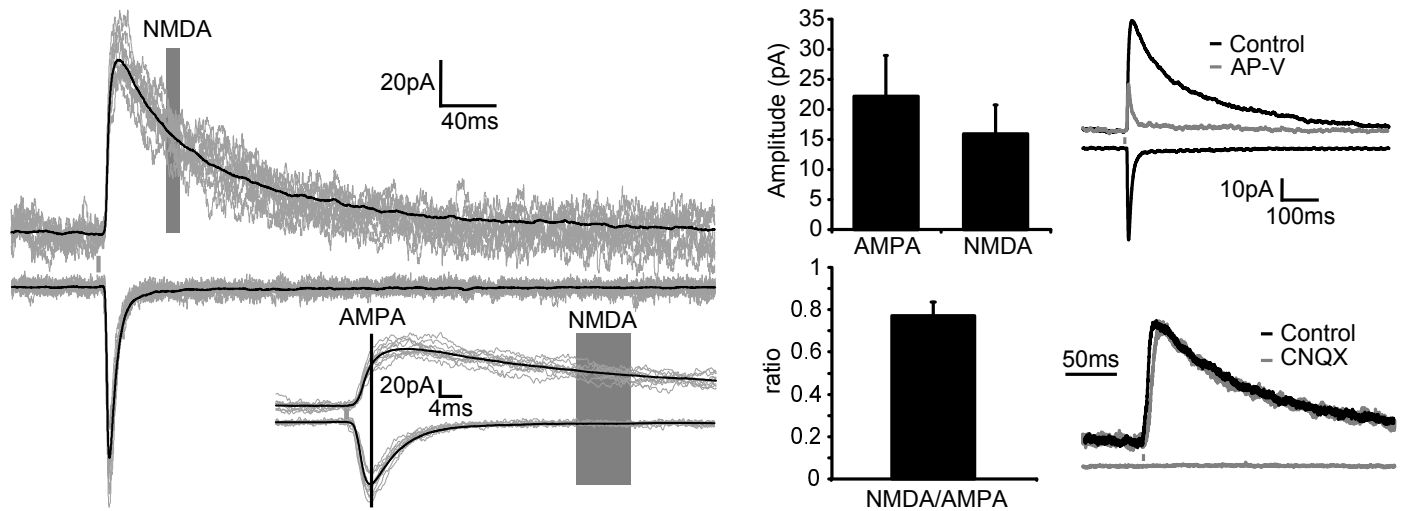


Figure S5: The Rh TC synapse onto layer VIa pyramidal neurons contains both AMPA and NMDA receptors

Left: superimposition of direct pEPSCs (gray traces) recorded at + 50 mV (top, 10 events) and - 70 mV (bottom, 10 events). Averaged pEPSCs (black) were used to measure the amplitudes of AMPAR- and NMDAR-mediated currents where indicated. **Inset:** Same traces at expanded time-scale. **Middle:** mean amplitude of AMPAR and NMDAR mediated currents and mean NMDA/AMPA ratio measured in 11 neurons. **Right:** AMPA and NMDA currents were abolished by their respective antagonists.

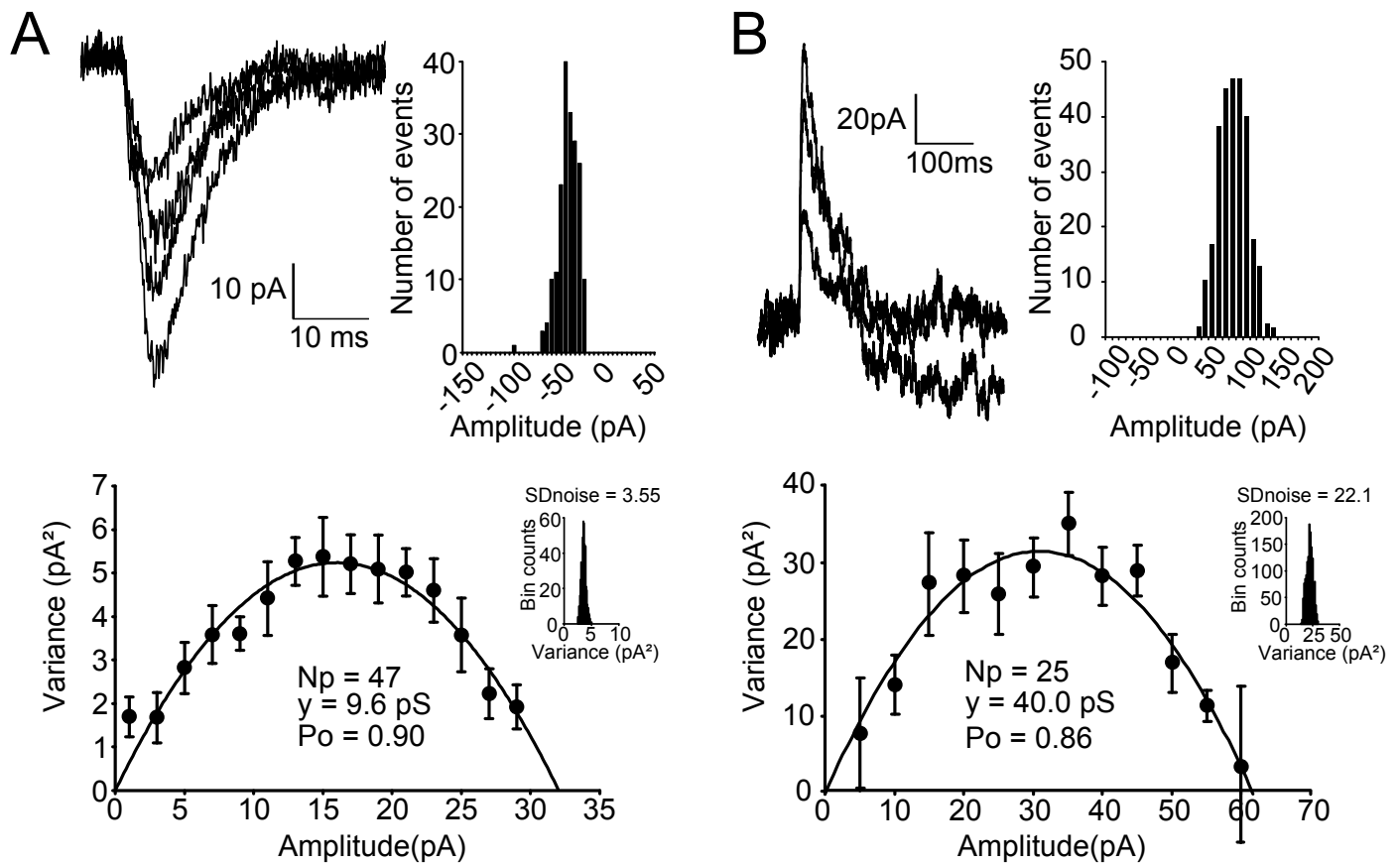


Figure S6: Single channel properties at the Rh TC synapse onto layer VIA pyramidal neurons

(A) Example of non-stationary noise analysis of AMPAR-mediated synaptic currents in a single neuron. *Upper panels:* superimposition of direct pEPSCs recorded at -70 mV (left) and distribution of direct pEPSC amplitudes (right). *Lower:* the plot of the mean variance of the current as a function of the mean pEPSC amplitude was fitted with a parabolic function, which allows the determination of the number (N_p), the unitary conductance (y) and the opening probability (P_o) of AMPAR channels mediating the pEPSCs. *Inset:* Variance of the baseline current. (B) Same analysis as in (A) for the characterization of synaptic NMDAR single channel properties in a neuron recorded at +50 mV.

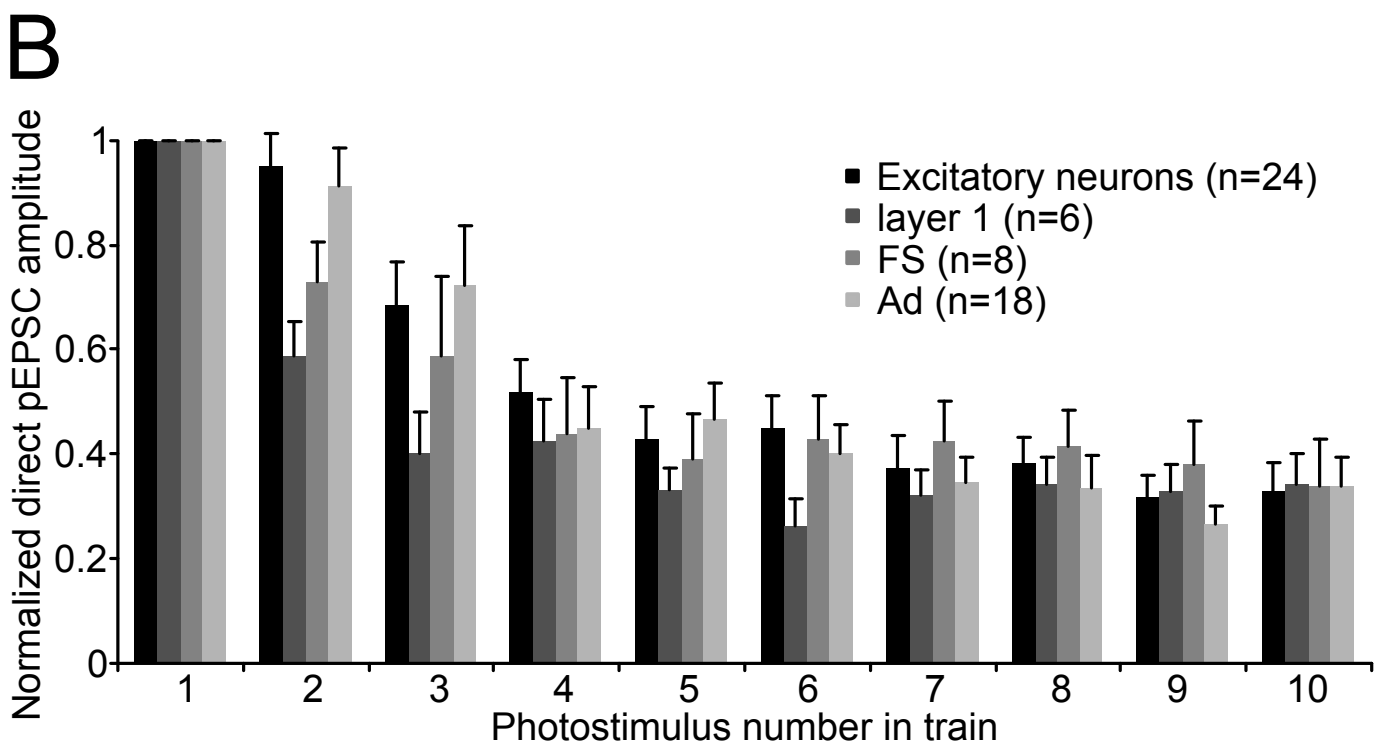
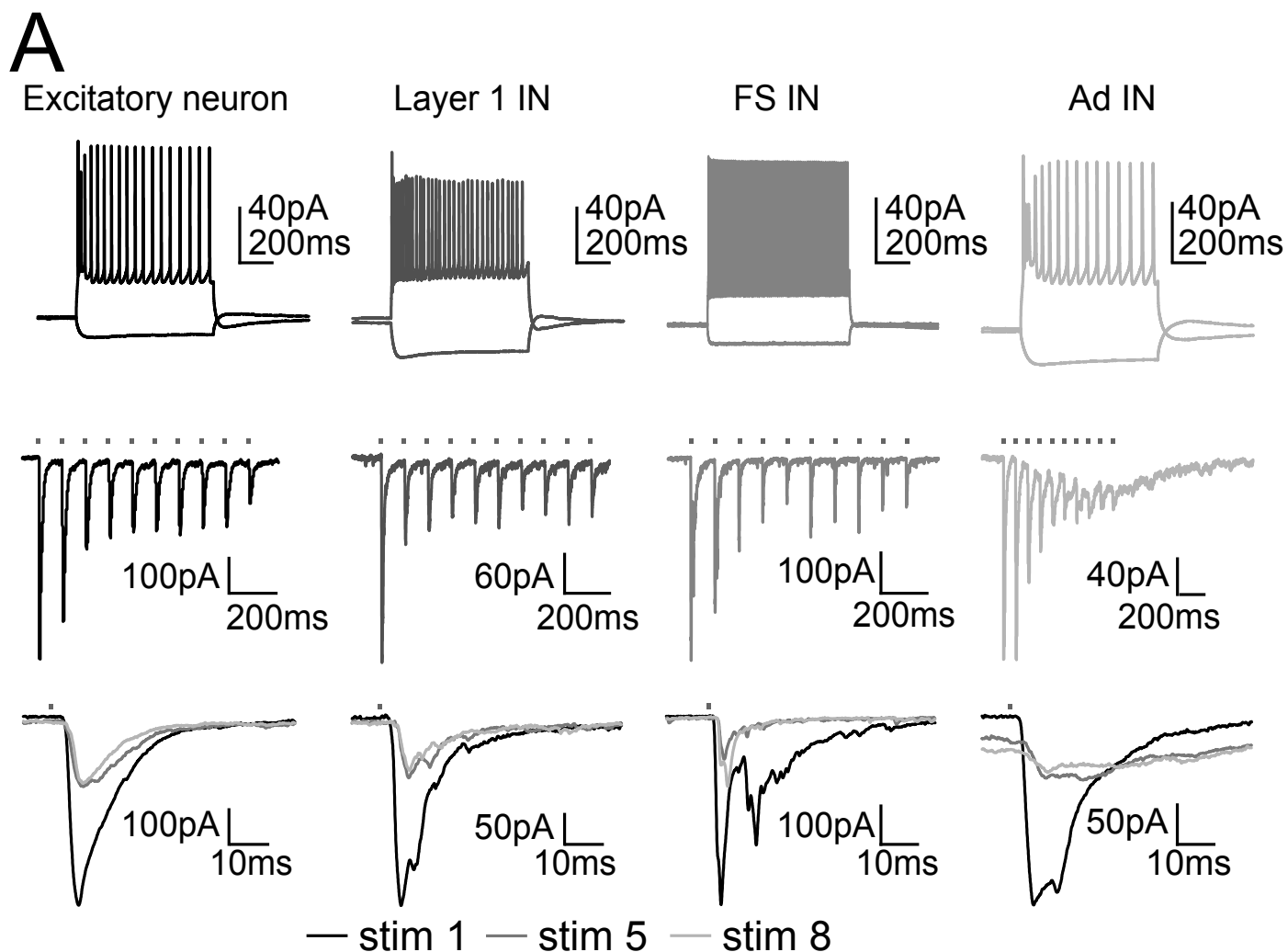


Figure S7: Short-term depression of Rh TC synapses

(A) Examples of firing patterns of cortical neuron types and their responses to 10 Hz trains of photostimuli. (B) Decrease of mean pEPSC amplitudes along the train.

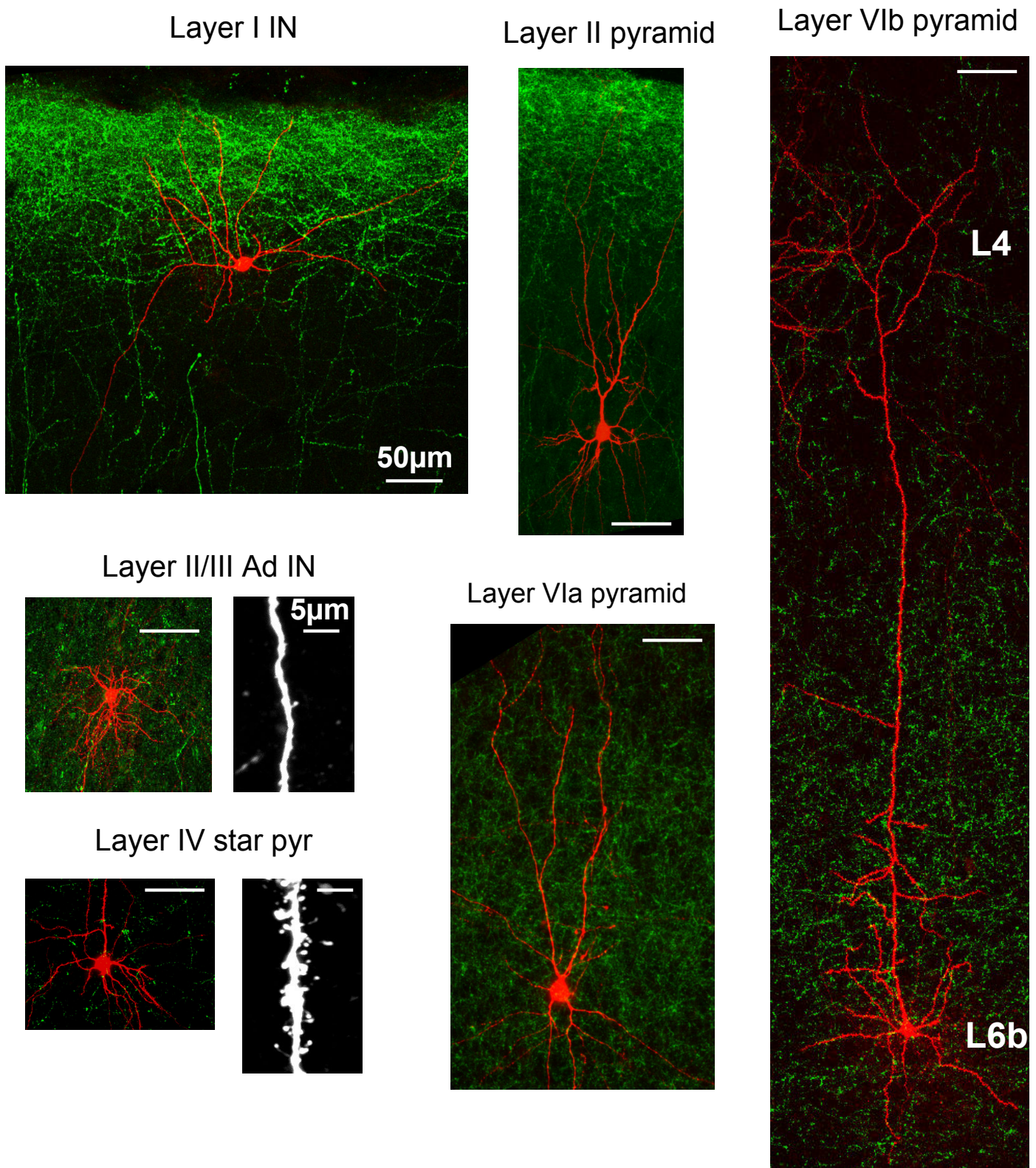


Figure S8: Morphology of recorded neurons

Examples of confocal reconstruction (z-stack) of excitatory or inhibitory neurons (red) recorded in indicated cortical layers and surrounded by ChR2-YFP labeled fibers (green). Note that layer I is devoid of excitatory neurons.

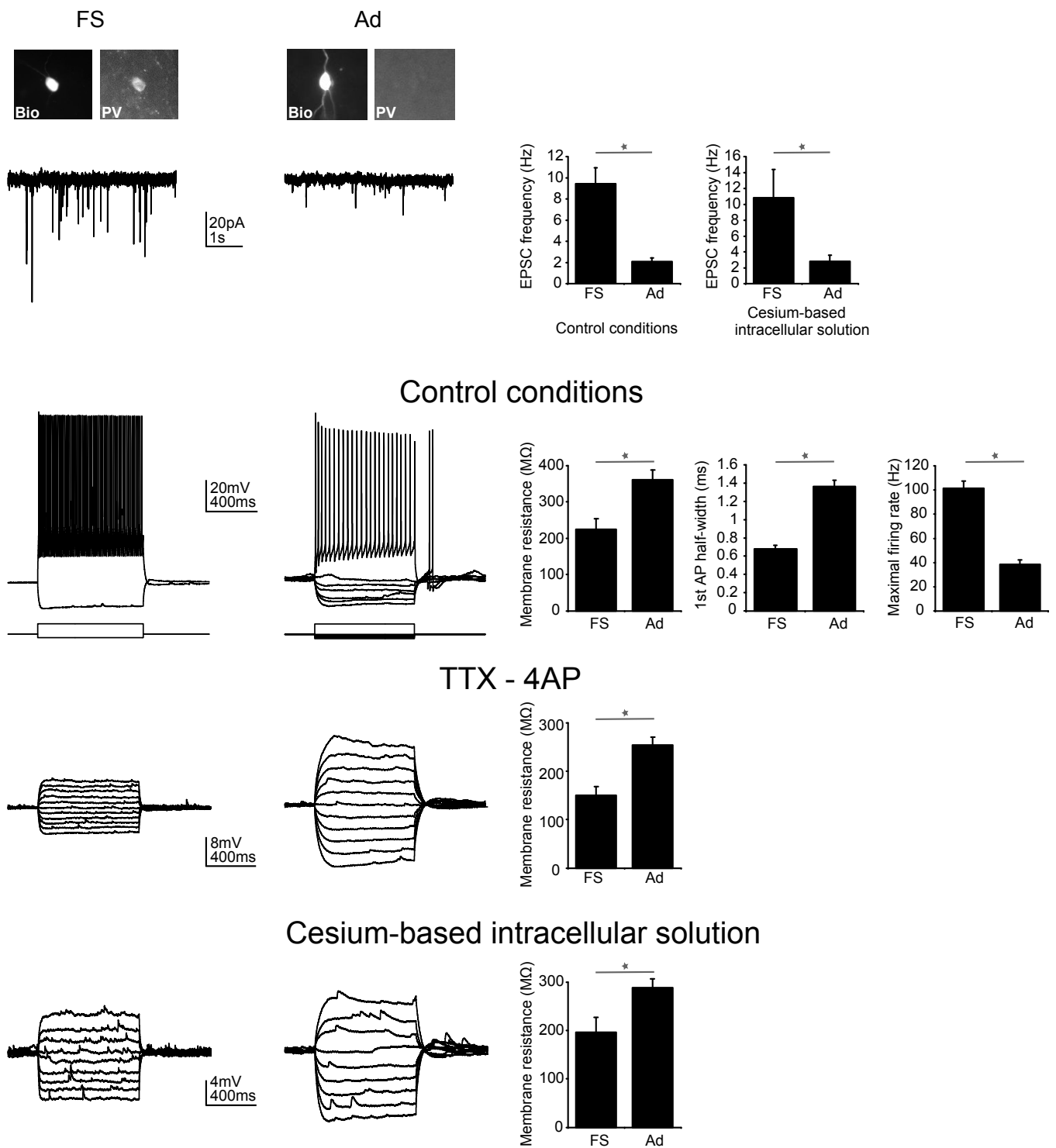


Figure S9: Electrophysiological properties of FS and Ad interneurons.

Upper panels: Biocytin (Bio) labeling of recorded FS and Ad interneurons. The FS interneuron is parvalbumine (PV) positive and the Ad interneuron is PV-. Traces show spontaneous EPSCs recorded at a holding potential of -70mV in these interneurons. The bar graphs summarize EPSC frequency recorded using K-gluconate or Cs-gluconate intracellular solution in FS neurons (n=13 and n=6, respectively) or Ad neurons (n=18 and n=6, respectively). **Upper middle panel:** Firing properties of FS (n=13) and Ad (n=18) neurons in control conditions. **Lower panels:** Responses to current injection recorded using K-gluconate intracellular solution in the presence of TTX (1 μ M) and 4AP (1mM) in FS (n=10) and Ad (n=10) neurons or using Cs-gluconate intracellular solution in control conditions in FS (n=6) and Ad (n=6) interneurons.

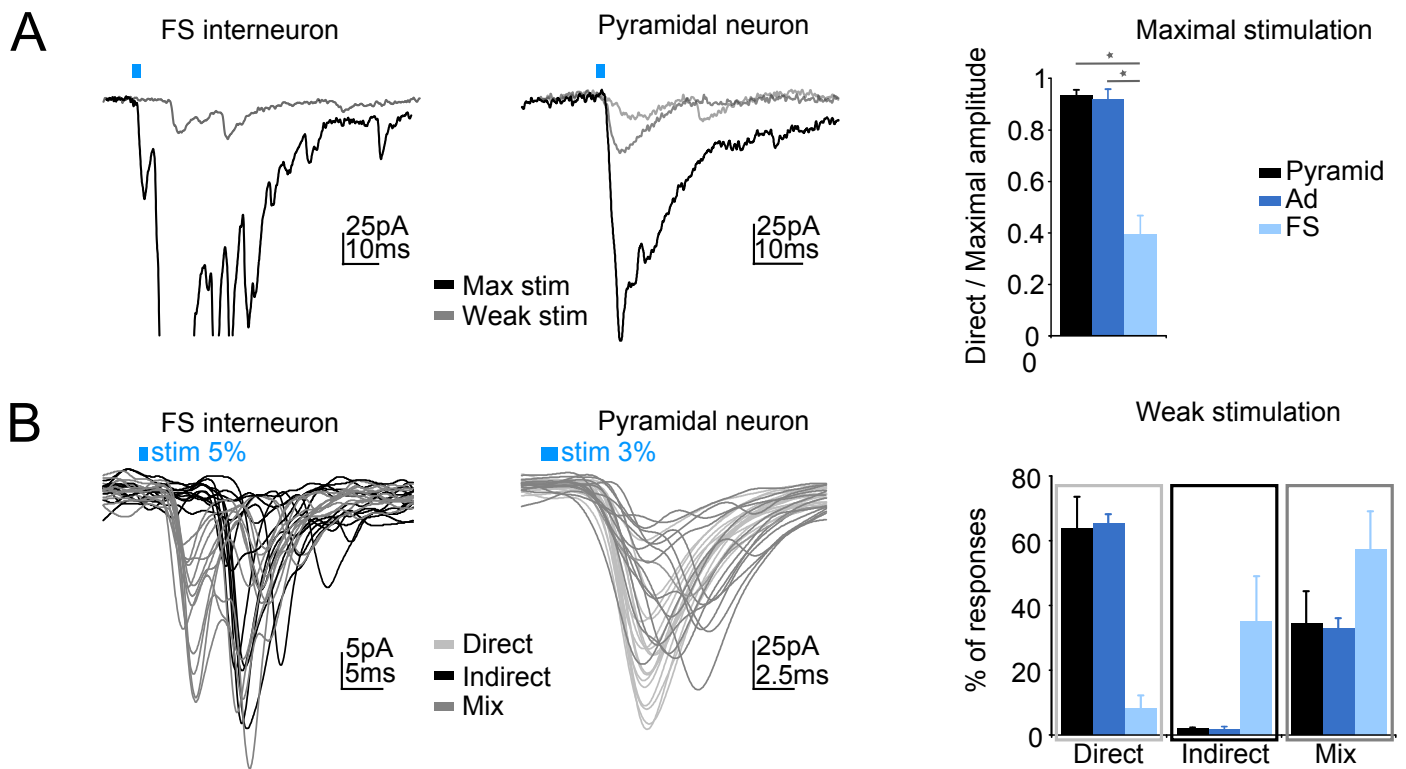


Figure S10: Rh TC inputs onto pyramidal and Ad neurons are stronger than on FS interneurons

The strength of Rh TC input on infragranular neurons was tested in control conditions. **(A) Left:** examples of pEPSCs obtained at different stimulation intensity. Upon maximal stimulation, the largest pEPSC was delayed (indirect) in the FS interneuron and had a short latency (direct) in the pyramidal cell. Upon weak stimulation, the direct pEPSC disappeared in the FS interneuron but persisted in the pyramidal cell. **Right:** mean ratio of direct and largest pEPSC amplitudes obtained in each response to maximal photostimulation in pyramidal ($n = 42$), Ad ($n = 27$) and FS ($n = 14$) neurons. **(B) Left:** superimposed traces of direct, only indirect and both direct and indirect (mix) pEPSCs recorded in individual neurons in response to weak stimulation. **Right:** proportion of direct, indirect and mix pEPSCs recorded in pyramidal ($n = 6$), Ad ($n = 6$) and FS ($n = 7$) neurons.

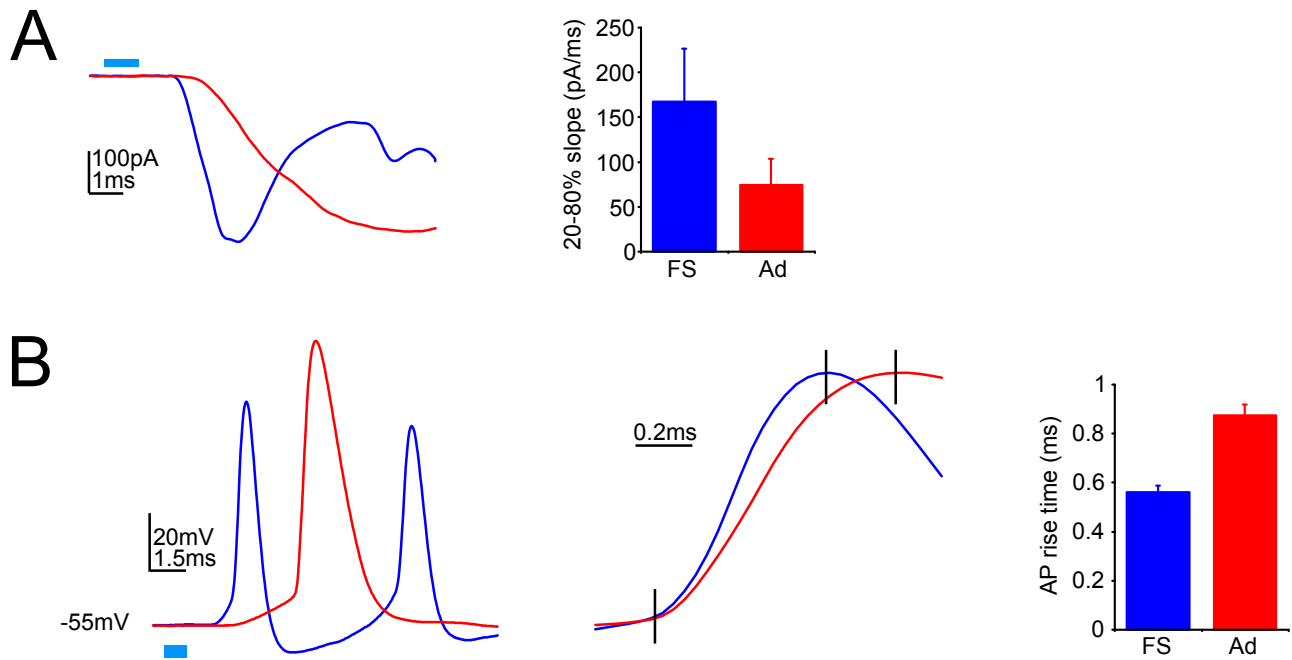


Figure S11: Onset slopes of EPSCs and action potentials in FS and Ad interneurons

(A) The 20-80% rise time of short-latency (direct) pEPSCs recorded upon Rh TC stimulation in control conditions is twice slower in Ad (73 ± 34 pA/ms, $n=9$) than in FS interneurons (168 ± 64 pA/ms, $n=19$, $p < 0.05$). (B) Action potential rise time following Rh TC stimulation is slower in Ad (0.88 ± 0.04 ms, $n=18$) than in FS interneurons (0.56 ± 0.03 ms, $n=14$, $p < 0.05$). Rise time is measured from the initiation to the peak of the action potential (black bar).

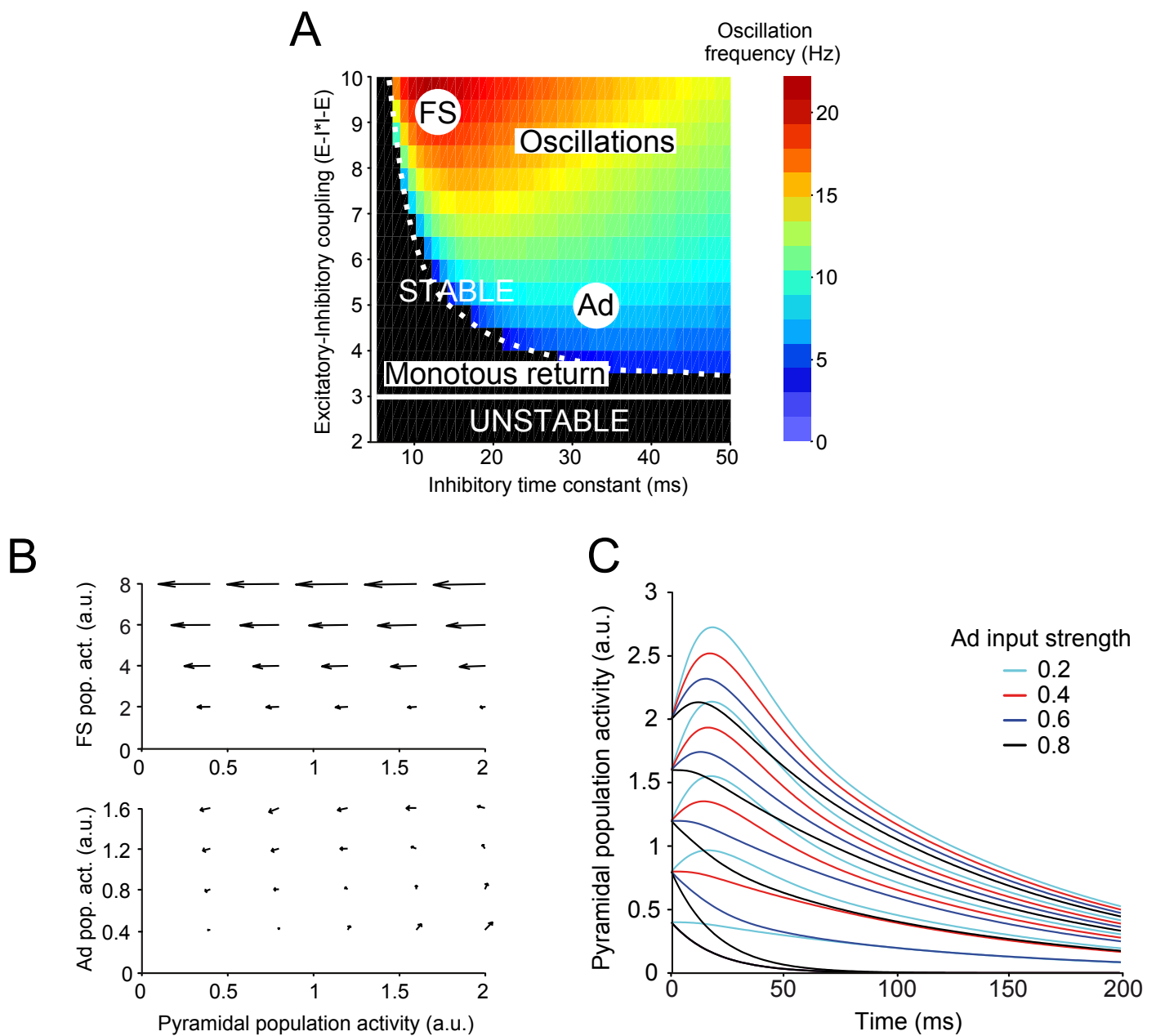


Figure S12: Differential activation of FS and Ad interneurons leads to contrasting cortical network dynamics in a mean-field model

(A) Oscillation frequency in the reduced model of excitatory-inhibitory interactions. Null frequencies (black) correspond to non-oscillatory behaviors. (B) Vector fields depicting phase plane portraits of the activity of pyramidal cells and FS or Ad interneurons in the detailed model. Initial strength of VB (mainly activating pyramidal and FS cells, top) and Rh (mainly activating pyramidal and Ad cells, bottom) thalamic inputs on neuronal populations are given by the locations of the arrows. Size of the arrows indicates the speed of the return to initial state. (C) Responses of the pyramidal cell population as a function of Rh input strength on pyramidal and Ad cells in the detailed model.

2 | Présentation de l'article : "Orexin-dependent activation of layer VIb enhances cortical network activity and integration of non-specific thalamocortical inputs."

Introduction

La couche VIb du néocortex est la couche la plus profonde du néocortex. Elle est située en bordure de la matière blanche et est composée de neurones présentant une large diversité morphologique. De façon intéressante, la couche VIb possède une sensibilité unique dans le néocortex aux neuromodulateurs de l'éveil comme l'orexine, l'acétylcholine ou les μ -opioïdes. De plus, elle est une des principales cibles des projections du thalamus non-spécifique qui est impliqué dans l'éveil et la modulation des états d'attention. Au cours de ce travail, nous avons donc cherché à comprendre dans quelle mesure la couche VIb participe à l'éveil cortical et peut être considérée comme un relais des informations du thalamus non-spécifique.

La première étape du travail, effectuée par Sofija Andjelic et Sammy Badr a consisté à confirmer les résultats de pharmacologie sur les courants orexinergiques et nicotiniques publiés précédemment (Bayer et al., 2004, Kassam et al., 2008). Puis par scRT-PCR, ils ont déterminé les récepteurs impliqués dans ces courants. Ils ont ainsi montré que le courant nicotinique était soutenu par l'ouverture du récepteur hétéromérique $\alpha4\alpha5\beta2$ tandis que le courant orexinergique l'était par l'activation du récepteur OX2R.

J'ai ensuite mis au point un protocole d'activation pharmacologique de la couche VIb dans le but d'étudier les projections intracorticales de la couche VIb. Pour cela, j'ai tiré partie de la sensibilité unique de la couche VIb à l'orexine ainsi que de l'expression de la sous-unité nicotinique $\alpha5$ qui confère au récepteur

une sensibilité sub-micromolaire à la nicotine. J'ai pu montrer que l'application conjointe de nicotine à $1\ \mu\text{M}$ et d'orexine à $100\ \text{nM}$ entraînait une décharge tonique de potentiels d'action très reproductible dans les neurones de la couche VIb. J'ai ensuite enregistré les courants post-synaptiques (EPSCs) dans les différentes couches du néocortex et en quantifiant l'augmentation de la fréquence des EPSCs dans les différentes couches, j'ai montré que la couche VIb projetait préférentiellement dans les régions infragranulaires et semblait éviter la couche IV. De plus, mes résultats montrent que l'activation de la couche VIb dans un hémisphère entraînait une augmentation de la fréquence des EPSCs dans l'hémisphère contralatéral. Ces résultats indiquent donc que la couche VIb présente une sensibilité aux neuromodulateurs de l'éveil ainsi qu'un profil de projections intracorticales qui sont tous deux très similaires à ce qui est observé dans les noyaux du MTN.

J'ai donc voulu comprendre si la couche VIb pouvait agir comme un relais des informations du thalamus non-spécifique, relais qui serait dépendant des états d'éveil. J'ai donc comme dans la publication 1 transduit les neurones du rhomboïde avec un lentivirus contenant la ChR2 et enregistré les courants post-synaptiques photo-induits dans le néocortex. Il a été suggéré que, dans le cortex préfrontal, l'orexine modulait au niveau pré-synaptique les entrées du thalamus non-spécifique (Lambe and Aghajanian, 2003). J'ai donc dans un premier temps cherché à mesurer l'impact pré-synaptique de l'orexine sur les entrées thalamiques en mesurant l'évolution du *paired-pulse ratio* lors de l'application d'orexine et de nicotine. Je n'ai enregistré aucune variation de ce ratio, ce qui suggère, en ligne avec les données publiées par Bayer et collaborateurs (Bayer et al., 2004), que dans le cortex somatosensoriel l'orexine agit principalement par l'activation somatodendritique des neurones de la couche VIb. Cependant, l'application d'orexine entraîne l'apparition d'un courant post-synaptique retardé qui est probablement dû à l'activation de la couche VIb. J'ai donc cherché à savoir si l'activation de la couche VIb par l'orexine pouvait faciliter les entrées du thalamus non-spécifique. L'idée était qu'il pourrait exister un réseau sensible à l'orexine comprenant le thalamus non-spécifique et la couche VIb dans lequel la couche VIb jouerait un rôle d'amplificateur des informations du thalamus non-spécifique. Mes résultats confirment cette hypothèse et montrent que l'activation de la couche VIb entraîne une potentialisation des courants du rhomboïde via une augmentation de l'excitabilité de la tranche, mais de plus cette potentiation s'accompagne d'une diminution de la variabilité temporelle de l'émission des potentiels d'action. Ces données suggèrent donc que la couche VIb pourrait agir comme une boucle d'excitation antérograde intracorticale pour les entrées du thalamus non-spécifique.

Article

2 **Orexin-dependent activation of layer VIb enhances cortical**
3 **network activity and integration of non-specific thalamocortical**
4 **inputs**

5 **Y. Audrey Hay Sofija Andjelic Sammy Badr**
6 **Bertrand Lambolez**

7 Received: 31 May 2014 / Accepted: 31 July 2014
8 © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

9 **Abstract** Neocortical layer VI is critically involved in
10 thalamocortical activity changes during the sleep/wake
11 cycle. It receives dense projections from thalamic nuclei
12 sensitive to the wake-promoting neuropeptides orexins, and
13 its deepest part, layer VIb, is the only cortical lamina
14 reactive to orexins. This convergence of wake-promoting
15 inputs prompted us to investigate how layer VIb can
16 modulate cortical arousal, using patch-clamp recordings
17 and optogenetics in rat brain slices. We found that the
18 majority of layer VIb neurons were excited by nicotinic
19 agonists and orexin through the activation of nicotinic
20 receptors containing $\alpha 4$ - $\alpha 5$ - $\beta 2$ subunits and OX2 receptor,
21 respectively. Specific effects of orexin on layer VIb neu-
22 rons were potentiated by low nicotine concentrations and
23 we used this paradigm to explore their intracortical pro-
24 jections. Co-application of nicotine and orexin increased
25 the frequency of excitatory post-synaptic currents in the
26 ipsilateral cortex, with maximal effect in infragranular

layers and minimal effect in layer IV, as well as in the 27
contralateral cortex. The ability of layer VIb to relay 28
thalamocortical inputs was tested using photostimulation of 29
channelrhodopsin-expressing fibers from the orexin-sensi- 30
tive rhomboid nucleus in the parietal cortex. Photostimu- 31
lation induced robust excitatory currents in layer VIa 32
neurons that were not pre-synaptically modulated by ore- 33
xin, but exhibited a delayed, orexin-dependent, compo- 34
nent. Activation of layer VIb by orexin enhanced the 35
reliability and spike-timing precision of layer VIa respon- 36
ses to rhomboid inputs. These results indicate that layer 37
VIb acts as an orexin-gated excitatory feedforward loop 38
that potentiates thalamocortical arousal. 39

Keywords Cerebral cortex Layer 6 Hypocretin 41
Acetylcholine Midline thalamus 42

Introduction 43

The neocortex comprises six horizontal layers, which 44
exhibit distinct cytoarchitectural and connectivity proper- 45
ties. The innermost layer VI is further partitioned into an 46
upper part (layer VIa) containing a high density of gluta- 47
matergic pyramidal neurons and a deeper part (layer VIb) 48
dominated by polymorphic non-pyramidal neurons (Töm- 49
bööl 1984; van Brederode and Snyder 1992; Zhang and 50
Deschenes 1997; Mercer et al. 2005; Andjelic et al. 2009; 51
Chen et al. 2009; Marx and Feldmeyer 2013). 52

Layer VI is under direct influence of wake-promoting 53
neurotransmitters. It is sensitive to the nicotinic effects of 54
acetylcholine, which participate in the regulation of vigi- 55
lance states (Kassam et al. 2008). In addition, layer VIb is 56
the only cortical lamina reactive to orexins, which are key 57
neuropeptides of the arousal system (de Lecea et al. 1998; 58

A1 S. Andjelic and S. Badr are equal contributors.

A2 Y. Audrey Hay () S. Andjelic S. Badr B. Lambolez
A3 UMR CR 18, Neuroscience Paris Seine, Sorbonne Universités,
A4 UPMC Univ Paris 06, 75005 Paris, France
A5 e-mail: audrey.hay@normalesup.org

A6 Y. Audrey Hay S. Andjelic S. Badr B. Lambolez
A7 UMR 8246, Centre National de la Recherche Scientifique
A8 (CNRS), Paris, France

A9 Y. Audrey Hay S. Andjelic S. Badr B. Lambolez
A10 UMR-S 1130, Institut national de la Santé et de la Recherche
A11 Médicale (INSERM), Paris, France

A12 B. Lambolez
A13 UMR 8246, Neuroscience Paris Seine, Université Pierre et Marie
A14 Curie, 9 quai Saint Bernard, 75005 Paris, France
A15 e-mail: bertrand.lambolez@snv.jussieu.fr

59 Sakurai et al. 1998; Bayer et al. 2004). Layer VI is also the
60 major neocortical target of non-specific thalamic nuclei,
61 which additionally send projections to layers I and V but
62 sparsely project to other layers (Herkenham 1980). Non-
63 specific thalamic nuclei promote cortical arousal via pro-
64 jections on associative areas (Moruzzi and Magoun 1949;
65 Jasper et al. 1953; Van der Werf et al. 2002; Vertes 2006).
66 Among these nuclei, those of the thalamic midline are
67 sensitive to orexins and may thus play a critical role in
68 cortical arousal (Bayer et al. 2002). Layer VIa is a key
69 component of the cortico-thalamic feedback, whereas layer
70 VIb primarily sends intracortical projections (Usrey and
71 Fitzpatrick 1996; Hirsch et al. 1998; Zhang and Deschenes
72 1998; Prieto and Winer 1999; Clancy and Cauller 1999;
73 Arimatsu et al. 2003; Mercer et al. 2005; Jones 2007; Marx
74 and Feldmeyer 2013). This pattern of input–output con-
75 nections and sensitivity to wake-promoting neurotrans-
76 mitters suggests that layer VIb may act as an intracortical
77 relay of information on vigilance states.

78 In the present study, we investigated how layer VIb can
79 modulate cortical arousal in acute slices of rat neocortex
80 using a combination of patch-clamp recordings, single-cell
81 RT-PCR analyses and optogenetics. We first characterized
82 further the sensitivity of layer VIb neurons to orexin and
83 nicotinic agonists, and took advantage of their selective
84 synergistic effects to map the intracortical output of layer
85 VIb neurons. Then, we expressed channelrhodopsin in the
86 thalamic midline rhomboid nucleus, which densely projects
87 to layer VI of the parietal cortex (Van der Werf et al. 2002;
88 Vertes 2006), and tested the effects of layer VIb activation
89 by orexin on responses of layer VIa neurons to photostim-
90 ulation of rhomboid fibers. Our results indicate that layer
91 VIb mainly projects to infragranular layers of ipsilateral
92 and contralateral cortices, and that its activation by orexin
93 enhances the reliability and temporal precision of layer VIa
94 responses to rhomboid inputs.

95 Materials and methods

96 Slice preparation

97 All experiments were carried out in accordance with the
98 guidelines published in the European Communities Council
99 Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC). Except
100 for optogenetic experiments, young Wistar rats (14–22
101 postnatal days old) were usually used. Rats were decapi-
102 tated, brains were quickly removed and placed into cold
103 (4 °C) standard artificial cerebrospinal fluid (ACSF) con-
104 taining (in mM): 126 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 2
105 CaCl₂, 1 MgCl₂, 26 NaHCO₃, 10 glucose and 15 sucrose
106 (pH 7.2, 325 mosM). Kynurenic acid (1 mM) was added to
107 the ACSF to block glutamate receptors. Coronal (350- μ m

thick) and parasagittal (300- μ m thick) sections of cerebral
cortex were prepared as previously described (Cauli et al.
1997) using a vibratome (VT1000S; Leica). Slices were
incubated at room temperature (20–25 °C) in a chamber-
containing ACSF saturated with 95 % O₂–5 % CO₂. For
optogenetic experiments, adult rats were deeply anesthe-
tized with an intraperitoneal injection of ketamine and
xylazine (100 and 25 mg per kg body weight, respectively)
and 120 U of heparin (Sigma) was injected in the left heart.
Then, animals were intracardiacally perfused with cold
(4 °C) sucrose artificial cerebrospinal fluid (ACSF) con-
taining (in mM): sucrose 30, glucose 2.5, NaCl 126, 2.5
KCl, NaHPO₄ 26, NaH₂PO₄ 3, MgCl₂ 3 and kynurenic
acid 3. Coronal slices (300 μ m thick) were prepared in
sucrose ACSF, and slices were transferred in a chamber-
containing standard ACSF saturated with 95 % O₂ and
5 % CO₂ for 1 h at 37 °C and were then incubated at room
temperature (20–25 °C) until recording.

Whole cell recordings

Individual slices were transferred to a recording chamber
and continuously superfused at 2 ml/min with oxygenated
ACSF at room temperature. Patch pipettes (3–5 M Ω) were
pulled from borosilicate glass (Harvard Apparatus LTD,
Kent, UK) on a micropipette puller (Model PP-83, Na-
rishige, Tokyo, Japan) and filled with 8 μ l of internal
solution containing (in mM): 144 KGlu, 3 MgCl 2, 10
HEPES, 0.5 EGTA and 2 mg/ml biocytin. The pH was
adjusted to 7.2 and the osmolarity to 295 mOsm. A different
internal solution was used for the recordings of inhibitory
post-synaptic currents (IPSCs), containing (in mM): 130
CsGlu, 3 MgCl₂, 10 HEPES, 10 EGTA. Whole cell patch-
clamp recordings were made from neocortical neurons
visualized under infrared videomicroscopy with Nomarski
optics (Stuart et al. 1993). Layer VIb neurons used in the
present study had their somata localized at a maximum of
350 μ m from the white matter. Whole cell recordings were
performed at room temperature (20–25 °C) using a patch-
clamp amplifier (Multiclamp 700B, Molecular Devices,
Sunnyvale, CA) connected to a Digidata 1440A interface
board (Molecular Devices). Signals were amplified and
collected using the data-acquisition software pClamp 10.2
(Molecular Devices). Resting membrane potential was
measured just after passing into whole cell configuration,
and only cells with a resting membrane potential more
hyperpolarized than –50 mV were selected. Membrane
potentials were not corrected for junction potential. For the
recording of post-synaptic events, cells showing a variation
of access resistance of more than 20 % were excluded from
the study. Recordings of excitatory post-synaptic currents
were performed at a holding potential of –70 mV (close to
E_{Cl⁻} in our recording conditions) and recordings of

Table 1 PCR primers

Gene	First PCR primers	Size	Second PCR-nested primers	Size
VGluT1	Sense ^c : GGCTCCTTTTCTGGGGGTAC	259	Sense ^c : TGGGGGTACATTGTCACTCAGA	201
#U07609	Antisense ^c : CCAGCCGACTCCGTTCTAAG		Antisense ^c : ATGGCAAGCAGGGTATGTGAC	
GAD65	Sense ^a : TCTTTTCTCTGGTGGTGCC	391	Sense ^c : TGTACGCCATGTCTATTGCC	312
#M72422	Antisense ^a : CCCAAGCAGCATCCACAT		Antisense ^c : CAGCTACAGCCAAGAGAGGATCA	
GAD67	Sense ^b : TACGGGGTTCGCACAGGTC	600	Sense ^c : TGGATATCATTGGTTTAGCTGGC	509
#M76177	Antisense ^b : CCCAAGCAGCATCCACAT		Antisense ^c : TCACATATGTCTGCAATCTCCTGG	
OX1R	Sense: TGCTGATGGTGGTTCTGCTG	214	Sense: GTGGTTCTGCTGGTTTTTGC	197
#AF041244	Antisense: TTGAACTGCTCCCGAAATTTG		Antisense: TCCCGAAATTTGCCACTGAG	
OX2R	Sense: CGCTGTCGCTGCTGAGATAA	291	Sense: CCGAGCACGAAGGAAAACAG	169
#AF041246	Antisense: CCAAGACAGCAAGAAAAGGCA		Antisense: AAGCCAATGAGAAAAAGTGAACC	
RN α 2	Sense ^d : TCCCTCATCCCAACAGTGCC	539	Sense: ACCCTCGTCAGCCACCCC	299
#L0077	^d Antisense: TTGTAGTCATTCCATTCTGCTTT		Antisense: TGCCCAGCGATTGTAGCC	
RN α 3	Sense ^d : AGTGTCTCCCTCCCTGTCTATCG	298	Sense: AGTGTCTCCCTCCCTGTCTATCG	221
#AY574254	Antisense ^d : TGTAGTCATTCCAGATTTGCTTCA		Antisense: GACATGGACACCTCAAACCTGGAT	
RN α 4	Sense ^d : CGTGTGGGTGAAGCAGGAGT	370	Sense: ATCCGCATCCCCTCTGAACT	266
#AF007212	Antisense ^d : TGTAGTCATTCCAGATTTGCTTCA		Antisense: TCCACACGGCTATGAATGCTC	
RN α 5	Sense ^d : TCAACATCCACCACCGCTC	482	Sense: GGGGCTGGACCTAAATCTCG	291
#J05231	Antisense ^d : TACCTTACATTTCCATAACAGCA		Antisense: TGCTACTAAATCCACAGGGTAAT	
RN α 6	Sense ^d : CTTCAGCCAGGACACAGGGA	536	Sense: CTTCGGTTTCCACAGCCCTCT	367
#L08227	Antisense ^d : ACGATGTCAGGCTTCCAGATG		Antisense: GATGCCATCGTACTCCGTTG	
RN α 7	Sense ^d : GGGAGGCATCTGGCTGGC	415	Sense: GGGAGGCATCTGGCTGGC	369
#AY574256	Antisense ^d : TGGAGGGAGATACTGGCAATG		Antisense: TGTGGAACGTGGCATCAAAG	
RN β 2	Sense ^d : GGAGTGGGAAGATTACCGCC	448	Sense: CGGCTCCCTTCCAAACACAT	336
#L31622	Antisense ^d : TGGTTTGCACGAATGATGA		Antisense: GTCTGGGTTCTCGTTGCGTC	
RN β 3	Sense ^d : GGCTGAACACGAAGACGCAC	557	Sense: TGAAGCAGGAATGGACAGACC	390
#J04636	Antisense ^d : CCTTCATCCCCTTTGCGTTG		Antisense: TCTCCCACTCTCCGTTATCAAAA	
RN β 4	Sense ^d : CCCCTGCTCCTCGTCTCTCT	527	Sense: TGACCTCCTGAACAAAACCCG	353
#AY574260	Antisense ^d : ATCTCCGTGTGGTCATAGGTCC		Antisense: TGTAGATAGCAGGGGGCAGC	

^a Bochet et al. (1994); ^b Cauli et al. (1997); ^c Gallopin et al. (2006); ^d Porter et al. (1999)

159 inhibitory post-synaptic currents were performed at a
160 holding potential of 0 mV.

161 Signals were filtered at 1–5 kHz, digitized at 20 kHz,
162 saved to a personal computer, and analyzed off-line with
163 Clampfit 10.2 software (Molecular Devices). Post-synaptic
164 currents were analyzed off-line using Mini Analysis soft-
165 ware (Synaptosoft, Decatur, GA). Signals <7 pA were
166 excluded from the analysis. Results are presented as
167 mean \pm standard error of mean. Between-group compar-
168 isons were performed using Mann–Whitney nonparametric
169 test that does not assume equal standard deviations. A
170 *p* value below 0.05 was considered statistically significant.

171 Cytoplasm harvest and single-cell reverse
172 transcription–polymerase chain reaction

173 At the end of the whole cell recording, the cell cytoplasm
174 was aspirated into the recording pipette while maintaining

a tight seal. The pipette was removed delicately to allow
175 outside-out patch formation. The content of the pipette was
176 expelled into a test tube, and reverse transcription (RT) was
177 performed in a final volume of 10 μ l as described previ-
178 ously (Lambolez et al. 1992). Next, two steps of poly-
179 merase chain reaction (PCR) were performed essentially as
180 described previously (Cauli et al. 1997). The cDNAs
181 present in 10 μ l of the RT reaction first were amplified
182 simultaneously using the primer pairs described in Table 1
183 (for each primer pair the sense and antisense primers were
184 positioned on two different exons). Taq polymerase (2.5 U;
185 Qiagen, Hilden, Germany) and 20 pmol of each primer
186 were added to the buffer supplied by the manufacturer
187 (final volume, 100 μ l), and 21 cycles (94 $^{\circ}$ C for 30 s,
188 60 $^{\circ}$ C for 30 s, and 72 $^{\circ}$ C for 35 s) of PCR were run.
189 Second rounds of PCR were performed using 2 μ l of the
190 first PCR product as template. In this second round, each
191 cDNA was amplified individually with a second set of
192

- 193 primer pairs internal to the first PCR primer pair (nested
194 primers) and positioned on two different exons. Thirty-five
195 PCR cycles were performed as described above. Then
196 10 μ l of each individual PCR was run on a 2 % agarose gel
197 in parallel with a molecular weight marker and stained with
198 ethidium bromide. The RT-PCR protocol was tested on
199 1 ng of total RNA purified from rat whole brain, and all the
200 transcripts were detected. Sizes of the PCR-generated
201 fragments were as predicted by the mRNA sequences
202 (Table 1). A control for mRNA contamination from sur-
203 rounding tissue was performed by placing a patch pipette
204 into the slice without establishing a seal. Positive pressure
205 was then interrupted and, following the removal of the
206 pipette, its content was processed as described. No PCR
207 product was obtained using this protocol ($n = 20$).
- 208 Expression of channelrhodopsin in neurons
209 of the rhomboid thalamic nucleus
- 210 All experiments were carried out in accordance with the
211 guidelines published in the European Communities Coun-
212 cil Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and
213 animal protocol has been approved by the local ethics
214 committee (Ce5/2014/00189). Recombinant lentivirus was
215 chosen as an expression vector for these experiments
216 because of its large size/small diffusion (Osten et al. 2006).
217 **AQ3** Lentivirions encoding a channelrhodopsin 2-YFP (ChR2-
218 YFP) fusion protein (pLenti-synapsin-hChR2(H134R)-
219 EYFP-WPRE, Zhang et al. 2007) were prepared by the
220 platform of the Network for Viral Transfer of the Ecole des
221 Neurosciences de Paris (P24 titer: 50–150 mg/mL) as
222 described (Maskos et al. 2005). Male Wistar rats (Janvier,
223 12–13 days old) were deeply anesthetized with an intra-
224 peritoneal injection of ketamine and xylazine (25 and
225 2.5 mg per kg body weight, respectively). Rats were
226 restrained in a stereotaxic apparatus (David Kopf instru-
227 ments, Phymep, France). The skull was exposed under
228 aseptic conditions, and a small burr hole was drilled at
229 coordinates AP = -0.18 mm and ML = 0.18 mm relative
230 to bregma. The lentivirion suspension (0.8–1.5 μ L) was
231 injected with a canula (36G70 (canula) and 26G50 (guide
232 from Cooper) in the rhomboid nucleus at a depth of
233 5.5 mm and with an angle of 20° from the medial plane.
234 The canula was slowly pulled out 5 min after the end of the
235 injection and the skull skin was sutured. Animals were
236 allowed to recover with their mother and were housed in a
237 BL-2 facility for at least 3 weeks with free access to food
238 and drink.
- 239 Photostimulation
- 240 ChR2-YFP-expressing neuronal somata and fibers were
241 visualized with a 535-nm LED (CoolLed, Andover, UK)
- and an YFP filter set (YFP-2427B-000, Semrock, 242
Rochester, NY). Photoactivation of ChR2 (1–2 ms light 243
pulses) was performed through a GFP filter set (Olympus, 244
France) using a 465-nm LED (maximal light power, 1.5 245
 mW/mm^2) driven by the data-acquisition software pClamp 246
10.2 (Molecular Devices) through the Digidata interface 247
board. For repetitive stimulation, sweeps of 34 light pulses 248
(1 ms, 2 Hz, sweep duration 17 s) followed by injection of 249
a 1-s hyperpolarizing current step (20 pA) were applied 250
every 20 s. 251
- 252 Drugs
- 253 Drugs and chemicals were obtained from Sigma (Saint 253
Louis, MO) except tetrodotoxin (TTX) from Latoxan 254
(Valence, France) and orexin B from Bachem (Heidelberg, 255
Germany). Two protocols of drugs application were used 256
depending on the experiment. Nicotinic and orexin sensi- 257
tivity as well as the existence of contralateral projections 258
were tested using a local perfusion system. A quartz cap- 259
illary (WPI, Germany) was placed at the vicinity 260
(~ 50 μ m) of layer VIb neurons and the perfusion flow was 261
adjusted at 100–150 μ L/min using a syringe pump 262
(SP2201Z, WPI). Drugs for local perfusion were prepared 263
in a solution containing (in mM): 135 NaCl, 5.4 KCl, 1.8 264
CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES, and 30 glucose (pH 7.4, 330 265
mosm). All the other experiments were carried out using 266
bath perfusion. The nicotinic receptor agonist 1-1-dime- 267
thyl-4-phenyl-piperazinium iodide (DMPP, 100 μ M) and 268
antagonist dihydro- β -erythroidine hydrobromide (DH β E, 269
0.5 μ M) were applied in the presence of the muscarinic 270
receptor antagonist atropine (5 μ M). Reproducible 271
responses to DMPP and to orexin B (400 nM) were 272
obtained with 5-min intervals between applications. 273
- 274 Intracellular labeling and immunohistochemistry
- 275 After electrophysiological recordings, slices were fixed 275
overnight at 4°C in 4 % paraformaldehyde/0.1 M phos- 276
phate buffer pH 7.4 and then rinsed in phosphate buffer 277
saline (PBS). Residual aldehyde was inactivated by incu- 278
bation with 50 mM NH₄Cl/PBS solution for 10 min at 279
room temperature followed by several washes in PBS. 280
Slices were blocked for 2 h in PBS-GT (gelatine, 2 %; 281
triton, 0.25 %) and then incubated with chicken anti-GFP 282
antibody (1:2000, Aves labs) for 3 days at 4°C . After 283
several washes in PBS-GT, slices were incubated overnight 284
at 4°C with donkey anti-chicken alexafluor488 (1:400; 285
Jackson immunoresearch) and streptavidin Alexafluor 555 286
(1:400, Invitrogen) diluted in PBS-GT. After extensive 287
washing in PBS, slices were mounted on gelatin-coated 288
slides in Fluoromount-G (Southernbiotech, Birmingham, 289
AL). Fluorescence images were acquired with a laser 290

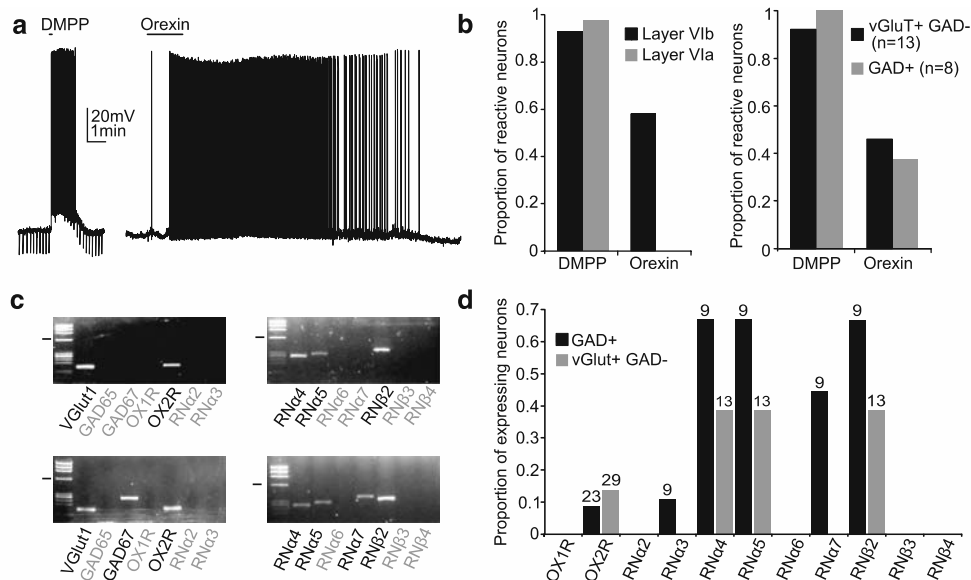


Fig. 1 Expression of nicotinic and orexin receptors in layer VIb neurons. **a** Application of DMPP (100 μ M, 10 s) and orexin (400 nM, 4 min) depolarized and elicited an AP discharge in a layer VIb neuron. **b** Summary of the proportion of neurons responding to the two agonists. *Left*: in layer VIa ($n = 17$) and VIb ($n = 57$) neurons. *Right*: in layer VIb GAD+ ($n = 8$) and VGluT + GAD- ($n = 13$) neurons. **c** *Left*: agarose gel analysis of scPCR products obtained from individual layer VIb neurons (molecular weight marker, Φ X HaeIII, the bar indicates the 603 bp fragment). *Upper panels*: expression of VGluT1, ORX2 and nicotinic receptor subunits $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\beta 2$ (RN $\alpha 4$,

RN $\alpha 5$, RN $\beta 2$) mRNAs were detected in this VGluT + GAD- putative excitatory neuron. *Lower panel*: this GAD + putative interneuron expressed ORX2 and nicotinic receptor subunits $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\beta 2$ mRNAs in addition to GAD67 and VGluT1 mRNAs. **d** Summary of scPCR results obtained in VGluT + GAD- and GAD+ layer VIb neurons (numbers are specified above the bars). Note that OX2R and $\alpha 4\alpha 5\beta 2$ nicotinic receptors subunits were found in similar proportions in VGluT + GAD- and GAD+ neurons. The nicotinic subunit $\alpha 7$ was only detected in GAD+ neurons and the OX1R was not observed

291 scanning confocal microscope (SP5, Leica) using 488- and
292 561-nm lasers, and analyzed using ImageJ.

293 Results

294 Layer VIb neurons respond to orexin and to nicotinic
295 agonists

296 Layer VIb neurons ($n = 57$) from rat neocortical slices
297 were electrophysiologically tested for their sensitivity to
298 local perfusion of orexin B (400 nM) and of the nicotinic
299 agonist DMPP (100 μ M). Neurons were selected according
300 to their non-pyramidal morphology and their localization
301 between layer VIa pyramidal neurons and the white matter.
302 The membrane potential of recorded neurons was main-
303 tained at about 5–10 mV below spike threshold by con-
304 tinuous current injection to facilitate the detection of orexin
305 responses (Bayer et al. 2004).

306 As illustrated in Fig. 1a, DMPP induced a fast depo-
307 larization in 54 out 57 neurons tested that resulted in an
308 action potential (AP) discharge in 75 % of responsive
309 neurons (Fig. 1b). Orexin B is known to activate prefer-
310 entially OX-2 receptors (Beuckmann and Yanagisawa

2002). Application of orexin B elicited a slow depolarizing
response in 34 out of 57 neurons tested (Fig. 1a, b). The
depolarization resulted in a long-lasting AP discharge in
66 % of responsive neurons. Responses to the two agonists
persisted in the presence of glutamatergic (kynurenatate
1 mM) and GABAergic (Bicuculline 10 μ M or Gabazine
2 μ M) antagonists ($n = 13$), consistent with activation of
somatodendritic receptors. Responses to these two agonists
were qualitatively similar to those earlier described in the
neocortex (Porter et al. 1999; Bayer et al. 2004; Ferezou
et al. 2007).

Investigation of layer VIa pyramidal neurons using the
same protocol revealed that all neurons tested ($n = 17$)
responded to DMPP (Fig. 1b), consistent with their reported
sensitivity to nicotinic agonists (Kassam et al. 2008).
These results confirm that layer VI neurons respond more
widely to nicotinic agonists than those of other cortical
layers, where responses are primarily restricted to the
subpopulations of GABAergic interneurons (Xiang et al.
1998; Porter et al. 1999; Gullledge and Stuart 2005). Con-
versely, no response to orexin B was observed in layer VIa
neurons ($n = 17$), in agreement with the selective action of
orexins on layer VIb among all cortical layers (Bayer et al.
2004).

335 Excitatory and inhibitory layer VIB neurons express
336 nicotinic and orexin receptors

337 We next aimed at characterizing the subtypes of nicotinic
338 and orexin receptors expressed in layer VIB neurons. Layer
339 VIB has been shown to contain both excitatory neurons and
340 inhibitory interneurons (Tömböl 1984; Mercer et al. 2005;
341 Andjelic et al. 2009; Perrenoud et al. 2013). However, no
342 conspicuous visual criterion allows discriminating between
343 glutamatergic and GABAergic neurons in layer VIB under
344 infrared microscopy examination. We thus used scPCR
345 experiments to determine receptor subtypes and their dis-
346 tribution in glutamatergic versus GABAergic neurons. The
347 scPCR protocol was designed to detect the expression of
348 mRNAs encoding the vesicular glutamate transporter
349 (VGluT1), the GABA-synthesizing enzymes (glutamic acid
350 decarboxylase, GAD 65 and GAD 67), as well as orexin
351 (OX1R and OX2R) and nicotinic receptors (RN α 2-7 and
352 RN β 2-4 subunits). Expression of orexin receptors was
353 probed in 52 neurons, while that of nicotinic receptors was
354 investigated in a subset of these neurons ($n = 22$).

355 Because the VGluT1 mRNA is often detected by scPCR
356 in GAD-positive neocortical interneurons (Gallopín et al.
357 2006; Karagiannis et al. 2009; Perrenoud et al. 2013), we
358 classified cells as VGluT + GAD− [$n = 29$ out of 52 cells
359 analyzed, known to be glutamatergic in layer VIB (Andjelic
360 et al. 2009)] and GAD+ ($n = 23$ out of 52, putative
361 interneurons). Figure 1c displays examples of the molec-
362 ular analysis of layer VIB neurons. Expression of mRNAs
363 encoding OX2R and nicotinic receptor subunits α 4, α 5, β 2
364 was detected in the VGluT + GAD− putative excitatory
365 neuron shown in the upper panel. The GAD+ putative
366 interneuron shown in the lower panel also expressed the
367 OX2R and nicotinic receptor subunits α 4, α 5, β 2. Addi-
368 tional expression of nicotinic receptor subunits α 7 was
369 detected in this cell. Expression of orexin and nicotinic
370 receptors was detected in both populations of VGluT +
371 GAD− and GAD+ cells (Fig. 1d), suggesting that both
372 neuron classes respond to their cognate agonists. This was
373 confirmed by recording responses to these agonists in a
374 subset of molecularly analyzed neurons ($n = 21$ out of 52).
375 Indeed, DMPP and orexin responses were observed in 8
376 and 3 out of 8 GAD+ cells, respectively, and in 12 and 6
377 out of 13 VGluT + GAD− cells, respectively (Fig. 1b). In
378 our sample of molecularly analyzed neurons, the OX2R
379 mRNA was observed in 6 out of 52 tested neurons (12 %),
380 while OX1R expression was never observed (Fig. 1d).
381 These results confirm earlier evidence that OX2R, but not
382 OX1R, are responsible for the effects of orexin on layer
383 VIB neurons (Bayer et al. 2004). Major nicotinic receptor
384 subunits detected in our sample of 22 tested neurons were
385 α 4, α 5 and β 2, each occurring in 11 neurons (Fig. 1d). The
386 α 7 subunit was found in 4 out of 9 GAD+ neurons, but not

387 in VGluT + GAD− neurons (Fig. 1d). The α 3 subunit was
388 only detected in one neuron and the α 6, β 3 and β 4 subunits
389 were never detected (Fig. 1d). These results indicate that
390 layer VIB neurons express heteromeric α 4- α 5- β 2 nicotinic
391 receptors, as suggested by earlier pharmacological study of
392 layer VI neurons (Kassam et al. 2008). These receptors
393 coexist with homomeric α 7 receptors in GAD+ layer VIB
394 neurons, as reported in layers I–V interneurons (Porter
395 et al. 1999; Christophe et al. 2002; Arroyo et al. 2012;
396 Bennett et al. 2012). Electrophysiological detection of or-
397 exin and nicotinic receptors appeared to be more sensitive
398 than detection of their mRNAs by scPCR, consistent with
399 previous observations, in particular for neuropeptide
400 receptors (Gallopín et al. 2006; Ferezou et al. 2007; Hu
401 et al. 2011). This differential sensitivity is presumably due
402 to the low efficiency of reverse transcriptase and to the
403 small proportion of the cell's content harvested only from
404 the soma in the patch pipette (Tsuzuki et al. 2001), as
405 previously discussed in detail (Gallopín et al. 2006; Cauli
406 and Lambollez 2010).

407 The involvement of heteromeric α 4- α 5- β 2 nicotinic
408 receptors in DMPP responses of layer VIB neurons was
409 assessed using the non- α 7 receptors antagonist DH β E
410 (0.5 μ M) in the presence of GABA and glutamate trans-
411 mission blockers (bicuculline 10 μ M; kynurenate 1 mM).
412 In the presence of DH β E, DMPP responses were reduced
413 to 29 % of control responses (from 62 ± 13.1 to
414 17.9 ± 2.7 pA, $n = 15$; $p < 0.005$; not shown), suggesting
415 that activation of non- α 7 receptors accounts for most of the
416 DMPP responses in our experimental conditions. Further-
417 more, we found that application of a low nicotine con-
418 centration (0.5 μ M) consistently elicited a depolarizing
419 response in layer VIB neurons (7.2 ± 1.9 mV, $n = 4$; not
420 shown), in agreement with the sensitivity of α 5-containing
421 receptors to submicromolar nicotine concentrations (Ra-
422 mirez-Latorre et al. 1996; Marubio and Changeux 2000).
423 These results confirm that layer VIB neurons respond to
424 orexin via OX2R receptors (Bayer et al. 2004) and indicate
425 that their responses to nicotinic agonists are essentially
426 mediated by α 4- α 5- β 2 heteromeric receptors.

427 Robust activation of layer VIB neurons by orexin
428 and nicotine co-application

429 We next aimed at taking advantage of the selective orexin
430 sensitivity of layer VIB neurons to explore their intracor-
431 tical projections. However, a significant proportion of layer
432 VIB neurons failed to reach AP threshold upon orexin
433 application when membrane potential was set at 5–10 mV
434 below spike threshold (see above). We thus tested the
435 ability of a low dose of nicotine (1 μ M) to potentiate
436 responses to orexin (400 nM) at resting membrane poten-
437 tial upon prolonged (2.5 min) bath application. Nicotine

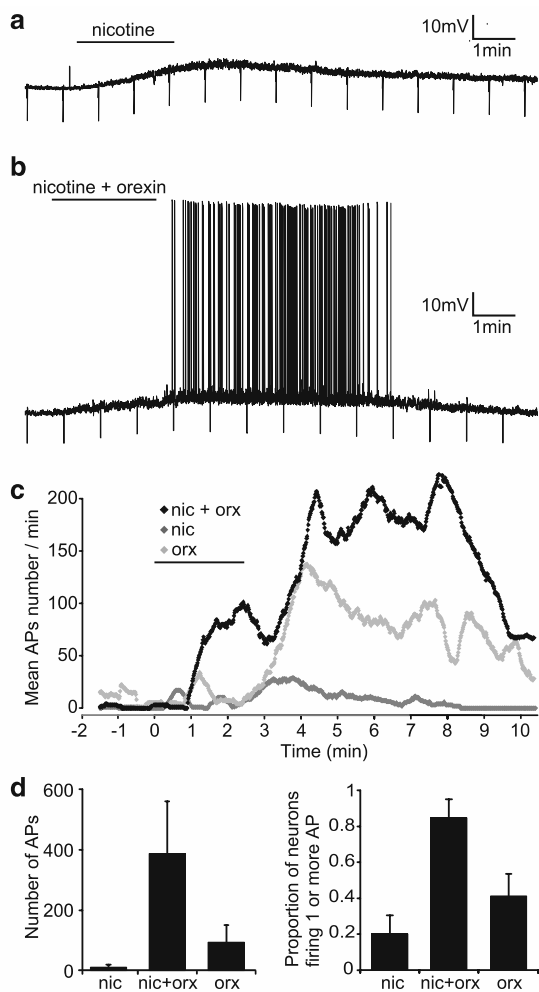


Fig. 2 Activation of layer VIb neurons by orexin and nicotine co-application. **a** Bath application of a low dose of nicotine induced a prolonged depolarization of this neuron, which did not reach AP threshold. **b** Co-application of orexin and nicotine elicited a membrane depolarization surmounted by a long train of APs. **c** Plot of the mean number of APs as a function of time in each condition. Note that nicotine potentiation shortened the mean latency and increased the mean intensity of the steady AP discharge elicited by orexin. **d** (*left*) Bart chart summarizing the mean number of APs emitted by all neurons tested (nicotine $n = 15$, nicotine + orexin $n = 13$, orexin $n = 17$) (*right*) proportion of neurons emitting one AP or more

438 alone elicited a depolarization that resulted in sparse AP
439 firing in only 27 % of layer VIb neurons tested (12 ± 2 AP
440 per neuron, $n = 15$, Fig. 2a, c, d). Orexin alone elicited a
441 membrane depolarization, which reached AP threshold in
442 only 41 % of layer VIb neurons tested (99 ± 74 APs per
443 neuron, $n = 17$, Fig. 2d). In contrast, orexin and nicotine
444 co-application elicited a robust AP discharge in 85 % of
445 layer VIb neurons (388 ± 178 APs per neuron, $n = 13$,
446 Fig. 2b–d). As illustrated in Fig. 2c, nicotine potentiation
447 shortened the mean latency and increased the mean
448 intensity of the steady AP discharge elicited by orexin,

449 thereby providing a several minutes time window to probe
450 for layer VIb functional output. In all subsequent experi-
451 ments, measurements of post-synaptic events evoked by
452 orexin + nicotine stimulation of layer VIb were per-
453 formed in a 3 min time window immediately following the
454 2.5-min co-application of the agonists.

Layer VIb activation enhances local GABAergic transmission

455
456
457 We first used nicotine and orexin co-application to confirm
458 that layer VIb GABAergic neurons are sensitive to orexin
459 effects. Recordings of layer VIb neurons ($n = 8$) showed
460 that orexin + nicotine application induced a 1.72 ± 0.31
461 fold increase of inhibitory post-synaptic currents (IPSCs)
462 frequency but did not change their amplitude (Fig. 3a, c).
463 The IPSC increase was delayed and lasted for several
464 minutes in agreement with the time course of orexin
465 + nicotine somatodendritic effects on layer VIb neurons
466 (Fig. 3b). No IPSC increase was observed upon the appli-
467 cation of nicotine alone ($n = 6$; Fig. 3b, d), excluding
468 nicotine-sensitive, orexin-insensitive interneurons from
469 other cortical layers as a source of the IPSC increase. These
470 results confirm the GABAergic nature of orexin-responsive
471 GAD+ neurons and their involvement in the neocortical
472 effects of orexin.

Layer VIb ipsilateral projections to other cortical layers

473
474 The same layer VIb stimulation protocol was used to study
475 the projection of layer VIb to other ipsilateral cortical
476 layers. Figure 4a displays an example of a layer V pyra-
477 midal neuron exhibiting an increase of excitatory post-
478 synaptic currents (EPSCs) in response to orexin + nico-
479 tine application. Similar results were obtained on eight
480 other layer V pyramidal neurons (Fig. 4d). The mean EPSC
481 increase was delayed and lasted for several minutes
482 (Fig. 4), in agreement with the time course of orexin
483 + nicotine somatodendritic effects observed upon
484 recordings of layer VIb neurons (see above). Agonists' co-
485 application induced a 1.98 ± 0.16 -fold increase of EPSC
486 frequency, but did not change the amplitude of the events
487 (Fig. 4c, d). The EPSC increase was completely prevented
488 by tetrodotoxin (TTX, $n = 3$), consistent with somato-
489 dendritic activation of layer VIb neurons by the agonists
490 (Fig. 4d). Application of nicotine alone elicited only a
491 small non-significant increase of EPSC frequency
492 (1.05 ± 0.13 -fold, $n = 6$, p value >0.05 , Fig. 4d), sug-
493 gesting that excitatory neurons outside layer VIb did not
494 significantly contribute to the EPSC increase. Similar
495 recordings in the other cortical layers also revealed an
496 EPSC frequency increase in layer VIa pyramidal neurons
497 (2.95 ± 0.37 -fold, $n = 9$, p value <0.05) and layer I

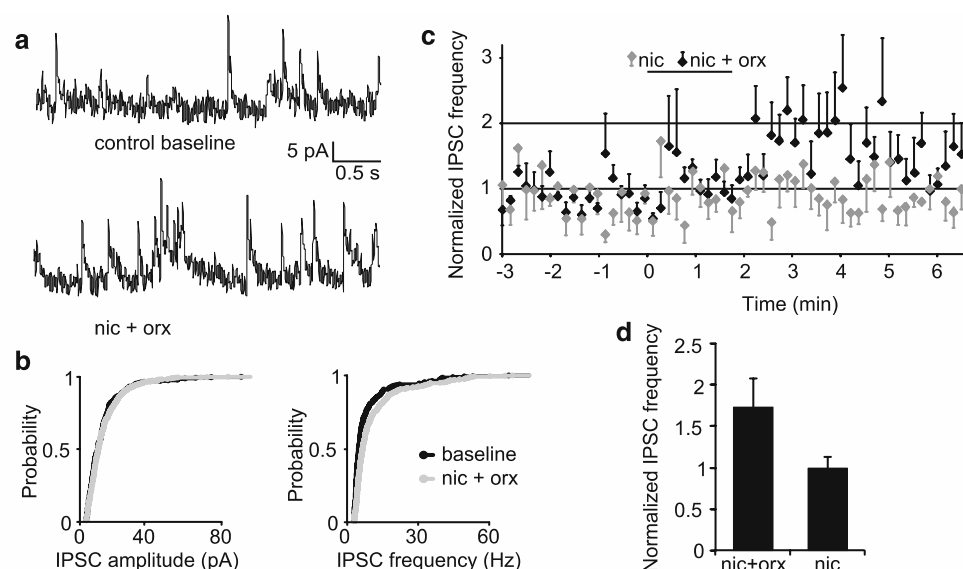


Fig. 3 Layer VIb activation enhances local GABAergic transmission. **a** IPSCs recorded in a layer VIb neuron before (*top*) and immediately after (*bottom*) co-application of nicotine (1 μ M) and orexin (400 nM). **b** Plot of IPSC frequency as a function of time. IPSC frequency was normalized to the value obtained during the minute immediately preceding drug application. IPSCs were increased by orexin and nicotine co-application, but not by nicotine

alone. **c** Cumulative probability plots for IPSC amplitude (*left*) and frequency (*right*). Note that only frequency was changed by orexin and nicotine co-application. **d** Bar chart summarizing the mean change in IPSC frequency measured during 3 min immediately following agonists application. Note that nicotine + orexin induced an increase of IPSC frequency ($n = 6$ neurons tested, $p < 0.05$), which was not observed upon application of nicotine alone ($n = 8$)

498 interneurons (1.56 ± 0.22 -fold, $n = 4$, p value < 0.05 ,
 499 Fig. 4d). A smaller EPSC increase was observed in layer II/
 500 III pyramidal neurons (1.3 ± 0.1 -fold, $n = 4$, p value
 501 < 0.05) and a non-significant EPSC increase in layer IV
 502 spiny stellate neurons (1.2 ± 0.1 fold, $n = 6$, p value
 503 > 0.05 , Fig. 4d). These observations indicate that layer VIb
 504 excitatory neurons send ipsilateral projections mainly to
 505 infragranular layers and to a lesser extent to supragranular
 506 layers, but establish few connections in layer IV.

507 Layer VIb projections to contralateral layer V
 508 pyramidal neurons

509 Layer VI sends callosal projections to the contralateral
 510 cortex (Code and Winer 1985; Prieto and Winer 1999). To
 511 test the functional contribution of sublayer VIb to these
 512 projections, we prepared coronal slices preserving com-
 513 missural axons and both hemispheres (see Materials and
 514 methods). As described in Fig. 5a, we locally applied ore-
 515 xin + nicotine on layer VIb of one hemisphere and
 516 recorded layer V pyramidal neurons in the contralateral
 517 hemisphere using a fluorescent intracellular label (Alexa
 518 488, 50 μ M). Two successive applications of agonists were
 519 performed at an interval of 40 min, during which corpus
 520 callosum was left intact ($n = 4$) or sectioned ($n = 5$).
 521 Following the first application, the patch pipette was
 522 withdrawn and the same fluorescently labeled neuron was
 523 patched again prior to the second application. The first

agonist application induced a delayed and long-lasting
 increase in EPSC frequency (2.12 ± 0.54 -fold, $n = 9$,
 p value < 0.05 , Fig. 5b–d) similar to that observed in ipsi-
 lateral layer V pyramidal neurons (see above). The second
 application produced a similar EPSC increase in slices
 where corpus callosum was intact (1.81 ± 0.62 -fold,
 $n = 4$; p value < 0.05 , Fig. 5b, d). In contrast, section of the
 corpus callosum abolished the response to the second
 application (0.94 ± 0.05 -fold, $n = 5$, p value > 0.05 ,
 Fig. 5b–d), indicating that the EPSC increase in layer V
 pyramidal neurons was mediated by commissural projec-
 tion of contralateral layer VIb neurons. These results
 indicate that layer VIb excitatory neurons send substantial
 projections to the contralateral cortex.

Expression of channelrhodopsin in neurons
 of the rhomboid nucleus

Layer VI is a major recipient of non-specific thalamic
 nuclei (Herkenham 1980). Among these nuclei, the rhom-
 boid nucleus (Rh) exhibits sensitivity to orexin and densely
 projects to layer VI of the parietal cortex (Bayer et al.
 2002; Vertes et al. 2006). To perform selective activation
 of Rh thalamocortical projections, we transduced Rh neu-
 rons with a lentivirus-driving neuron-specific expression of
 a fusion protein-containing channelrhodopsin 2 (ChR2) and
 a yellow variant (YFP) of the green fluorescent protein
 (GFP) from *Aequorea victoria* (See methods). Three to

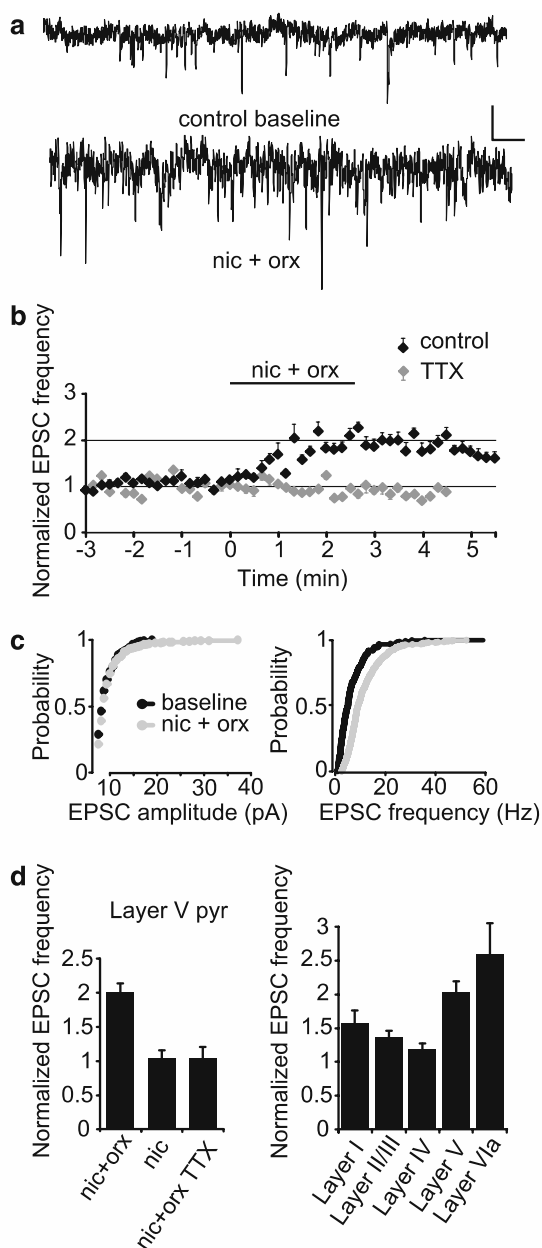


Fig. 4 Layer Vb ipsilateral projections to other cortical layers. **a** EPSCs recorded in a layer V pyramidal neuron before (*top*) and immediately after (*bottom*) co-application of nicotine (1 μ M) and orexin (400 nM). **b** Plot of EPSC frequency as a function of time. EPSC frequency was normalized to the value obtained during the minute immediately preceding agonists' application. EPSC frequency was increased by orexin and nicotine co-application, and the effect of the agonists was abolished in the presence of TTX. **c** Cumulative probability plots for EPSC frequency and amplitude. Note that only frequency was changed by orexin and nicotine co-application. **d** Bar charts summarizing the mean change in EPSC frequency measured during 3 min immediately following agonists application. *Left*: Results obtained for layer V pyramidal neurons. Note that nicotine + orexin induced an increase of EPSC frequency ($n = 9$ neurons tested, $p < 0.05$), which was abolished by TTX ($n = 4$). Conversely, nicotine alone produced a non-significant increase of EPSC frequency ($n = 5$, $p > 0.05$). *Right*: Comparison of the EPSC frequency increases elicited by nicotine + orexin in neurons from layer I ($n = 4$), layer II-III ($n = 6$), layer IV ($n = 7$), layer V ($n = 9$) and layer VIa ($n = 9$). EPSC increases were significant in all layers ($p < 0.05$) except in layer IV

slices revealed typical properties of thalamic neurons (Fig. 6b, c, Jahnsen and Llinás 1984; Crunelli et al. 1987): they exhibited a prominent depolarizing rebound following hyperpolarizing current steps and fired a tonic discharge during depolarizing steps ($n = 8$). Photostimulation (1–2 ms, see methods) consistently induced a depolarization surmounted by a burst of APs in current-clamp mode or a large inward current in voltage-clamp mode ($n = 8$ out of 8 recorded neurons, Fig. 6c). The identity of transduced Rh neurons was further assessed by testing their sensitivity to orexin (Bayer et al. 2002). In all neurons tested ($n = 7$), application of orexin B (100 nM) converted responses to repetitive photostimulation into a tonic AP discharge (Fig. 6c). These results indicate that a large proportion of Rh neurons expressed functional ChR2 and that ChR2 expression did not result in conspicuous alteration of their membrane properties.

Rh thalamocortical inputs activate layer VI neurons and trigger an orexin-dependent feedforward excitatory loop

550 four weeks after stereotaxic injections of pseudovirions,
 551 examination of acute slices revealed strong fluorescence in
 552 the Rh nucleus (Fig. 6a). Anti-GFP immunohistochemistry
 553 showed that fluorescent cell bodies were primarily circumscribed to the Rh nucleus and that labeling observed in the neighbor centromedian and nuclei reuniens was essentially due to YFP-positive fibers. Efficient transduction of Rh neurons was also assessed by the high density of YFP-labeled fibers in the parietal cortex (see Fig. 7a), which is a major target of Rh neurons but does not receive projections from the centromedian and reuniens nuclei (Berendse and Groenewegen 1991; Vertes et al. 2006). Patch-clamp recordings of neurons from transduced Rh

583 Among cortical areas, the parietal cortex receives the
 584 highest density of Rh thalamocortical projections that
 585 prominently target layer VI, but does not receive projections from the centromedian and reuniens nuclei (Berendse and Groenewegen 1991; Vertes et al. 2006). We recorded layer VIa pyramidal neurons and layer Vb polymorphic neurons in cortical slices of adult rats expressing ChR2 in Rh neurons. Recordings were performed in the parietocortical area exhibiting highest density of ChR2-YFP-expressing fibers (Fig. 7a). Neurons were visually selected based on their morphology, which was systematically confirmed using post hoc revelation of intracellular biocytin (Fig. 7b). Brief light pulses (1–2 ms) reliably evoked

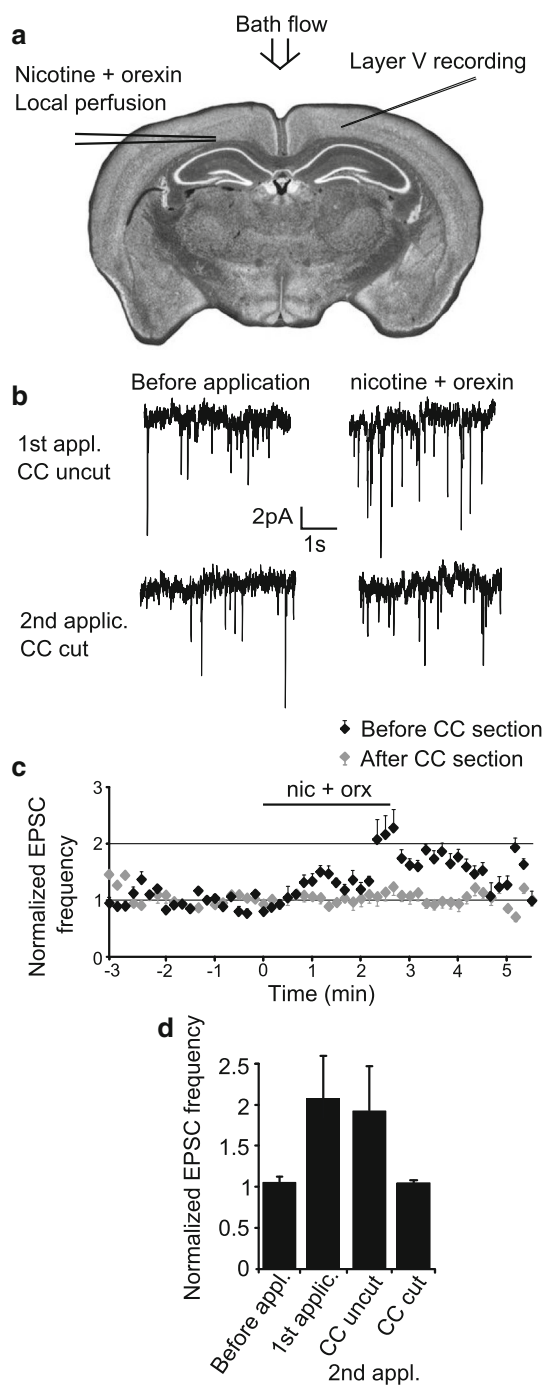


Fig. 5 Layer VIb projections to contralateral layer V pyramidal neurons. **a** Schematic representation of the experimental protocol. Local perfusion of nicotine (1 μ M) and orexin (400 nM) was used to activate layer VIb neurons from one hemisphere, while layer V pyramidal neurons were recorded in the contralateral hemisphere. Local perfusion was placed perpendicularly to the bath flow so that the agonists could not reach the contralateral hemisphere. Two successive drug applications were performed at an interval of 40 min, during which corpus callosum (CC) was left intact or sectioned. Following the first application, the patch pipette was withdrawn and the same fluorescently labeled neuron was patched again prior to the second application. **b** EPSCs recorded before and after CC sectioning in the same layer V pyramidal neuron. Note that the EPSC frequency increase elicited by nicotine + orexin application onto the contralateral hemisphere was abolished by CC sectioning. **c** Plot of the mean EPSC frequency as a function of time. EPSC frequency was normalized to the value obtained during the minute immediately preceding agonists' application. EPSC frequency was increased by nicotine + orexin application before, but not after CC sectioning ($n = 5$). **d** Summary of the mean EPSC frequency measured during the 3 min immediately following agonists application in the different conditions. The first nicotine + orexin application induced an increase of EPSC frequency ($n = 9$, p value <0.05 , paired Mann–Whitney test). The second nicotine + orexin application elicited a similar increase when CC was left intact ($n = 4$, p value <0.05 , paired Mann–Whitney test), but not when CC was sectioned ($n = 5$, p value >0.1 , paired Mann–Whitney test)

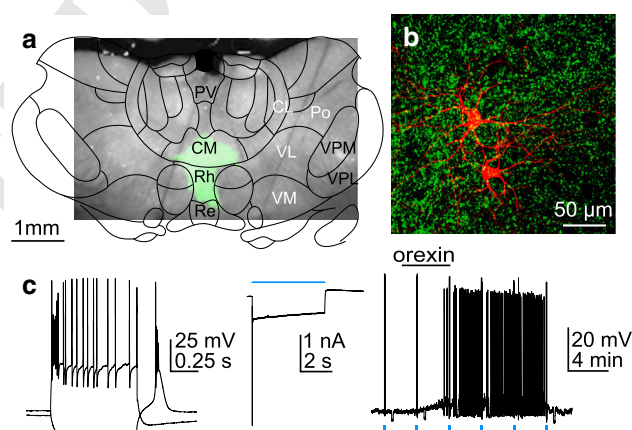


Fig. 6 Characterization of ChR2-expressing rhomboid neurons. **a** Superimposed infrared and fluorescence picture of a coronal slice showing the expression of ChR2-YFP (green) in Rh nucleus 4 weeks after injection of lentivirions. Position of thalamic nuclei is shown on the superimposed section of the rat brain atlas; CM: centromedian, Rh rhomboid, Re reunions. **b** Confocal reconstruction (z-stack) of two recorded Rh neurons (red) surrounded by ChR2-positive fibers and soma (green). **c** Depolarizing step from resting membrane potential (-70 mV) elicited a large burst of APs followed by tonic AP discharge. Hyperpolarizing step was followed by a prominent rebound surmounted by a burst of APs. **d** Responses of a ChR2-expressing Rh neuron to photostimulation recorded in voltage-clamp mode (blue bar). **e** Application of orexin B depolarized ChR2-expressing Rh neurons and converted responses to photostimulation into a tonic AP discharge

596 rapid inward currents in all layer VI neurons tested (44
597 layer VIa and 7 layer VIb neurons, see examples in
598 Fig. 7c). These photo-induced EPSCs (pEPSCs) were
599 abolished by the application of AMPA and NMDA
600 receptor antagonists (CNQX 10 μ M and AP-5 50 μ M,
601 $n = 6$) and by TTX ($n = 4$), not shown), confirming that
602 they were triggered by the photoactivation of ChR2-
603 expressing Rh glutamatergic fibers. A detailed character-
604 ization of Rh thalamocortical synaptic properties and
605 inputs to cortical layers will appear elsewhere.

Axon terminals of non-specific thalamic projections to 606
the prefrontal cortex are thought to possess functional or- 607
exin and nicotinic receptors able to activate pre-synaptic 608

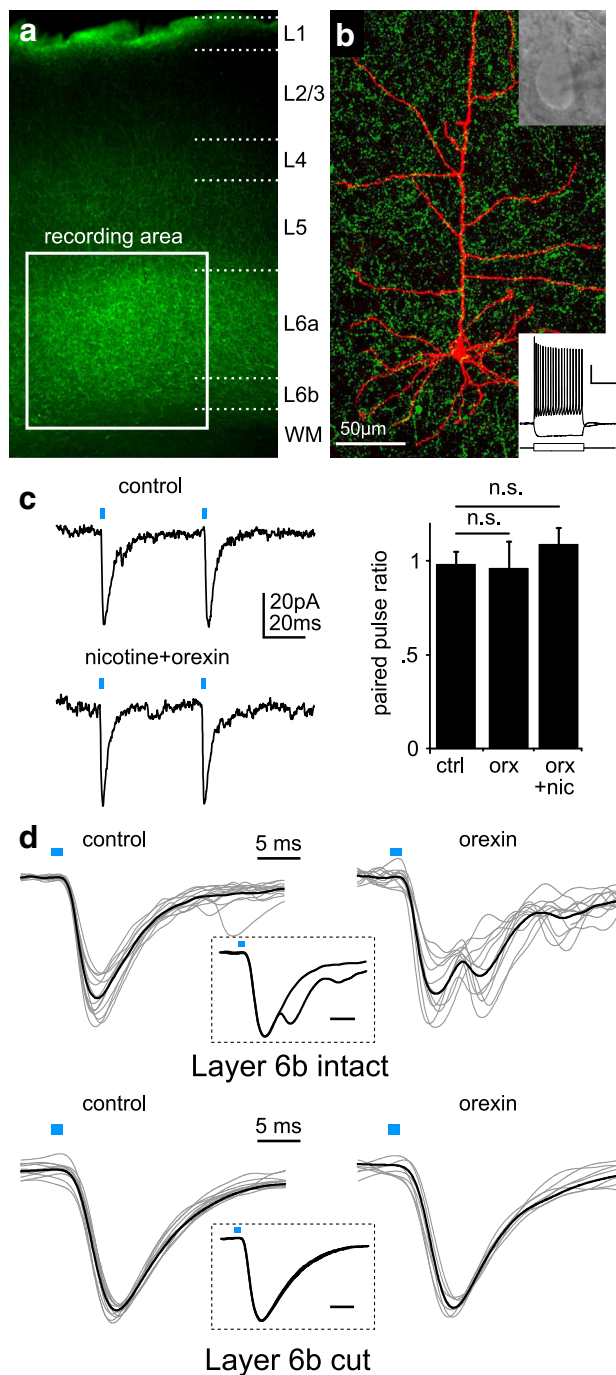


Fig. 7 Rh inputs activate layer VIa neurons and trigger delayed orexin-dependent excitation. **a** Whole field fluorescence picture of a coronal slice showing ChR2-YFP + Rh TC fibers (green) in the recording area of the parietal cortex. **b** Confocal reconstruction of a recorded layer VIa pyramid (red) surrounded by Rh fibers expressing ChR2-YFP (green). Upper and lower insets: infrared picture and firing pattern of the same neuron. **c** Left: Examples of responses to paired stimuli in indicated conditions (nicotine, 1 μ M; orexin, 400 nM). Right: Summary of paired-pulse ratios measured in indicated conditions (n.s. non-significant difference). **d** Individual (gray traces) and averaged (black) pEPSCs recorded in layer VIa neurons in control and orexin conditions. Upper panel: This neuron was recorded in intact cortical slice. Note the occurrence of an additional delayed component in the presence of orexin, as illustrated by superimposition of averaged pEPSCs in inset, indicative of a feedforward excitation mediated by layer VIb activation. Lower panel: This other neuron was first recorded in intact slice (control), but recording in the presence of orexin was performed following horizontal transection of the slice at the border between sublayers VIa and VIb (layer 6b cut). Note that the effect of orexin on pEPSCs was prevented by the transection

pA, $p > 0.5$) or between paired-pulse ratios measured in control and drug conditions ($p > 0.5$, Fig. 7c). These results confirm that the effects of orexin and of nicotine + orexin observed in the present study are mainly due to somatodendritic activation of layer VIb neurons.

We next asked whether the activation of layer VIb by orexin impacts cortical responses to Rh inputs. The above results indicate that layer VIa is the target of both Rh and layer VIb projections and that these two sublayers receive Rh inputs. We thus recorded responses of layer VIa pyramidal cells ($n = 8$) to photostimulation of Rh thalamocortical fibers in the presence or absence of orexin (400 nM). As exemplified in Fig. 7d for one of these neurons, pEPSCs recorded in the absence of orexin exhibited an essentially monotonous decay. Application of orexin converted these monophasic pEPSCs into a biphasic response with a secondary peak occurring roughly 5 ms after the first peak of the response (Fig. 7d). Essentially, similar results were obtained in the seven other neurons recorded. In order to confirm that the orexin-dependent component of pEPSCs relied on activation of layer VIb neurons, we interrupted layer VIb output to upper layers via horizontal transection of the cortical slice. Transection was performed with a razor blade just below the limit between sublayers VIa and VIb, which appeared in a lighter shade of gray than layer VIa under visible light illumination, due to higher overall myelination of layer VIb and the presence of a dense network of fibers between the sublayers (Bayer et al. 2004). We first recorded light-induced responses of layer VIa pyramidal cells ($n = 4$) in intact slices and in the absence of orexin using a fluorescent intracellular label (Alexa 488, 50 μ M). The patch pipette was then withdrawn and, following slice transection, the same

609 release of glutamate (Lambe and Aghajanian 2003). To test
610 for the presence of these receptors on Rh axon terminals,
611 we examined the effects of orexin (400 nM) or nico-
612 tine + orexin (1 μ M and 400 nM, respectively) on the
613 paired-pulse ratio of pEPSCs elicited by repetitive stimu-
614 lation of Rh fibers (20 Hz) in layer VIa pyramidal neurons
615 ($n = 8$ and 7, respectively). No significant difference was
616 observed between the amplitudes of responses to the first
617 pulse (orexin vs. control: 48.1 ± 4.5 vs. 44.5 ± 7.7 pA,
618 nicotine + orexin vs. control: 36.2 ± 6.6 vs. 30.1 ± 4.9

653 fluorescent neuron was patched again to record light-
 654 induced responses in the presence of orexin (400 nM). As
 655 exemplified in Fig. 7d for one of these neurons, tran-
 656 section prevented the effect of orexin on the shape of
 657 pEPSCs. Essentially, similar results were obtained in the
 658 three other neurons recorded. Indeed, pEPSCs recorded
 659 before and after transection were almost superimposable
 660 and their mean amplitude was virtually unchanged
 661 (amplitude ratio post/pre-transection: 0.95 ± 0.11 , $n = 4$
 662 neurons). These data confirm that the orexin-dependent
 663 component of layer VIa responses to Rh inputs relies on
 664 activation of layer VIb neurons. Hence, our results indi-
 665 cate that, in the presence of orexin, Rh inputs effectively
 666 recruit layer VIb that in turn mediates feedforward
 667 excitation of layer VIa neurons.

668 Excitation of layer VIb by orexin enhances
 669 the reliability and time precision of layer VIa responses
 670 to Rh inputs

671 We next investigated the effect of the orexin-gated
 672 feedforward loop mediated by layer VIb on the recruit-
 673 ment of layer VIa pyramidal neurons by Rh inputs.
 674 Responses of layer VIa pyramidal cells ($n = 6$) to pho-
 675 tostimulation of Rh thalamocortical fibers in the presence
 676 or absence of orexin were recorded in current-clamp
 677 mode. A continuous current was injected to reach a
 678 membrane potential allowing roughly one-fourth of
 679 photostimuli to trigger AP discharge in control condition.
 680 Sweeps of 34 stimuli (1-ms light pulse, 2 Hz) were
 681 repeated every 20 s and the number of APs per sweep
 682 was measured. Following a 5-min baseline in control
 683 condition, bath application of orexin (400 nM, 5 min)
 684 elicited a roughly twofold increase of AP number per
 685 sweep, which slowly declined after the end of orexin
 686 application (Fig. 8a, b). This indicates that specific acti-
 687 vation of layer VIb potentiates responses of layer VIa
 688 neurons to Rh inputs. We next examined the time preci-
 689 sion of AP discharge triggered by Rh inputs in control
 690 and in orexin conditions by measuring the latency
 691 between the onset of individual light pulses and the peak
 692 of APs. We observed a large variability in the delay-to-
 693 onset of APs in control conditions, with only 36 % of
 694 APs being emitted in the 20-ms post-stimulus interval
 695 (Fig. 8c, d). Application of orexin markedly decreased
 696 the jitter of AP discharge, 65 % of which occurring within
 697 the 20-ms post-stimulus interval (Fig. 8c, d). This result-
 698 ed in a significant decrease of the mean delay-to-onset of
 699 APs in orexin as compared to control conditions
 700 ($p < 0.05$, Fig. 8d). These results indicate that layer VIb
 701 acts as an orexin-dependent feedforward excitatory loop
 702 that potentiates layer VIa responses to Rh inputs and
 703 increases their time precision.

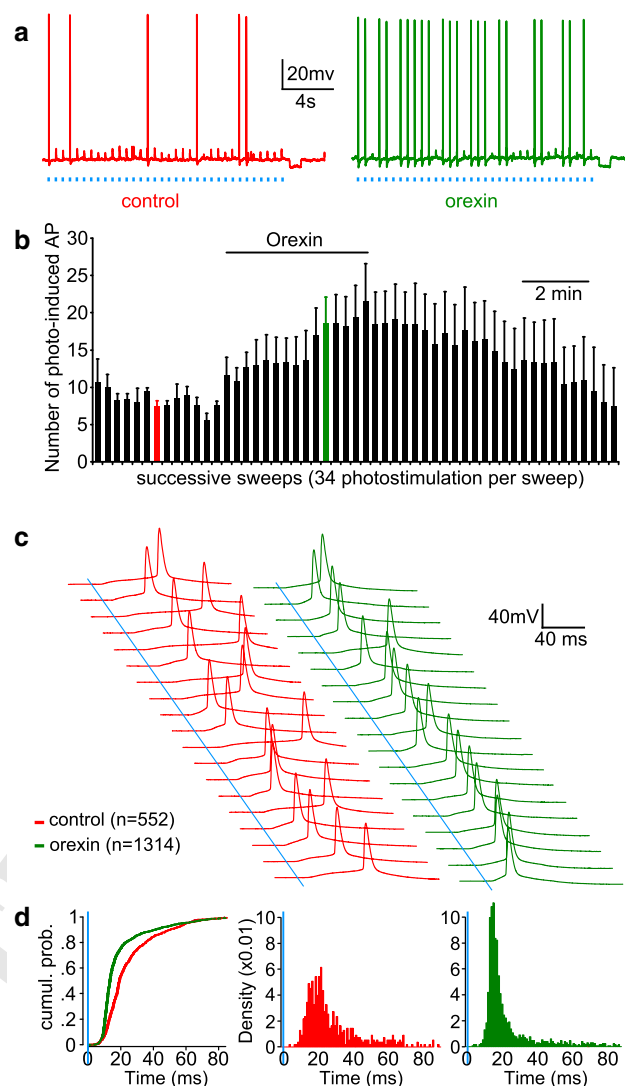


Fig. 8 Orexin potentiates responses of layer VIa pyramids to Rh inputs and increases spike-timing precision. **a** *Left*: photostimulation intensity and current injection were adjusted to induce 7–8 APs in response to sweeps of 34 light pulses in control conditions. *Right*: Application of orexin increases the rate of AP firing upon photostimulation. **b** *Bar chart* summarizing the mean AP number obtained along successive sweeps (*red* and *green* refer to examples shown in **a**). Note that AP number roughly doubled during orexin application and then slowly declined to baseline rate. **c** Alignment of APs relative to photostimuli (*blue line*) exemplifies the effect of orexin on spike-timing variability. **d** *Left*: Cumulative probability plot for AP delay-to-onset. *Center and right*: Distribution of AP delay-to-onset in control (*red*) and orexin (*green*) conditions

Discussion

We characterized the sensitivity of layer VIb excitatory and inhibitory neurons to nicotine and orexin and took advantage of their sublayer-specific synergy to map the intracortical projections of layer VIb. We found that layer VIb excitatory neurons contact mainly infragranular neurons of both ipsi and contralateral hemispheres and virtually avoid

- 711 layer IV. Using selective optogenetic stimulation of Rh
712 thalamocortical fibers, we observed that orexin potentiates
713 responses of layer VIa pyramidal neurons to Rh inputs and
714 increases their temporal precision. These results indicate
715 that layer VIb acts as an orexin-dependent excitatory
716 feedforward loop of non-specific thalamocortical inputs
717 that may participate in bilateral cortical arousal.
- 718 Sensitivity of layer VIb to nicotinic agonists and orexin
- 719 Deep neocortical layers receive a high density of cholin-
720 ergic fibers from the basal forebrain and orexinergic fibers
721 from the lateral hypothalamus (Eckenstein et al. 1988;
722 Peyron et al. 1998). Sensitivity to nicotinic agonists has
723 been earlier demonstrated in layer VI neurons (Kassam
724 et al. 2008), and layer VIb is the only cortical lamina sen-
725 sitive to orexin (Bayer et al. 2004). The present study
726 extends these reports by showing that these somatodendritic
727 sensitivities are shared by excitatory and inhibitory layer
728 VIb neurons and assessing receptors involved. We confirm
729 that the selective effects of orexin on layer VIb are mediated
730 by OX2R (Bayer et al. 2004), consistent with expression
731 patterns of OX1R and OX2R in the brain (Trivedi et al.
732 1998). Properties of nicotinic currents in layer VI neurons
733 suggest that they are mediated by $\alpha 4\beta 2$ -containing recep-
734 tors (Kassam et al. 2008; Poorthuis et al. 2013). Our
735 molecular and pharmacological analyses confirm that $\alpha 4\beta 2$ -
736 containing receptors mediate the largest part of the nicotinic
737 current in layer VIb neurons and reveal expression of the
738 accessory subunit $\alpha 5$, consistent with earlier studies of layer
739 VI in wild-type and $\alpha 5^{-/-}$ mice (Winzer-Serhan and Leslie
740 2005; Bailey et al. 2010; Poorthuis et al. 2013). The $\alpha 5$
741 subunit confers submicromolar sensitivity to nicotine to
742 $\alpha 4\beta 2$ heteromeric receptors (Ramirez-Latorre et al. 1996;
743 Kuryatov et al. 2008), and we used this property to induce
744 **AQ4** long-lasting subthreshold depolarization of layer VIb neu-
745 rons and enhance their selective excitation by orexin.
746 Indeed, 1- μ M nicotine alone was not sufficient to trigger AP
747 discharge in layer VIb neurons, but potentiated the effect of
748 orexin on these neurons. Likewise, the frequency of EPSCs
749 and IPSCs recorded in layers V and VIb remained
750 unchanged in the presence of 1- μ M nicotine alone, indi-
751 cating also that this concentration was too low to induce
752 significant AP discharge in most cortical neuron types.
753 Finally, our molecular analysis suggests that GABAergic
754 interneurons additionally express $\alpha 7$ receptors, consistent
755 with the expression of this receptor in interneuron subtypes
756 of supra- and infragranular cortical layers (Porter et al.
757 1999; Christophe et al. 2002; Arroyo et al. 2012; Bennett
758 et al. 2012). Due to its low affinity to nicotinic agonists and
759 fast desensitization (Christophe et al. 2002), the functional
760 contribution of $\alpha 7$ receptors could not be appreciated from
761 our bath application experiments.
- Cortical projections of layer VIb neurons 762
- Layer VIb intracortical projections have been the subject of 763
essentially anatomical reports. Layer VIb neurons pre- 764
dominantly project cortico-cortically towards ipsilateral or 765
contralateral targets (Prieto and Winer 1999; Arimatsu 766
et al. 2003), but their output pattern to other layers is 767
controversial. Indeed, some studies suggest that layer VIb 768
projections are confined to infragranular layers (Zhang and 769
Deschenes 1998; Mercer et al. 2005), whereas others 770
indicate that these projections reach supragranular layers 771
(Valverde et al. 1989; Usrey and Fitzpatrick 1996; Hirsch 772
et al. 1998; Clancy and Cauller 1999; Marx and Feldmeyer 773
2013), and further discrepancies exist between these 774
reports regarding projections to individual layers. We used 775
nicotine and orexin co-application to activate layer VIb 776
neurons selectively and probe their intracortical output. 777
The observed increase in EPSC and IPSC frequency was 778
due to somatodendritic activation of layer VIb neurons 779
since: (1) expression of orexine receptors in the neocortex 780
is selective of layer VIb (Trivedi et al. 1998; Bayer et al. 781
2004), (2) nicotine alone was ineffective, (3) EPSC 782
increase was prevented by TTX, (4) Rh inputs to layer VIa 783
neurons in the parietal cortex were insensitive to pre-syn- 784
aptic modulation by nicotine and orexine co-application. 785
We found that layer VIb neurons connect primarily infra- 786
granular neurons, with a preference for layer VIa over layer 787
V, in agreement with the major location of their axonal 788
ramification (Valverde et al. 1989; Zhang and Deschenes 789
1997; Mercer et al. 2005; Marx and Feldmeyer 2013). We 790
observed a smaller increase of EPSC frequency in neurons 791
of supragranular layers, consistent with the lower occur- 792
rence of layer VIb axons reaching these layers (Valverde 793
et al. 1989; Usrey and Fitzpatrick 1996; Zhang and 794
Deschenes 1997; Clancy and Cauller 1999; Hirsch et al. 795
1998; Marx and Feldmeyer 2013). Conversely, our results **AQ5** 796
suggest that layer VIb neurons establish almost no contact 797
on layer IV excitatory neurons, as earlier reported (Usrey 798
and Fitzpatrick 1996). We also found that layer VIb acti- 799
vation had similar effects in ipsilateral and contralateral 800
layer V pyramidal neurons, consistent with an estimate of 801
50 % commissural neurons in layer VIb of the rat (Ar- 802
imatsu et al. 2003). Hence, the present results suggest that **AQ6** 803
layer VIb mainly targets bilateral infragranular layers, 804
which are the major source of corticofugal projections, but 805
exerts little influence on layer IV, which is a major reci- 806
pient of primary sensory inputs. 807
- Role of layer VIb in thalamocortical circuits 808
- Our results indicate that layer VIb neurons are the exclu- 809
sive target of orexin modulation in the parietal cortex and 810
that this sublayer plays an important role in the integration 811

812 of non-specific thalamocortical inputs. The orexin sensi-
 813 tivity of layer VIb extends throughout the antero-posterior
 814 axis of the neocortex (Bayer et al. 2004), indicating that
 815 layer VIb widely mediates the cortical effects of orexin.
 816 Orexin is thought to activate glutamate release from non-
 817 specific thalamic axon terminals in the prefrontal cortex
 818 (Lambe and Aghajanian 2003), which is a major target of
 819 orexin-sensitive centromedian and reuniens midline nuclei
 820 (Van der Werf et al. 2002; Bayer et al. 2004; Vertes 2006).
 821 Such effect was not observed in the present study, sug-
 822 gesting that projections of these latter nuclei to the pre-
 823 frontal cortex may differ from those of the Rh nucleus in
 824 the expression of pre-synaptic orexin receptors. Layer VI is
 825 the major recipient of non-specific thalamic inputs (Her-
 826 kenham 1980; Van der Werf et al. 2002; Vertes et al.
 827 2006). Accordingly, we found that neurons of both sub-
 828 layers VIa and VIb are activated by Rh inputs. Further-
 829 more, we observed that orexin potentiates responses of
 830 layer VIa pyramidal neurons to Rh inputs and increases
 831 their temporal precision. Our results thus indicate that layer
 832 VIb acts as an orexin-gated feedforward loop that enhances
 833 Rh thalamocortical responses. Layer VIb may similarly
 834 enhance responses to inputs from other non-specific tha-
 835 lamic nuclei onto other cortical area. Given the projection
 836 pattern of layer VIb, it is likely that this effect influences
 837 primarily infragranular layers, but has little impact on the
 838 integration of thalamocortical sensory information in layer
 839 IV. Since both layer VIb and midline thalamic nuclei
 840 project bilaterally, it is also likely that the orexin-depen-
 841 dent activation of layer VIb promotes bilateral synchroni-
 842 zation and balanced excitation of both hemi-cortices by
 843 midline thalamic inputs. It is noteworthy that acetylcholine
 844 exerts widespread effects on the thalamocortical network,
 845 but also excites layer VIb neurons and may thus gate their
 846 recruitment by non-specific thalamic inputs. However, the
 847 nicotinic effects evidenced in the present study (see also
 848 Kassam et al. 2008) are more phasic than those of orexin,
 849 which tonically upregulates neuronal excitability. Hence,
 850 acetylcholine-dependent recruitment of layer VIb may
 851 require synchrony between cholinergic and non-specific
 852 thalamic inputs, whereas orexin-dependent recruitment is
 853 likely to proceed on a more tonic mode. Non-specific
 854 thalamic nuclei collectively upregulate cortical arousal
 855 (Moruzzi and Magoun 1949; Jasper et al. 1953), but these
 856 diverse nuclei subserve specific roles in sensory-motor and
 857 cognitive functions associated with well-defined and
 858 complementary innervations of cortical areas (Berendse
 859 and Groenewegen 1991; Van der Werf et al. 2002; Vertes
 860 et al. 2006; Hembrook and Mair 2011; Loureiro et al. 2012;
 861 Cholvin et al. 2013). Orexins promote arousal and vigi-
 862 lance and likewise change the firing of Rh neurons from
 863 bursting to tonic (Bayer et al. 2002), which facilitates
 864 cortical activation and allows information transfer

(McCormick and Bal 1997). Our results indicate that layer
 VIb contributes to the diverse functions of non-specific
 thalamocortical pathways by enhancing the reliability and
 temporal precision of cortical responses and of the cortico-
 thalamic feedback.

Acknowledgments The authors thank Célya Gruson-Daniel,
 Anastassios Karagiannis, Uwe Maskos, Stéphanie Pons, Martine
 Soudan and the IBPS Cell Imaging Facility for their valuable help.
 This work was supported by Centre National de la Recherche Sci-
 entifique, Université Pierre et Marie Curie-P6 and by grants from
 Ecole des Neurosciences de Paris (“Network for Viral Transfer”),
 Fondation pour la Recherche sur le Cerveau/Rotary Club de France
 and Agence Nationale de la Recherche (“IHU Institut de Neurosci-
 ences Translationnelles de Paris”).

References

- Andjelic S, Gallopin T, Cauli B, Hill EL, Roux L, Badr S, Hu E, Tamas G, Lambolez B (2009) Glutamatergic nonpyramidal neurons from neocortical layer VI and their comparison with pyramidal and spiny stellate neurons. *J Neurophysiol* 101:641–654
- Arimatsu Y, Ishida M, Kaneko T, Ichinose S, Omori A (2003) Organization and development of corticocortical associative neurons expressing the orphan nuclear receptor Nurr1. *J Comp Neurol* 466:180–196
- Arroyo S, Bennett C, Aziz D, Brown SP, Hestrin S (2012) Prolonged disinaptic inhibition in the cortex mediated by slow, non-alpha7 nicotinic excitation of a specific subset of cortical interneurons. *J Neurosci* 32:3859–3864
- Bailey CDC, De Biasi M, Fletcher PJ, Lambe EK (2010) The nicotinic acetylcholine receptor alpha5 subunit plays a key role in attention circuitry and accuracy. *J Neurosci* 30:9241–9252
- Bayer L, Eggermann E, Saint-Mieux B, Machard D, Jones BE, Muhlethaler M, Serafin M (2002) Selective action of orexin (hypocretin) on nonspecific thalamocortical projection neurons. *J Neurosci* 22:7835–7839
- Bayer L, Serafin M, Eggermann E, Saint-Mieux B, Machard D, Jones BE, Muhlethaler M (2004) Exclusive postsynaptic action of hypocretin-orexin on sublayer 6b cortical neurons. *J Neurosci* 24:6760–6764
- Bennett C, Arroyo S, Berns D, Hestrin S (2012) Mechanisms generating dual-component nicotinic EPSCs in cortical interneurons. *J Neurosci* 32:17287–17296
- Berendse HW, Groenewegen HJ (1991) Restricted cortical termination fields of the midline and intralaminar thalamic nuclei in the rat. *Neuroscience* 42:73–102
- Beuckmann CT, Yanagisawa M (2002) Orexins: from neuropeptides to energy homeostasis and sleep/wake regulation. *J Mol Med* 80:329–342
- Bochet P, Audinat E, Lambolez B, Crepel F, Rossier J, Iino M, Tsuzuki K, Ozawa S (1994) Subunit composition at the single-cell level explains functional properties of a glutamate-gated channel. *Neuron* 12:383–388
- Cauli B, Lambolez B (2010) Gene analysis of single cells. In: Bontoux N, Potier MC (eds) Unravelling single cell genomics, RSC nanoscience and nanotechnology No 15, The Royal Society of Chemistry, pp 81–92
- Cauli B, Audinat E, Lambolez B, Angulo MC, Ropert N, Tsuzuki K, Hestrin S, Rossier J (1997) Molecular and physiological diversity of cortical nonpyramidal cells. *J Neurosci* 17:3894–3906

- 925 Chen CC, Abrams S, Pinhas A, Brumberg JC (2009) Morphological
926 heterogeneity of layer VI neurons in mouse barrel cortex.
927 *J Comp Neurol* 512:726–746
- 928 Cholvin T, Loureiro M, Cassel R, Cosquer B, Geiger K, De Sa
929 Nogueira D, Raingard H, Robelin L, Kelche C, Pereira de
930 Vasconcelos A, Cassel JC (2013) The ventral midline thalamus
931 contributes to strategy shifting in a memory task requiring both
932 prefrontal cortical and hippocampal functions. *J Neurosci*
933 33:8772–8783
- 934 Christophe E, Roebuck A, Staiger JF, Lavery DJ, Charpak S, Audinat
935 E (2002) Two types of nicotinic receptors mediate an excitation
936 of neocortical layer I interneurons. *J Neurophysiol*
937 88:1318–1327
- 938 Clancy B, Caulier LJ (1999) Widespread projections from subgriseal
939 neurons (layer VII) to layer I in adult rat cortex. *J Comp Neurol*
940 407:275–286
- 941 Code RA, Winer JA (1985) Commissural neurons in layer III of cat
942 primary auditory cortex (AI): pyramidal and non-pyramidal cell
943 input. *J Comp Neurol* 242:485–510
- 944 Crumelli V, Kelly JS, Leresche N, Pirchio M (1987) On the excitatory
945 post-synaptic potential evoked by stimulation of the optic tract in
946 the rat lateral geniculate nucleus. *J Physiol* 384:603–618
- 947 de Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE,
948 Fukuhara C, Battenberg EL, Gautvik VT, Bartlett FS, Frankel
949 WN, van den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, Sutcliffe JG
950 (1998) The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with
951 neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:322–327
- 952 Eckenstein FP, Baughman RW, Quinn J (1988) An anatomical study
953 of cholinergic innervation in rat cerebral cortex. *Neuroscience*
954 25:274–457
- 955 Ferezou I, Hill EL, Cauli B, Gibelin N, Kaneko T, Rossier J,
956 Lambolez B (2007) Extensive overlap of mu-opioid and
957 nicotinic sensitivity in cortical interneurons. *Cereb Cortex*
958 17:1948–1957
- 959 Gallopin T, Geoffroy H, Rossier J, Lambolez B (2006) Cortical
960 sources of CRF, NKB, and CCK and their effects on pyramidal
961 cells in the neocortex. *Cereb Cortex* 16:1440–1452
- 962 Gullede AT, Stuart GJ (2005) Cholinergic inhibition of neocortical
963 pyramidal neurons. *J Neurosci* 25:10308–10320
- 964 Hembrook JR, Mair RG (2011) Lesions of reuniens and rhomboid
965 thalamic nuclei impair radial maze win-shift performance.
966 *Hippocampus* 21:815–826
- 967 Herkenham M (1980) Laminar organization of thalamic projections to
968 the rat neocortex. *Science* 207:532–535
- 969 Hirsch JA, Gallagher CA, Alonso JM, Martinez LM (1998) Ascend-
970 ing projections of simple and complex cells in layer 6 of the cat
971 striate cortex. *J Neurosci* 18:8086–8094
- 972 Hu E, Demmou L, Cauli B, Gallopin T, Geoffroy H, Harris-Warrick
973 RM, Paupardin-Tritsch D, Lambolez B, Vincent P, Hepp R
974 (2011) VIP, CRF, and PACAP act at distinct receptors to elicit
975 different cAMP/PKA dynamics in the neocortex. *Cereb Cortex*
976 21:708–718
- 977 Jahnsen H, Llinás R (1984) Electrophysiological properties of guinea-
978 pig thalamic neurones: an in vitro study. *J Physiol* 349:205–226
- 979 Jasper H, Ajmone-Marsan C, Hanbery J (1953) Pathways and
980 functional properties of the nonspecific thalamo-cortical projec-
981 tion system. *Trans Am Neurol Assoc* 3:9–11
- 982 Jones E (2007) Principles of thalamic organization. In: Jones E (ed)
983 *The Thalamus*, 2nd edn. Cambridge University Press, pp 87–170
- 984 Karagiannis A, Gallopin T, David C, Battaglia D, Geoffroy H,
985 Rossier J, Hillman EM, Staiger JF, Cauli B (2009) Classification
986 of NPY-expressing neocortical interneurons. *J Neurosci*
987 29:3642–3659
- 988 Kassam SM, Herman PM, Goodfellow NM, Alves NC, Lambe EK
989 (2008) Developmental excitation of corticothalamic neurons by
990 nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurosci* 28:8756–8764
- Kuryatov A, Onksen J, Lindstrom J (2008) Roles of accessory
991 subunits in alpha4 beta2* nicotinic receptors. *Mol Pharmacol*
992 74:132–143
- Lambe EK, Aghajanian GK (2003) Hypocretin (orexin) induces
994 calcium transients in single spines postsynaptic to identified
995 thalamocortical boutons in prefrontal slice. *Neuron* 40:139–150
996
- Lambolez B, Audinat E, Bochet P, Crepel F, Rossier J (1992) AMPA
997 receptor subunits expressed by single Purkinje cells. *Neuron*
998 9:247–258
- Loureiro M, Cholvin T, Lopez J, Merienne N, Latreche A, Cosquer B,
1000 Geiger K, Kelche C, Cassel JC, Pereira de Vasconcelos A (2012)
1001 The ventral midline thalamus (reuniens and rhomboid nuclei)
1002 contributes to the persistence of spatial memory in rats.
1003 *J Neurosci* 32:9947–9959
- Marubio LM, Changeux J (2000) Nicotinic acetylcholine receptor
1005 knockout mice as animal models for studying receptor function.
1006 *Eur J Pharmacol* 393:113–121
- Marx M, Feldmeyer D (2013) Morphology and physiology of
1007 excitatory neurons in layer 6b of the somatosensory rat barrel
1008 cortex. *Cereb Cortex* 23:2803–2817
- Maskos U, Molles BE, Pons S, Besson M, Guiard BP, Guilloux JP,
1010 Evrard A, Cazala P, Cormier A, Mameli-Engvall M, Dufour N,
1011 Cloëz-Tayarani I, Bemelmans AP, Mallet J, Gardier AM, David
1012 V, Faure P, Granon S, Changeux JP (2005) Nicotine reinforce-
1013 ment and cognition restored by targeted expression of nicotinic
1014 receptors. *Nature* 436:103–107
- McCormick DA, Bal T (1997) Sleep and arousal: thalamocortical
1016 mechanisms. *Annu Rev Neurosci* 20:185–215
- Mercer A, West DC, Morris OT, Kirchhecker S, Kerckhoff JE,
1017 Thomson AM (2005) Excitatory connections made by presyn-
1018 aptic cortico-cortical pyramidal cells in layer 6 of the neocortex.
1019 *Cereb Cortex* 15:1485–1496
- Moruzzi G, Magoun HW (1949) Brain stem reticular formation and
1021 activation of the eeg. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*
1022 1:455–473
- Osten P, Dittgen T, Licznernski P (2006) Lentivirus-based genetic
1023 manipulations in neurons In Vivo. In: Kittler JT, Moss SJ (eds)
1024 *The Dynamic synapse: molecular methods in Ionotropic Receptor
1025 Biology* chapter 13. CRC Press, Boca Raton
- Perrenoud Q, Rossier J, Geoffroy H, Vitalis T, Gallopin T (2013)
1026 Diversity of GABAergic interneurons in layer VIa and VIb of
1027 mouse barrel cortex. *Cereb Cortex* 23:423–441
- Peyron C, Tighe DK, van den Pol AN, de Lecea L, Heller HC,
1029 Sutcliffe JG, Kilduff TS (1998) Neurons containing hypocretin
1030 (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci*
1031 18:9996–10015
- Poorthuis RB, Bloem B, Verhoog MB, Mansvelder HD (2013) Layer-
1032 specific interference with cholinergic signaling in the prefrontal
1033 cortex by smoking concentrations of nicotine. *J Neurosci*
1034 33:4843–4853
- Porter JT, Cauli B, Tsuzuki K, Lambolez B, Rossier J, Audinat E
1035 (1999) Selective excitation of subtypes of neocortical interneu-
1036 rons by nicotinic receptors. *J Neurosci* 19:5228–5235
- Prieto JJ, Winer JA (1999) Layer VI in cat primary auditory cortex:
1037 golgi study and sublaminal origins of projection neurons.
1038 *J Comp Neurol* 404:332–358
- Ramirez-Latorre J, Yu CR, Qu X, Perin F, Karlin A, Role L (1996)
1039 Functional contributions of alpha5 subunit to neuronal acetyl-
1040 choline receptor channels. *Nature* 380:347–351
- Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka
1041 H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch
1042 JR, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty
1043 DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ,
1044 Yanagisawa M (1998) Orexins and orexin receptors: a family
1045 of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors
1046 that regulate feeding behavior. *Cell* 92:573–585

- 1057 Stuart GJ, Dodt HU, Sakmann B (1993) Patch-clamp recordings from
1058 the soma and dendrites of neurons in brain slices using infrared
1059 video microscopy. *Pflugers Arch* 423:511–518
- 1060 Tömböl T (1984) Layer VI Cells. *Cerebral Cortex*. Plenum, New
1061 York and London, pp 479–520
- 1062 Trivedi P, Yu H, MacNeil DJ, Van der Ploeg LH, Guan XM (1998)
1063 Distribution of orexin receptor mRNA in the rat brain. *FEBS*
1064 *Lett* 438:71–75
- 1065 Tsuzuki K, Lambolez B, Rossier J, Ozawa S (2001) Absolute
1066 quantification of AMPA receptor subunit mRNAs in single
1067 hippocampal neurons. *J Neurochem* 77:1650–1659
- 1068 Usrey WM, Fitzpatrick D (1996) Specificity in the axonal connections
1069 of layer VI neurons in tree shrew striate cortex: evidence for
1070 distinct granular and supragranular systems. *J Neurosci*
1071 16:1203–1218
- 1072 Valverde F, Facal-Valverde MV, Santacana M, Heredia M (1989)
1073 Development and differentiation of early generated cells of
1074 sublayer VIb in the somatosensory cortex of the rat: a correlated
1075 Golgi and autoradiographic study. *J Comp Neurol*. 290:118–140
- 1076 van Brederode JF, Snyder GL (1992) A comparison of the electro-
1077 physiological properties of morphologically identified cells in
1078 layers 5B and 6 of the rat neocortex. *Neuroscience* 50:315–337
- 1079 Van der Werf YD, Witter MP, Groenewegen HJ (2002) The
1080 intralaminar and midline nuclei of the thalamus. anatomical
and functional evidence for participation in processes of arousal
and awareness. *Brain Res Brain Res Rev* 39:107–140
- Vertes RP (2006) Interactions among the medial prefrontal cortex,
hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive
processing in the rat. *Neuroscience* 142:1–20
- Vertes RP, Hoover WB, Do Valle AC, Sherman A, Rodriguez JJ
(2006) Efferent projections of reuniens and rhomboid nuclei of
the thalamus in the rat. *J Comp Neurol* 499:768–796
- Winzer-Serhan UH, Leslie FM (2005) Expression of alpha5 nicotinic
acetylcholine receptor subunit mRNA during hippocampal and
cortical development. *J Comp Neurol* 481:19–30
- Xiang Z, Huguenard JR, Prince DA (1998) Cholinergic switching
within neocortical inhibitory networks. *Science* 281:985–988
- Zhang ZW, Deschenes M (1997) Intracortical axonal projections of
lamina VI cells of the primary somatosensory cortex in the rat: a
single-cell labeling study. *J Neurosci* 17:6365–6379
- Zhang ZW, Deschenes M (1998) Projections to layer VI of the
posteromedial barrel field in the rat: a reappraisal of the role of
corticothalamic pathways. *Cereb Cortex* 8:428–436
- Zhang F, Aravanis AM, Adamantidis A, de Lecea L, Deisseroth K
(2007) Circuit-breakers: optical technologies for probing neural
signals and systems. *Nat Rev Neurosci* 8:577–581

3 | Présentation de l'article : "Cortical nicotinic synapses on excitatory and inhibitory neurons operate in a dual phasic/tonic mode."

Introduction

Deux modes de communications entre les neurones co-existent : la transmission synaptique et la transmission volumique. La transmission synaptique se déroule dans un espace confiné permettant de transmettre une information précise dans le temps de façon rapide et économe. À l'inverse la transmission volumique met en jeu des récepteurs non ségrégués dans un espace confiné et les neurotransmetteurs sont libérés dans le volume intercellulaire. Par conséquent le signal est transmis à plusieurs neurones en même temps mais avec une amplitude plus faible.

Jusqu'à récemment, l'existence d'une synapse nicotinique dans le cerveau faisait l'objet d'une controverse. La synapse nicotinique a été amplement décrite et caractérisée au niveau du ganglion de poulet ainsi qu'à la synapse entre le motoneurone et la cellule de Renshaw où des récepteurs homomériques de faible affinité et des récepteurs hétéromériques de plus haute affinité contribuent au courant synaptique (Chen et al., 2001, Lamotte d'Incamps and Ascher, 2008, Lamotte d'Incamps et al., 2012, Lamotte d'Incamps and Ascher, 2013). Dans le cerveau et plus particulièrement dans le cortex, les données de microscopie électronique montrent l'existence de différenciations synaptiques dans 20 à 70% des fibres cholinergiques chez le rongeur (Descarries et al., 1997, Turrini et al., 2001, Mechawar et al., 2002). Plus récemment, deux publications successives de l'équipe de Shaul Hestrin ont tenté de démontrer qu'il existe dans la couche I du néocortex une synapse nicotinique contenant exclusivement des récepteurs homomériques $\alpha 7$ et une transmission vo-

lumique pour l'activation des récepteurs hétéromériques de type $\alpha 4\beta 2$ (Arroyo et al., 2012, Bennett et al., 2012).

Dans cette étude, nous reprenons les résultats de S. Hestrin et y ajoutons l'étude de la transmission cholinergique au niveau de la couche VI du cortex somatosensoriel. L'ensemble de nos données en couche I et VI appuie l'hypothèse d'une synapse mixte, contenant des récepteurs $\alpha 4\beta 2$ et $\alpha 7$ mais suggère également la présence de récepteurs $\alpha 4\beta 2$ dans l'espace extra-synaptique.

Dans un premier temps, Ludovic Tricoire a vérifié par croisement de la lignée ChAT-CRE (GM60) avec une lignée rapportrice Rosa-GFP que les neurones cholinergiques des noyaux basaux expriment la CRE recombinase. Ses quantifications montrent que plus de 90% des neurones cholinergiques des noyaux basaux expriment la CRE recombinase tandis qu'ils ne sont que 50 % dans le septum médian dont les neurones projettent vers l'hippocampe. Ces résultats montrent donc que la lignée est fonctionnelle pour l'étude des projections cholinergiques dans le néocortex.

L'injection d'un AAV conditionnel contenant le gène de la ChR2 dans les noyaux basaux permet l'expression sélective de la ChR2 dans les neurones cholinergiques qui projettent vers le néocortex. Au cours de cette étude, j'ai induit des courants nicotiques par photostimulation des fibres cholinergiques dans les interneurons de la couche I et dans les pyramides de la couche VI. Dans la couche I, ce courant est biphasique avec une composante rapide soutenue par l'ouverture du récepteur homomérique $\alpha 7$ et une composante lente soutenue par le récepteur hétéromérique $\alpha 4\beta 2$. Dans la couche VI, le courant nicotinique est uniquement soutenu par l'activation du récepteur $\alpha 4\beta 2$. L'ensemble de ces courants présentent une très forte rectification entrante pour les potentiels positifs. De façon intéressante, les courants rapides $\alpha 7$ présentent une grande variabilité d'une stimulation à l'autre tandis que les courants $\alpha 4\beta 2$ sont très stables.

L'analyse par déconvolution 3D des appositions entre les varicosités cholinergiques et les dendrites des neurones enregistrés et fixés montre la présence de 2 à 12 appositions par neurone. Ces appositions sont en général relativement proches du soma surtout en couche VI et pourraient suggérer la présence de différenciations synaptiques.

L'analyse plus précise des courants nicotiques en couche VI suggère qu'ils sont médiés par une synapse. En effet, l'amplitude des courants $\alpha 4\beta 2$ n'est pas affectée par la présence d'un inhibiteur d'AChE alors que la constante de *decay* est largement augmentée. De plus, l'analyse de bruit non stationnaire suggère que les récepteurs sont saturés lors de la transmission synaptique, ce qui expliquerait la stabilité du courant $\alpha 4\beta 2$. La diminution de la probabilité de libération des vésicules synaptiques induit une diminution de l'amplitude des courants et une augmentation du taux d'échec (jusqu'à 80% d'échec), mais la forme de l'EPSC est

conservée avec des cinétiques très proches de celles observées en condition standard. Tous ces arguments sont cohérents avec l'hypothèse d'une synapse.

Néanmoins, mes résultats suggèrent également la présence de récepteurs $\alpha 4\beta 2$ extra-synaptiques puisque la photostimulation répétée des fibres cholinergiques induit un courant dont l'amplitude augmente au cours du temps. De plus, l'application de l'antagoniste de l'AChE pendant le train induit une augmentation très nette de l'amplitude du courant, suggérant également la présence de *spill-over* en cas de stimulation répétée des fibres.

En conclusion, cette étude suggère que la libération phasique d'acétylcholine induit un courant synaptique au niveau des cellules cibles tandis que la stimulation tonique des fibres autorise le *spill-over* d'acétylcholine et donc une activation volumique des récepteurs $\alpha 4\beta 2$.

Article

Title: Cortical nicotinic synapses on excitatory and inhibitory neurons operate in a dual phasic/tonic mode

Running title: Cortical nicotinic synapses

Authors: Y. Audrey Hay; Bertrand Lambolez*; Ludovic Tricoire*

* equal contributors

Affiliation:

1-Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMCR18, Neuroscience Paris Seine, F-75005, Paris, France

2- Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), UMR 8246

3- Institut national de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U1130

Corresponding author : Ludovic Tricoire (ludovic.tricoire@snv.jussieu.fr), Université Pierre et Marie Curie, UMR8246, Neuroscience Paris Seine, 9 quai St Bernard case 16, 75005 Paris France. Phone : +33 1 44 27 25 09, Fax : : +33 1 44 27 25 84

Number of pages : 32

Number of figures : 7 +1 supplementary

Number of words for Abstract: 189

Introduction: 505

Discussion: 1307

Conflict of Interest: "The authors declare no competing financial interests."

Acknowledgements

The authors thank Alain Chédotal, David DiGregorio, Thierry Gallopin, Pascal Legendre, Uwe Maskos, Stéphanie Pons, Jean Rossier, Martine Soudan and the IBPS Cell Imaging Facility for valuable help and discussion. This work was supported by Centre National de la Recherche Scientifique, Université Pierre et Marie Curie-P6 and by grants from Ecole des Neurosciences de Paris ("Network for Viral Transfer"), Fondation pour la Recherche sur le Cerveau / Rotary Club de France and Agence Nationale de la Recherche ("IHU Institut de Neurosciences Translationnelles de Paris").

ABSTRACT

It is claimed that nicotinic transmission primarily proceeds by volume transmission in the brain. We characterized nicotinic transmission onto inhibitory layer 1 (L1) and excitatory layer 6 (L6) neocortical neurons using optogenetics in acute slices. Short latency nicotinic currents mediated by receptors containing $\alpha 7$ or $\alpha 4\beta 2$ subunits were observed in all L1 and L6 neurons. L6 responses consisted in a pure, slowly decaying, $\alpha 4\beta 2$ current whereas L1 responses additionally comprised a fast $\alpha 7$ component. Synaptic transmission in both L1 and L6 was supported by close appositions between channelrhodopsin-positive cholinergic varicosities and responsive neurons. Likewise, acetylcholine esterase inhibition failed to alter onset kinetics and amplitude of L1 and L6 currents. Synaptic transmission was assessed by the quasi-saturation of $\alpha 4\beta 2$ receptors upon ACh release and by the invariance of L6 response kinetics in low release probability conditions. Train stimulation elicited tonic responses involving additional recruitment of extrasynaptic receptors by spill-over. Finally, the $\alpha 5$ subunit differentially regulated short term plasticity at L1 and L6 nicotinic synapses. Hence, cortical nicotinic synapses comprise $\alpha 7$ and/or $\alpha 4\beta 2$ receptors, and operate in a point-to-point mode at low frequency or in a tonic mode at high frequency.

Keywords: Acetylcholine; Neocortex; Nicotinic Receptors; Optogenetics; Synaptic Transmission;

INTRODUCTION

Acetylcholine (ACh) is a fast-acting, point-to-point neurotransmitter at peripheral nicotinic synapses of the neuromuscular junction and autonomic ganglia. In the central nervous system, however, anatomic-functional evidence for nicotinic synapses is scarce and it is debated whether ACh activates nicotinic receptors via fast synaptic or slow “volume” transmission (Lendvai and Vizi 2008; Sarter et al. 2009). We addressed this issue in the neocortex, where fast nicotinic transmission has been recently described using optogenetic stimulation of cholinergic fibers (Arroyo et al. 2012; Bennett et al. 2012).

Cholinergic fibers from the basal forebrain (BF) project to all layers of the neocortex and exhibit axonal varicosities that contain the ACh synthesizing enzyme (choline acetyltransferase, ChAT) and its vesicular transporter (Arvidsson et al. 1997; Mechawar et al. 2000). Some cholinergic varicosities form synaptic specialization with cortical neurons, but reported proportions of synapse-forming varicosities greatly vary in rodents whereas high proportions are consistently observed in primates (Umbriaco et al. 1994; Mrzljak et al. 1995; Smiley et al. 1997; Turrini et al. 2001). Part of this discrepancy may originate in the existence of ChAT-expressing cortical interneurons, which contribute to a significant proportion of ChAT-positive fibers in rodents (Cauli et al. 2004), but are not a source of fast nicotinic transmission (von Engelhardt et al. 2007) and are scarce or absent in primate cortices (Hedreen et al. 1983; Hendry et al. 1987; Kasashima et al. 1999).

Nicotinic receptor (nAChR) subunits assemble into ligand-gated channels of two subtypes. Homomers formed with the $\alpha 7$ subunit exhibit low affinity for ACh and rapid kinetics, whereas heteromeric “non- $\alpha 7$ ” receptors comprising α and β subunits are endowed with higher affinity and slower kinetics (Dani and Bertrand 2007; Albuquerque et al. 2009). Several cortical neuron types express somatodendritic nAChRs, which exhibit cell type- and layer-specific differences in functional properties and subunit composition (Porter et al. 1999; Christophe et al. 2002; Salas et al. 2003; Gullledge et al. 2007; Kassam et al. 2008; Bailey et al. 2010). Notably, L1 contains only GABAergic interneurons that consistently express both $\alpha 7$ and $\alpha 4\beta 2$ receptors (Christophe et al. 2002). Likewise, optogenetic stimulation of BF fibers elicits

in L1 neurons both $\alpha 7$ and $\alpha 4\beta 2$ receptor-mediated currents attributed to synaptic and volume transmission, respectively (Bennett et al. 2012). This contrasts with conclusions derived from analyses of anatomically characterized nicotinic neuronal synapses, which involve both $\alpha 7$ and non- $\alpha 7$ receptors in synaptic transmission (Zhang et al. 1996; Lamotte d'Incamps and Ascher 2008). L6 excitatory pyramidal neurons express $\alpha 4\beta 2$ receptors comprising the auxiliary $\alpha 5$ subunit, but lack somatodendritic $\alpha 7$ receptors (Salas et al. 2003; Kassam et al. 2008; Bailey et al. 2010). These neurons may thus enable testing the existence of non- $\alpha 7$ nicotinic synapses in the brain but their responses to release of endogenous ACh have not been described.

We selectively expressed channelrhodopsin in BF neurons and recorded light-evoked nicotinic currents in L1 and L6 neurons from mouse neocortical slices. Using anatomical reconstruction and functional analyses of responses to low and high frequency photostimulation, we identified the distinct modes of recruitment of synaptic and extrasynaptic nAChRs in these neurons.

MATERIALS AND METHODS

Animals, virus and surgery

All experiments were carried out in accordance with the guidelines published in the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC). Animal Protocol has been approved by the local ethic committee (Ce5/2012/062). Transgenic ChAT-Cre male mice were from the Mutant Mouse Regional Resource Center (line GM60, Tg(Chat-cre)^{60Gsat}) (Gong et al. 2007). R26RYFP line was from Jackson laboratories (line 006148). For viral injection, 21-25 days old mice were weighted and deeply anesthetized using a mix of ketamine and xylazine (100 mg and 10 mg per kg body weight respectively) administrated intraperitoneally. Mice were restrained in a stereotaxic frame (David Kopf instruments, Phymep, France) and the skull was exposed under aseptic conditions. A small burr hole was drilled at coordinates AP=0.1 mm and ML=3 mm from bregma. 1 to 2 μ l viral construct of was injected with a canula (36G70 (canula) and 26G50 (guide) from Phymep) in the right nucleus basalis at a depth of 4.55mm and with an 20° angle from medial plane. The speed of injection was 100 to 200 nl/min. After a 2 minutes long period, the canula was slowly pulled out and the skull skin was sutured. Animals were then housed in a BL-2 animal facility for at least 3 weeks with free access to food and drink. The construct AAV2/1-EF1a-DIO-hChR2(H134R)-EYFP-WPRE-HGHpA (titer: 3.10¹¹ gc/ml) was produced from Addgene plasmid #20298 at the vector core facility of Nantes University (UMR 1089 IRT1). Lentiviral construct LV-hsyn-ChR2(H134R)-YFP-WPRE (titer: 50 ng p24/ml) was produced from Addgene plasmid #20945 by the gene transfer network of Ecole des Neurosciences de Paris. Genotyping was done by PCR with the following primers: ChAT-Cre, forward, GATCGCTGCCAGGATATACG, reverse, CATCGCCATCTTCCAGCAG (573 bp); R26RYFP, forward, AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT, reverse, GGAGCGGGAGAAATGGATATG, mutant reverse, AAGACCGCGAAGAGTTTGTG (wild type: 600 bp, mutant: 320 bp); α 5 nAChR, wild-type forward, GTGAAAGAGAACGACGTCCGC, reverse, GCCTCAGCCCCTGAATGGTAG, mutant forward CTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCG, reverse, CTCGATGCGATGTTTCGCTTGGTG. (wild-type: 380 bp, mutant: 290 bp).

Slice preparation

Four to six weeks after injection, ChAT-Cre mice were deeply anesthetized. Heparin (80U) were as directly injected in the left heart to inhibit blood coagulation, then the mice was perfused transcardiacally with ice-cold sucrose ACSF containing (in mM) : sucrose, 30; glucose, 2.5; NaCl, 126; KCl, 2.5; NaHCO₃, 26; NaH₂PO₄, 1.25; MgCl₂, 3; and kynurenic acid, 3. Brains were quickly removed and 300µm-thick coronal slices were cut in sucrose ACSF using a vibratome (VT1000S; Leica). Slices were transferred in a holding chamber filled with standard ACSF bubbled with 95% O₂ and 5% CO₂. The composition of the standard ACSF was (in mM): NaCl, 126; KCl, 2.5; NaHCO₃, 26; NaH₂PO₄, 1.25; MgCl₂, 1; CaCl₂, 2; sucrose, 10; glucose, 10. Slices were allowed to recover 1 hour at 37°C then they were placed at room temperature. Drugs and chemicals were obtained from Sigma (Saint Louis, MO) except 6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX), 2-amino-5-phosphonovalerate (APV) and gabazine from Tocris Cookson (Bristol, UK).

Electrophysiology

Individual slices were transferred to a recording chamber and continuously superfused at 2 ml/min with oxygenated ACSF at room temperature. Patch pipettes (3-5 MΩ) were pulled from borosilicate glass (Harvard Apparatus LTD, Kent, UK) on a micropipette puller (Model PP-83, Narishige, Tokyo, Japan) and were filled with an intracellular solution containing (in mM): K-Gluconate, 144; CaCl₂, 0.1; MgCl₂, 2; HEPES, 10; EGTA, 0.5 and 0.3 mg/mL biocytine, pH = 7.3, 295mOsm. The I-V relationships of light-induced currents were obtained using an internal solution containing (in mM): CsGluconate, 130; HEPES, 10; EGTA, 0.2 and MgCl₂, 3, pH 7.2, 295mOsm. Cortical neurons were visualized under infrared videomicroscopy with Nomarski optics. Whole-cell patch-clamp recordings were obtained from spatially and morphologically identified layer I and VI neurons and were performed at room temperature (20-25°C) using a patch-clamp amplifier (Multiclamp 700B, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) connected to a Digidata 1440A interface board (Molecular

Devices). Signals were filtered at 1-5 kHz, digitized at 20 kHz and collected using the data-acquisition software pClamp 10.2 (Molecular Devices). Signals were analyzed off-line with Clampfit 10.2 software (Molecular Devices). Voltage values were corrected for liquid junction potential (+11 and +13 mV for the KGlucuronate and CsGlucuronate intracellular solutions, respectively). Unless stated otherwise, voltage-clamp recordings were performed at -71 mV. Light evoked currents measured in each L1 and L6 neuron were fitted with a combination of 3 and 2 decaying exponential functions, respectively, using a Levenberg-Marquardt algorithm. Paired-pulse ratios (PPRs) were calculated from peak current amplitude. Data for I-V curves were obtained by varying the membrane potential between -133 and +47 mV in steps of 10 or 20 mV. Currents were normalized with respect to the current at -73 mV. Current measurements at each potential were done in duplicate and averaged. The I-V relations were fitted by using a simplified Woodhull (1973) (Woodhull 1973) model, assuming that the inward rectification of the nicotinic currents was entirely due to blockade by internal Mg²⁺ despite the contribution of other factors (Ifune and Steinbach 1990). Normalized current values were fitted using Igor Pro according to the formula:

$$I_{norm} = -\frac{V_m - V_r}{-73 - V_r} \frac{1}{1 + \frac{[Mg^{2+}]}{K(0)} \exp\left(\frac{zF\delta V_m}{RT}\right)}$$

where V_m , V_r , z , R , T , and F refer to membrane potential, the reversal potential, the valence of Mg²⁺ (i.e. +2), the universal gas constant, the absolute temperature, and the Faraday constant, respectively. V_r was set at 0 mV as indicated by experimental data. When one assumes that Mg²⁺ cannot cross the channel, the Woodhull equations contain only two sets of adjustable variables, $K(0)$ and δ . $K(0)$ is the dissociation constant of Mg²⁺ at the binding site at 0 mV. δ represents the fraction of the electrical field seen by Mg²⁺ at its binding site. $[Mg^{2+}]$ is the internal concentration of free Mg²⁺ which is set at 3 mM by the composition of the intracellular solution.

Rectification index was determined from I-V curves using the following formula:

$$RI = [I_{27}/(27-V_r)]/[I_{-73}/(-73-V_r)]$$

where I_{27} and I_{-73} correspond to the normalized current at +27 and -73 mV. As above, V_r was set at 0 mV.

Photostimulation

Transduced cholinergic fibers were first visualized with a CoolLed excitation system (Andover, UK) and an YFP filter set (YFP-2427B-000, Semrock, Rochester, NY) using a 535nm LED mounted on the epifluorescence port of the microscope. This allowed sufficient illumination for visualizing YFP fluorescence and minimizing direct ChR2 activation. Photoactivation of ChR2 was performed through a GFP filter set (Olympus, France) using a 465nm blue LED driven directly by the data-acquisition software pClamp 10.2 (Molecular Devices) through the Digidata interface board. Blue light pulses (10 ms unless stated otherwise) were delivered through a 40x immersion objective at 40-50 s intervals to allow baseline recovery. In this configuration, the stimulated area on the slice was a disk of roughly 1 mm wide and the mean power density was 3 mW/mm².

Immunofluorescence

Four to six week-old mice were perfused transcardially using a 0.1 M PB pH7.4 solution containing 4% paraformaldehyde followed by 2h of postfixation at room temperature in the same fixative. Brains were cryoprotected using 10% sucrose/PB solution, sliced to 40 μ m thickness using a freezing microtome, and kept in PBS at 4°C for up to 3 weeks until used. Free-floating sections were blocked for 2 h at room temperature in a PBS/0.25% Triton X-100/0.2% gelatine solution (PBS-GT) supplemented with 10% normal donkey serum before being incubated overnight at 4°C with primary antibodies diluted in PBS-GT. Slices were washed with PBS-GT before being incubated for 2 h at room temperature with secondary antibodies diluted in PBS-GT. After extensive washing in PBS, slices were mounted on gelatin-coated slides in Prolong gold (Invitrogen). Antibodies were used in the following concentrations: goat anti-ChAT (1:300; Millipore), chicken anti-GFP (1:1000, Aves

labs), donkey anti-chicken alexafluor488 (1:400; Jackson immunoresearch), donkey anti-rabbit alexafluor555 (1:500; Invitrogen).

For immunohistochemistry after electrophysiological recording, slices were fixed overnight at 4°C in 4% paraformaldehyde/ 0.1 M PB pH7.4 and then rinsed in PBS. Residual aldehyde was inactivated by incubation with 50mM NH₄Cl/PBS solution for 10min at room temperature followed by several washes in PBS. Slices were blocked for 2h in PBS-GT and then incubated with anti-GFP (same dilution as above) for 2 days at 4°C. After several washes in PBS-GT, slices were incubated overnight at 4°C with goat anti-chicken alexafluor 488 (1:500, Invitrogen) and Alexafluor 555-conjugated streptavidin (1:500, Invitrogen) diluted in PBS-GT. After extensive washing in PBS, slices were mounted on gelatin-coated slides in Fluoromount-G (Southernbiotech, Birmingham, AL).

3D reconstruction and rendering

To examine the presence of appositions between ChR2-YFP+ fibers and biocytin filled-responsive cells, fluorescence images were first obtained using a confocal Laser Scanning Microscope (SP5, Leica) equipped a 40x oil immersion objective (NA 1.40) using 488 and 561 nm Ar lasers combined with a numerical zoom x1.7. Dendritic branches were systematically inspected in a radius of 200 µm around the soma. Coordinates of varicosities forming apposition with dendritic branches were recorded and Euclidean distance from the soma was calculated. Images of appositions were then acquired and processed according to Heck et al (2012) (Heck et al. 2012). Briefly, z-stacks were obtained sequentially using a confocal Laser Scanning Microscope (SP5, Leica) equipped a 63x oil immersion objective (NA 1.40) using 488 and 561 nm Ar lasers. The pixel size was set to 60 nm. The pinhole aperture set to 1 Airy Unit and z-step of 200 nm was used. Laser intensity and photomultiplier tube (PMT) gain was set so the image occupy the full dynamic range of the detector. The experimental point spread function (PSF) for deconvolution of each fluorescence images were obtained using 170 nm diameter fluorescent latex beads (PS-Speck, Life Technologies, France). Bead images were obtained using strictly the same settings and mounting

conditions as for imaging of biological samples. At least eight imaged beads were registered and averaged in order to increase the signal to noise ratio (SNR). The PSF was then determined using Huygens software 3.6 (Scientific Volume Imaging, Netherlands) and used for deconvolution using Maximum Likelihood Estimation algorithm with the same software. The deconvolution settings were used so background intensity was averaged from the voxels with lowest intensity and SNR was estimated to a value of 20. 3D rendering was performed using the 3D viewer plugin of the FIJI software (Schindelin et al. 2012).

Non-stationary noise analysis

To determine the properties of single channels involved in nAChR-mediated currents, non-stationary noise analysis was performed on fully discriminated mono-synaptic events as described (Sigworth 1980; Rigo et al. 2003). EPSCs were recorded at -81 mV using KGluconate intracellular solution. Only EPSCs occurring within 8ms after the photostimulus were considered. Between 20 and 30 individual EPSCs were selected for the non-stationary noise analysis of each neuron. EPSCs were aligned on the photostimulus and analysis was performed on the decaying phase of EPSCs. The variance over time of the decay phase was determined using the clampex software (Molecular Devices). Baseline noise variance was subtracted. A time-to-time plot of the variance at time t ($\sigma^2(t)$) as a function of the averaged current amplitude at time t ($I_{Amp}(t)$) was fitted by a parabolic curve (2 magnitude polynomial function) of the form:

$$\sigma^2(t) = -I_{Amp}^2(t)/N + i \cdot I_{Amp}(t)$$

where i is the elementary current of the receptor channel, N is the total number of channels. Then, the single channel conductance (γ) was calculated as follows:

$$\gamma = i \cdot (V_{hold} - V_r)$$

where $V_{hold} = -81$ mV. As above, V_r was set at 0 mV with the assumption that Cs^+ (used for establishing the I-V curve) and K^+ (used in noise analysis experiments) ions present in the intracellular solutions have similar permeabilities. The opening probability was calculated from

$$PO = I_{\text{mean}} / (iN)$$

Data analysis

Results are given as mean \pm standard error of mean. Between-group comparisons were performed using Mann-Whitney non parametric test. A p-value below 0.05 was considered statistically significant. For the analysis of the recovery from paired pulse depression, a 2 way ANOVA test was performed.

RESULTS

Selective photoactivation of cholinergic neurons elicits acetylcholine release

The mouse line GM60 harbors a BAC-based transgene that expresses the Cre recombinase under control of the choline acetyltransferase (ChAT, the ACh synthesizing enzyme) promoter (Gong et al. 2007). We first examined the ability of this transgene to drive Cre-dependent recombination specifically in cholinergic neurons when combined with the R26R^{YFP} reporter allele (Srinivas et al. 2001) (Supplementary Fig. 1A). In the basal forebrain (BF) and striatum, YFP immunoreactivity was observed in 89 and 92 % of ChAT⁺ neurons respectively (n = 651 and 356) and no YFP signal was detected in ChAT⁻ neurons (Supplementary Fig. 1A). The overlap between YFP and ChAT expression was smaller in medial septal nucleus (42% of ChAT⁺ neurons, n=313) and even weaker in neocortex (26 % of ChAT⁺ neurons, n= 121, Supplementary Fig. 1A), where a small proportion of YFP⁺ neurons was ChAT⁻ (30 % of YFP⁺ neurons, n= 46, data not shown).

In order to express ChR2 selectively in corticopetal cholinergic fibers, we performed unilateral stereotaxic injection of a Cre-dependent adeno-associated virus (AAV, Sohal et al, 2009) encoding a ChR2-YFP fusion protein in the BF of ChATCre mice. Preliminary experiments where injection was performed at coordinates AP: -0.22, ML: 1.12, DV: 4.80 primarily yielded YFP⁺ fibers in the amygdala and ventral cortical regions (not shown). In contrast, injection at a more dorso-caudal site (AP: 0.1, ML: 1.4, DV: 4.27) yielded YFP⁺ fibers in dorso-lateral cortical regions throughout all cortical layers. Using this latter paradigm, 90% of YFP⁺ BF neurons (n = 131) were ChAT⁺, and YFP⁺ fibers typically occupied a dorso-lateral quadrant of the neocortex with a rostro-caudal extension of ~1.5 mm throughout all cortical layers (Supplementary Fig. 1B). We found that 92% of YFP⁺ axonal varicosities in the neocortex were ChAT⁺ (n = 487; Supplementary Fig. 1B). Similar transduction efficiency was obtained for striatal cholinergic interneurons with the same AAV (not shown).

We probed the functional expression of ChR2 using patch-clamp recordings of YFP+ BF neurons (n = 5) in acute brain slices. Whole field illumination through a 40x objective with a 5 s light pulse at 10-50 % of maximal light power (see methods) gave rise to a large inward peak current followed by a smaller steady state current (Supplementary Fig. 1C). Trains of 1 ms light pulses (2 Hz for 10 s) reliably induced 2 Hz firing of the recorded cells (Supplementary Fig. 1C). These results are consistent with desensitization properties of ChR2 currents (Mattis et al. 2011) and the ability of ChR2 to drive action potential firing in cholinergic neurons (Kalmbach et al. 2012). To probe the functional release of ACh, we first examined the effects of ChR2 activation on YFP-negative non cholinergic medium spiny neurons of striatal slices after transduction of local cholinergic neurons (n = 5, Supplementary Fig. 1D). Morphological examination of 2 of these neurons following biocytin histochemistry confirmed their identity (not shown). Light pulses (10 ms) elicited transient inward currents of mean amplitude 31.7 ± 5.6 pA (n = 5 neurons), which persisted in the presence of glutamatergic and GABAergic antagonists (CNQX, 10 μ M; APV, 50 μ M; gabazine, 10 μ M, Supplementary Fig. 1D). Light-induced currents were almost abolished by the additional application of the nicotinic receptor antagonist dihydro- β -erythroidine (DH β E, 2 μ M), suggesting they were due to activation of nicotinic receptors upon release of acetylcholine by striatal cholinergic interneurons, as previously observed (English et al. 2012). These results indicate that the present strategy enables reliable and selective photoactivation of cholinergic neurons and can be used to examine the effect of endogenous ACh release on cholinergic neurons.

Cortical nicotinic transmission is fast and cell type-specific

We next examined the effect of ACh released by photoactivation of ChR2+ cholinergic fibers on GABAergic layer I (L1) and excitatory layer VI (L6) cortical neurons from neocortical slices. L1 neurons exhibited short duration action potentials (range: 0.48-1.4 ms, n = 32) and smooth or sparsely spiny dendrites (n = 18 neurons processed for biocytin histochemistry, Fig. 1A), as described (Zhou and Hablitz 1996). In L6, recordings focused on excitatory pyramidal neurons, which characteristically exhibited regular spiking properties and spiny

dendrites (n = 21 neurons processed for biocytin histochemistry, Fig. 1C)(Connors and Gutnick 1990, Peters and Jones 1984). Single light pulses (duration: 1-50 ms) evoked fast inward currents in both L1 and L6 neurons (Fig. 1B). Unless otherwise stated, photostimuli were applied with an interval of 50 s, which yielded stable response amplitude whereas a decrease of the response was observed with shorter intervals (20 s and 40 s, n = 7 and 6 neurons, respectively; see also Fig. 7). Light-evoked currents persisted in the presence of glutamatergic and GABAergic antagonists (CNQX, 10 μ M; APV, 50 μ M; gabazine, 10 μ M) without notable change in amplitude and kinetics (n = 5 L1 and 5 L6 neurons, not shown), consistent with their cholinergic nature. All subsequent experiments were carried out in the continuous presence of glutamatergic and GABAergic antagonists.

Responses of L1 neurons exhibited a fast onset ($\tau_{ON} = 5.3 \pm 0.6$ ms, n = 30) and a biphasic decay. The relative amplitude of the two components recorded in L1 was variable between neurons, consistent with recent reports (Arroyo et al. 2012; Bennett et al. 2012). Indeed, among 57 L1 neurons recorded, 17 lacked a detectable slower component and in 11 other neurons the faster component was only noticeable from the abrupt onset of the response. In a subset of 29 neurons, the two components were clearly distinguishable and each could be fitted with a single exponential decay ($\tau_{OFF,FAST} = 6.5 \pm 0.6$ ms, $\tau_{OFF,SLOW} = 296.8 \pm 29.6$ ms, Fig. 1B). The mean amplitude of the fast component (72.6 ± 12.0 pA) was larger than that of the slower component (13.8 ± 2.1 pA), whereas the charge carried by the slower component (5140 ± 1203 pC) was about 6 fold that associated with the fast component (900 ± 185 pC), as reported (Arroyo et al. 2012). In contrast with L1 neurons, light-evoked inward currents in L6 neurons were monophasic with kinetics similar to those of the slower component recorded in L1 neurons ($\tau_{ON} = 32.9 \pm 3.0$ ms, $\tau_{OFF} = 289.6 \pm 17.9$ ms, n = 46 neurons, Fig. 1D). The mean amplitude and charge transfer of the responses (19.04 ± 2.0 pA and 5210 ± 765 pC, n = 25 neurons) were close to those of the slower component in L1.

We next characterized receptors responsible for the differences in L1 and L6 nicotinic currents. Bath application of atropine, a muscarinic antagonist (10 μ M), had no significant effect on the amplitude of the slow and fast components (n= 8 L1, $110 \pm 5\%$ and $86 \pm 8\%$ of control respectively p>0.1; n=8 L6 neurons, $110 \pm 11\%$ of control p>0.1), ruling out the

involvement of muscarinic receptors. In L1 neurons (n=8), the fast component was abolished by the $\alpha 7$ nAChR antagonist methyllycaconitine (MLA, 100 nM) but was unaffected by the non- $\alpha 7$ antagonist DH β E (2 μ M, Fig. 2A). Conversely, the slower component was blocked by DH β E and unaffected by MLA. Light induced currents in L6 neurons (n = 6) were blocked by DH β E but were not significantly altered by MLA (n = 6, $p > 0.5$, Fig. 2C). These results indicate that homomeric nAChR containing $\alpha 7$ subunits mediate the fast component in L1 interneurons and that heteromeric nAChRs comprising α and β subunits underlie the slower component observed in L1 and L6 neurons. Based on expression studies in these cell types (Christophe et al. 2002; Salas et al. 2003), these heteromeric nAChRs most likely comprise $\alpha 4$ and $\beta 2$ subunits, and will be denoted $\alpha 4\beta 2$ in the rest of the manuscript. The I-V curve of the $\alpha 7$ component in L1 neurons was roughly linear at negative potentials, reversed at 0 mV and exhibited a strong inward rectification at positive potentials with a rectification index (RI) = 0.03 ± 0.01 (n = 9, Fig. 2B). Similar I-V relationships were obtained for $\alpha 4\beta 2$ currents recorded in L1 and L6 neurons (RI= 0.05 ± 0.05 and 0.07 ± 0.06 respectively, n = 9 and 9, respectively; Fig. 2D). The I-V curves could be fitted with a Woodhull equation and gave similar values for $K(0)$ and δ (see methods): 0.78 mM and 0.92 for the $\alpha 7$ component and 0.32 mM and 1 for the $\alpha 4\beta 2$ in L1 neurons, and 1.37 mM and 1 for the $\alpha 4\beta 2$ in L6 neurons. It should be noted that in these experiments spermine had not been added to the internal solution, and therefore the main intracellular blocker was likely to be Mg^{2+} (Ifune and Steinbach 1990). These data are consistent with those obtained on agonist-evoked currents (Couturier et al. 1990; Bertrand et al. 1993; Buisson et al. 1996; McQuiston and Madison 1999; Christophe *et al.* 2002) or at other nicotinic synapses (Zhang *et al.* 1996; Lamotte d'Incamps and Ascher 2008). Hence, fast nicotinic transmission is widespread in cortical L1 and L6 and its cell-type specificity is determined by differential expression of receptor subtypes.

Close apposition of ChR2+ cholinergic varicosities onto responsive neurons

The short latencies to onset of $\alpha 7$ (3.3 ± 0.2 ms, n = 30 L1 neurons) and $\alpha 4\beta 2$ currents (6.7 ± 0.5 ms, n = 36 L6 neurons) we measured at 25°C, and the low variability of these latencies

suggest that $\alpha 7$ and $\alpha 4\beta 2$ currents both occurred at synaptic contacts. Indeed, studies of glutamatergic synapses using optogenetic stimulation of cortical fibers at 37°C reported onset latencies of synaptic currents in the 6-7 ms range (Petreanu et al. 2007; Cruikshank et al. 2010). This prompted us to search for close appositions between YFP-labeled cholinergic fibers and biocytin-filled recorded neurons using confocal microscopy. Among 6 L1 neurons considered for this analysis, 3 exhibited both $\alpha 7$ and $\alpha 4\beta 2$ light-evoked currents (range of $\alpha 7$ amplitude: 19-72 pA, range of $\alpha 4\beta 2$ amplitude: 8-12 pA) and 3 exhibited only $\alpha 7$ -mediated currents (range of amplitude: 25-60 pA). In each of these neurons, it was possible to highlight 6 ± 1 close appositions of YFP+ varicosities onto dendrites of responsive neurons (Fig. 3A-B), suggestive of synaptic contacts. This was supported by the close vicinity between biocytin and YFP signals on single confocal planes. Contacts were confirmed by inspection from different angle of view following 3D deconvolution and reconstruction of the surrounding volume (n=4 contacts, 2 neurons; see methods and Fig. 3C-E). Similarly, we found 5 ± 1 close appositions between YFP+ varicosities and responsive biocytin-filled L6 neurons (n=9). Four of these contacts were confirmed using 3D reconstruction as above (n=2 neurons, Fig. 3F-J). These putative synaptic contacts were differentially distributed, with contacts on L6 neurons being in average closer to the soma ($27.8 \pm 3.4\mu\text{m}$) than those found on L1 interneurons ($42.8 \pm 5.2 \mu\text{m}$, $p < 0.05$). It is noteworthy that these YFP+ contacts represent only the ChR2-expressing fraction of all cholinergic varicosities making close apposition onto cortical neurons. These results indicate that nicotinic transmission from BF fibers onto L1 and L6 neurons occurs at synaptic sites.

Onset kinetics and amplitude of nicotinic currents are not affected by acetylcholinesterase inhibition

The existence of nicotinic synapses implies that onset kinetics and amplitude of postsynaptic currents minimally depend on the efficiency of ACh clearance, due to the clustering of receptors close to the release site. Conversely, inhibition of acetylcholinesterase (AChE), the

enzyme responsible for the degradation of extracellular ACh, has been shown to slow down the decay of currents at several nicotinic synapses (Fatt and Katz 1951; Zhang *et al.* 1996; Lamotte d'Incamps *et al.* 2012). We thus examined the effects of AChE inhibition on nicotinic currents evoked by single light pulses in L1 (n=8) and L6 (n=6) neurons. Application of the AChE inhibitor neostigmine (2 μ M) increased fluctuation of baseline current (L1: σ^2 CONTROL = 3.5 ± 0.3 pA² vs σ^2 NEO = 8.9 ± 2.6 pA²; L6: σ^2 CONTROL = 5.4 ± 1.4 pA² vs σ^2 NEO = 11.0 ± 3.1 pA²), suggestive of low levels of extracellular ACh in resting conditions as found at other nicotinic synapses (Katz and Miledi 1970; Lamotte d'Incamps *et al.* 2012). Neostigmine did not alter the onset kinetics of currents recorded in L1 neurons (τ_{ON} CONTROL = 5.7 ± 1.8 ms vs τ_{ON} NEO = 5.8 ± 1.8 ms, p=0.8; onset latency: control, 2.9 ± 0.3 ms, NEO, 3.0 ± 0.4 ms, p=0.4) and L6 neurons (τ_{ON} CONTROL = 36 ± 10 ms vs τ_{ON} NEO = 36 ± 14 ms, p=1; onset latency: control, 5.9 ± 0.7 ms, NEO, 6.8 ± 0.8 ms, p=0.3; Fig. 4). Neostigmine also failed to increase the amplitude of the $\alpha 7$ current in L1 neurons (64.4 ± 26.4 pA in control vs 58.2 ± 24.3 pA in neostigmine, p=0.4) or that of $\alpha 4\beta 2$ currents in L1 and L6 neurons (L1: 13.1 ± 3.8 pA vs 14.1 ± 6.0 pA, p=0.9; L6: 44.2 ± 10.5 pA vs 42.8 ± 12.0 pA, p=0.3). This indicates that ACh released upon single stimuli activates the same pool of receptors regardless of ACh diffusion around the release site, as one would expect from the existence of postsynaptic clusters of $\alpha 7$ and/or $\alpha 4\beta 2$ nAChRs in L1 and L6 neurons.

The decay kinetics of the $\alpha 4\beta 2$ current were markedly slowed down by neostigmine in both L1 and L6 neurons, attesting to the effectiveness of AChE inhibition (L1: τ_{OFF} CONTROL = 365 ± 66 ms vs τ_{OFF} NEO = 6260 ± 641 ms, p<0.05; L6: τ_{OFF} CONTROL = 387 ± 64 ms vs τ_{OFF} NEO = 4362 ± 781 ms, p<0.05), whereas those of the $\alpha 7$ current were not significantly altered (τ_{OFF} CONTROL = 7.5 ± 1.5 ms vs τ_{OFF} NEO = 5.9 ± 1.4 ms, p=0.6, Fig. 4). The differential sensitivity of $\alpha 7$ and $\alpha 4\beta 2$ currents to AChE inhibition is consistent with previous observations on L1 neurons (Bennett *et al.* 2012) and can be explained on the basis of the low affinity/fast desensitization of $\alpha 7$ receptors and the high affinity/slow desensitization of $\alpha 4\beta 2$ receptors (Dani and Bertrand 2007; Albuquerque *et al.* 2009). Similar observations were made at other neuronal nicotinic synapses where both low affinity/fast desensitizing

and high affinity/slow desensitizing receptors coexist postsynaptically (Zhang *et al.* 1996; Ullian *et al.* 1997) (Lamotte d'Incamps and Ascher 2008).

Near saturation of $\alpha 4\beta 2$ receptors during nicotinic transmission onto L6 neurons

We noticed that $\alpha 4\beta 2$ currents exhibit much lower trial-to-trial variability than $\alpha 7$ currents (not shown), as reported previously (Bennett *et al.* 2012). Bennett *et al.* (2012) postulate that this low variability results from non-synaptic activation of $\alpha 4\beta 2$ receptors by volume transmission from multiple ACh release sites. Another possible explanation is the near saturation of postsynaptic $\alpha 4\beta 2$ receptors clusters by ACh released from presynaptic terminals. We addressed this issue by determining the unitary properties of nAChR channels underlying L6 postsynaptic currents ($n = 13$ neurons), which involve only $\alpha 4\beta 2$ receptors and exhibit monoexponential decay. This was performed using non-stationary noise analysis that infers properties of the single channels underlying a given current, from the fluctuations about the mean amplitude of that current (Sigworth 1980). In the L6 pyramidal cell shown in figure 5A-B, nicotinic current amplitudes ranged between 16 pA and 22 pA (mean amplitude = 18.8 pA). The mean variance of the baseline noise (2.38 pA^2) was subtracted from the variance of the currents. The plot of the variance versus the mean amplitude was fitted with a parabolic equation, from which we calculated values of nAChR single channel conductance, number of channels and their maximal probability of opening (Fig. 5B). Mean value of nAChR single channel conductance was $13.9 \pm 1.1 \text{ pS}$, consistent with values obtained on recombinant $\alpha 4\beta 2$ receptors (Li and Steinbach 2010). The mean number of channels underlying L6 currents was 42 ± 8 and the maximal probability of opening of these channels was 0.94 ± 0.02 . We observed a linear correlation between the number of channels and current amplitudes indicating that the maximal opening probability of nAChR channels was constant over a large range of current amplitudes (Fig. 5C). The high maximal probability of opening of $\alpha 4\beta 2$ channels (0.94 ± 0.02) indicates quasi-saturation of these receptors upon ACh release in L6. These results are in favour of synaptic transmission since receptor saturation is difficult to reconcile with volume transmission.

Since synaptic transmission relies on both presynaptic probability of release and postsynaptic probability of occupation, saturation of nAChRs also implies very high probability of ACh release. We thus examined the effect of decreasing release probability on the properties of nicotinic currents in L6 pyramidal cells (n=7). This was achieved by lowering Ca²⁺ from 2 to 1 mM and increasing Mg²⁺ from 1 to 3 mM in the perfusion solution. In these conditions, the failure rate of evoked nicotinic currents increased from 0 % to 79.4 ± 2.6 %, consistent with a decrease of ACh release probability (Fig. 5D-E). The mean amplitude of nicotinic currents (excluding failures) decreased from 8.9 ± 1.6 pA in control conditions to 2.5 ± 0.2 pA in low Ca²⁺/high Mg²⁺ solution, indicating that nicotinic currents in control conditions involved multiquantal ACh release. Importantly, neither onset nor decay kinetics were significantly altered in low Ca²⁺/high Mg²⁺ conditions ($\tau_{ON}^{CONTROL} = 26.5 \pm 3.1$ ms vs $\tau_{ON}^{LowCa/HighMg} = 26.8 \pm 3.1$ ms, p>0.5; $\tau_{OFF}^{CONTROL} = 205 \pm 17$ ms vs $\tau_{OFF}^{LowCa/HighMg} = 183 \pm 23$ ms, p=0.2, Fig. 5E). These results indicate that recruitment of nAChRs in low release probability conditions proceeds similarly as in high release probability conditions, consistent with the existence of nicotinic synapses in L6 neurons involving $\alpha 4\beta 2$ receptors.

Recruitment of extrasynaptic nicotinic receptors depends on transmission frequency

We next examined whether large amounts of ACh released upon repetitive stimulation can recruit additional, i.e. extrasynaptic, receptors. In awake animals, BF cholinergic neurons undergo episodes of 10-20 Hz firing, which may underlie large cortical ACh transients observed during attention tasks (Lee et al. 2005; Parikh et al. 2007). We thus tested the effect of trains of light pulses (10 Hz for 5 s) on L1 (n=13) and L6 (n=6) neurons in the continuous presence of atropine (10 μ M). Fast currents mediated by low affinity $\alpha 7$ nAChRs in L1 neurons were observed in response to individual light pulses throughout the train. Their amplitude rapidly decreased at the beginning of the train (Fig. 6A), consistent with the short term plasticity at this synapse (see below and Fig. 7). Afterwards, their amplitude remained

roughly stable, indicating that phasic ACh release persisted along the train. These observations are in agreement with previous reports of repetitive $\alpha 7$ -mediated currents recorded in hippocampal neurons and ciliary ganglion neurons upon trains of electrical stimulation of cholinergic fibers at similar or higher frequency (Buhler and Dunwiddie 2001; Stanchev and Sargent 2011). Additional fast currents were also observed during interpulse intervals, presumably due to asynchronous ACh release during high frequency presynaptic stimulation. No conspicuous change in $\alpha 7$ current kinetics was observed along the train, as exemplified in Figure 6A for an L1 neuron among 4, in which $\alpha 4\beta 2$ currents were undetectable. Subsequent analyses of responses to train stimulation focus on $\alpha 4\beta 2$ currents. In L1 neurons exhibiting $\alpha 4\beta 2$ currents (n=9) and in L6 neurons, the maximal current (A_{max}) reached during the train was larger than the current elicited by the first pulse (A_1 ; L1: $A_{max}/A_1 = 1.7 \pm 0.2$, $p < 0.05$; L6: $A_{max}/A_1 = 1.7 \pm 0.2$, $p < 0.05$, Fig. 6B-C). Hence, more receptors are recruited by trains than by single stimuli, suggesting that large amounts of released ACh are able to activate $\alpha 4\beta 2$ extrasynaptic receptors in both L1 and L6 neurons. Indeed, decay kinetics of responses of L1 neurons to trains of stimuli ($\tau_{OFF}^{TRAIN} = 608.6 \pm 109.7$ ms) were slower than those measured upon single stimuli (see above $\tau_{OFF}^{SINGLE} = 296.8 \pm 29.6$ ms, $p < 0.05$). In contrast, only a modest change of decay kinetics was observed in L6 neurons ($\tau_{OFF}^{TRAIN} = 342.7 \pm 47.2$ ms vs $\tau_{OFF}^{SINGLE} = 257.3 \pm 21.6$ ms, $p = 0.13$). We next tested the effect of the AChE inhibitor neostigmine (2 μ M) on the response to repetitive photostimulation. Neostigmine did not increase responses to the first pulse (L1: $A_1^{NEO}/A_1^{CONTROL} = 1.2 \pm 0.2$, $p = 0.3$; L6: $A_1^{NEO}/A_1^{CONTROL} = 0.9 \pm 0.1$, $p = 0.3$, Fig. 6B-C), as observed for responses to single stimuli. In contrast, the maximal current amplitude was strongly increased by neostigmine in both L1 and L6 neurons ($A_{max}^{NEO}/A_{max}^{CONTROL} = 3.1 \pm 0.7$, $p < 0.05$, and 1.8 ± 0.2 , $p < 0.05$, respectively), in agreement with the recruitment of a larger pool of extrasynaptic nAChRs due to reduced ACh clearance. Decay kinetics dramatically slowed down in both L1 and L6 neurons as compared to control conditions (L1: 13.3 ± 1.9 s, $p < 0.05$; L6: 18.7 ± 4.7 s, $p < 0.05$), consistent with the effect of neostigmine observed on responses to single photostimuli.

The $\alpha 5$ nAChR subunit selectively regulates short term plasticity of L6 nicotinic synapses

It is known that nicotinic transmission onto L1 neurons exhibits short-term depression (Bennett et al. 2012). We found that interstimulus intervals (ISI) shorter than 50 s resulted in a reduction of current amplitude in L1, but also in L6 neurons (see above). We thus compared short-term plasticity of nicotinic synapses onto L1 and L6 neurons in the presence of atropine (10 μ M). A two-pulse protocol (1 ms pulse, 0.5 s ISI), which reliably induces 2 Hz firing of cholinergic neurons (see Supplementary Fig. 1), resulted in a reduction of the second response amplitude with a similar paired-pulse ratio in L1 and L6 neurons (PPR2/1 = 0.47 ± 0.05 and 0.47 ± 0.03 , n=3 and 5, respectively; Fig. 7A). These values are in agreement with the paired-pulse depression of nicotinic currents observed in the thalamus following electrical stimulation of cholinergic fibers (Sun et al. 2013). Increasing light pulse duration (up to 50 ms) in the same neurons did not significantly change the PPR2/1 (0.48 ± 0.11 and 0.51 ± 0.04 in L1 and L6, respectively; $p > 0.05$), indicating that short-term depression was not influenced by ChR2 desensitization. The PPR2/1 (10 ms pulse, 0.5 s ISI) was similar for $\alpha 7$ and $\alpha 4\beta 2$ currents in L1 and L6 neurons (L1: 0.52 ± 0.08 [$\alpha 7$] and 0.45 ± 0.06 [$\alpha 4\beta 2$], n=5 neurons, $p > 0.05$; L6: 0.50 ± 0.03 , n=10 neurons, $p > 0.05$ for comparison with L1 values). We next investigated the recovery from short term depression of nicotinic currents in L1 and L6 neurons (n=5 and 10, respectively) using a series of 7 light pulses applied with increasing ISI (from 1 s to 60 s). L1 and L6 currents similarly depressed between the first and second stimuli (ISI = 1 s, $0.45 \leq \text{PPR2/1} \leq 0.5$ for $\alpha 7$ and $\alpha 4\beta 2$ currents in L1 and L6 neurons, $p > 0.05$). In L1 neurons, the recovery of $\alpha 7$ and $\alpha 4\beta 2$ currents followed a similar time course ($p = 0.6$) and was complete for ISI = 60 s (PPR7/1 = 0.98 ± 0.09 and 1.00 ± 0.03 , respectively). In contrast, the recovery of $\alpha 4\beta 2$ currents in L6 neurons was slower than in L1 neurons ($p < 0.05$, Fig 7B-C) and only reached PPR7/1 = 0.87 ± 0.05 for ISI = 60 s.

The auxiliary $\alpha 5$ nAChR subunit is co-expressed with $\alpha 4$ and $\beta 2$ subunits in L6 neurons, but not in L1 neurons (Christophe et al. 2002; Salas et al. 2003; Bailey et al. 2010). The $\alpha 5$ subunit assembles with $\alpha 4$ and $\beta 2$ subunits and modulates desensitization of heteromeric

nAChRs (Ramirez-Latorre et al. 1996; Gerzanich et al. 1998; Kuryatov et al. 2008). To test the contribution of the $\alpha 5$ subunit to the recovery from short term depression of nicotinic currents in L6 neurons, we expressed ChR2-YFP into the BF of $\alpha 5$ -null mice (Salas et al. 2003), see Methods) and recorded light-evoked nicotinic currents in the presence of glutamatergic, GABAergic and muscarinic antagonists as described above. The amplitude of $\alpha 7$ currents in L1 neurons and of $\alpha 4\beta 2$ currents in L6 neurons of $\alpha 5^{-/-}$ mice (63 ± 33 pA, $n=3$, and 23 ± 3 pA, $n=24$, respectively) were comparable to those measured above in $\alpha 5^{+/+}$ animals. Furthermore, when examining the recovery profile of L6 nicotinic currents using the same stimulation paradigm as above, we found that short-term depression in $\alpha 5^{-/-}$ mice (for ISI= 1s, PPR_{2/1} = 0.48 ± 0.04 , $n=10$) was similar to that observed in $\alpha 5^{+/+}$ animals ($p>0.95$, Fig. 7). Nonetheless, L6 nicotinic currents recovered faster ($p<0.05$) and more completely (PPR_{7/1} = 0.98 ± 0.04 for ISI = 60 s) in $\alpha 5^{-/-}$ than in $\alpha 5^{+/+}$ mice (Fig. 7B-C). These results indicate that the $\alpha 5$ subunit participates in heteromeric receptors that mediate nicotinic transmission onto L6 neurons and is responsible for the slow recovery from short term depression observed at this synapse.

DISCUSSION

We characterized fast nicotinic transmission elicited by optogenetic release of ACh from BF fibers onto inhibitory L1 and excitatory L6 cortical neurons. Our results indicate that low frequency stimulation results in point-to-point nicotinic transmission occurring synaptically in a cell- and receptor type-dependent manner. Conversely, high frequency stimulation results in a switch to tonic responses and in the recruitment of extrasynaptic receptors by spill-over.

Fast nicotinic transmission is widespread

We selectively expressed ChR2 in cholinergic neurons using the GM60 Cre mouse line, which proved as efficient for optogenetic release of ACh in the neocortex as the GM24 line (Arroyo et al. 2012; Bennett et al. 2012). Results obtained with the GFP reporter mouse line show that the GM60 line targets more efficiently and selectively cholinergic neurons in corticopetal BF nuclei and striatum than in hippocampopetal medial septal nucleus and neocortex. The BAC used to generate the GM60 Cre line contains the first intron of the ChAT gene, thus also the vesicular ACh transporter gene (Bejanin et al. 1994; Roghani et al. 1994; Gong *et al.* 2007). Nonetheless, currents we measured in non-cre mice with same genetic background ($\alpha 5^{-/-}$ line) provided no evidence for enhanced nicotinic transmission in the GM60 line, in contrast with the hypercholinergic phenotype reported for another BAC-based ChAT-ChR2-YFP transgenic mouse line (Kolisnyk et al. 2013). Light induced currents we recorded in cortical neurons were essentially nicotinic without noticeable contribution of a glutamatergic component, consistent with the segregation of BF neurons into cholinergic, glutamatergic and GABAergic types (Gritti et al. 1997). In contrast, ACh-glutamate co-transmission occurs onto Renshaw and interpeduncular nucleus neurons, whose input cholinergic neurons express vesicular glutamate transporters (Herzog et al. 2004; Lamotte d'Incamps and Ascher 2008; Ren et al. 2011).

Fast nicotinic transmission from BF fibers appears to match somatodendritic expression of nAChRs in the neocortex. Indeed, it is established that virtually all L1 interneurons and L6 pyramidal cells are responsive to nicotinic agonists (Christophe et al. 2002; Kassam et al. 2008). Furthermore, optogenetic stimulation of BF fibers also elicits fast nicotinic currents in nicotinoceptive interneuron types from other layers, but not in L2/3 pyramidal cells or fast

spiking interneurons that are insensitive to nicotinic agonists (Porter *et al.* 1999; Gullledge *et al.* 2007; Arroyo *et al.* 2012). Hence, this and other recent studies (Arroyo *et al.* 2012; Bennett *et al.* 2012) indicate that BF cholinergic projections widely mediate fast nicotinic transmission onto nicotinoceptive excitatory and inhibitory neuron types in the neocortex. Present and earlier evidence for fast nicotinic transmission also in the striatum (English *et al.* 2012), the thalamus (Sun *et al.* 2013), the hippocampus (Grybko *et al.* 2011; Leao *et al.* 2012) suggest that its occurrence in the brain has been largely underestimated.

Fast nicotinic transmission is synaptic

We provide evidence that fast nicotinic transmission in the neocortex occurs at cholinergic synapses whose existence has been assessed using ultrastructural approaches (Umbriaco *et al.* 1994; Turrini *et al.* 2001). Indeed, latencies-to-onset of nicotinic currents in L1 and L6 neurons were in the range of those measured at glutamatergic synapses (Petreanu *et al.* 2007; Cruikshank *et al.* 2010), and we observed close appositions between each responsive neuron and ChR2+ BF varicosities. Furthermore, onset latencies and kinetics of nicotinic currents and their amplitudes were insensitive to AChE inhibition. This implies that released ACh reaches nAChRs before significant degradation by endogenous AChE, in agreement with the existence of postsynaptic clusters of nAChRs close to ACh release sites. Finally, the involvement of $\alpha 4\beta 2$ receptors in synaptic transmission was assessed by the quasi-saturation of these receptors upon ACh release and by the invariance of L6 response kinetics in low release probability conditions.

Our results are consistent with a model of cortical nicotinic synapse comprising low affinity/fast desensitizing ($\alpha 7$) and high affinity/slow desensitizing ($\alpha 4\beta 2$) receptors, similar to those of the ciliary ganglion and the Renshaw cell (Zhang *et al.* 1996; Ullian *et al.* 1997; Lamotte d'Incamps and Ascher 2008), and bearing resemblance to the glutamatergic synapse with low affinity/fast desensitizing AMPA and high affinity/slow desensitizing NMDA receptors. Several differences between $\alpha 7$ and $\alpha 4\beta 2$ current properties likely result from the different receptor affinities (i.e. ACh binding and unbinding rates) or desensitization kinetics (Dani and Bertrand 2007). Indeed, the fast decay of the $\alpha 7$ current is readily explained by the fast desensitization and/or ACh unbinding rates of the receptor. Conversely, as shown at the

neuromuscular junction (Anderson and Stevens 1973), slow ACh unbinding is presumably responsible for the slow decay of $\alpha 4\beta 2$ currents rather than desensitization, since these currents are further prolonged upon AChE inhibition. Bennett et al (2012) reported a high trial-to-trial variability of $\alpha 7$ currents that we also observed (not shown), whereas $\alpha 4\beta 2$ currents exhibited low trial-to-trial variability. The low trial-to-trial variability of $\alpha 4\beta 2$ currents implies saturation of the receptors, consistent with their high affinity and as deduced from noise analysis. It also implies a high ACh release probability, which is likely due to the use of ChR2 that dramatically enhances release probability at glutamatergic synapses as compared to electrical stimulation (Schoenenberger et al. 2011). This suggests in turn that the large trial-to-trial variability of $\alpha 7$ currents may be attributable to partial occupation of $\alpha 7$ receptors due to their lower affinity.

The different latencies and onset kinetics of $\alpha 7$ and $\alpha 4\beta 2$ currents may also be explained by biophysical properties of these receptors. Indeed, similar differences between AMPA and NMDA currents arise from the delay between glutamate binding and channel opening of NMDA receptors at the glutamatergic synapse (Hestrin et al. 1990; Dzubay and Jahr 1996). At odds with glutamatergic synapses, however, is the absence of voltage-dependent block of nAChRs at negative potentials such as that of NMDA receptors (Nowak et al. 1984). This allows nicotinic synapses equipped with mixed $\alpha 7$ and $\alpha 4\beta 2$, or pure receptor populations to operate at resting membrane potentials, as observed in the present study. The existence of pure $\alpha 7$ and $\alpha 4\beta 2$ synapses, despite functional expression of both receptor types in virtually all L1 neurons (Christophe et al. 2002), suggests that clustering of postsynaptic nAChRs is regulated. Our results further indicate that the auxiliary $\alpha 5$ subunit participates in postsynaptic $\alpha 4\beta 2$ heteromers and modulates recovery from short term depression at L6 nicotinic synapses. Hence, combinatorial expression of nAChR subunits endows cortical nicotinic synapses with diverse cell-type-specific properties.

Train stimulation recruits extrasynaptic receptors and elicits tonic responses

Train stimulation resulted in a tonic current that slowly developed during the train in L1 and L6 neurons. The tonic current involved extrasynaptic $\alpha 4\beta 2$ receptors since its amplitude was larger than that of $\alpha 4\beta 2$ synaptic current elicited by the first pulse and since decay kinetics of

the tonic current were slower than those measured upon single stimuli, as expected from slower neurotransmitter diffusion in the extrasynaptic space than in the synaptic cleft (Nicholson and Phillips 1981). Decay kinetics of responses to train stimulation was faster in L6 than in L1 neurons. This difference was abolished upon AChE inhibition, suggesting that AChE activity is higher L6 than in L1. AChE inhibition resulted in recruitment of a larger pool of extrasynaptic $\alpha 4\beta 2$ receptors and drastically slowed down onset and decay kinetics. This suggests that activation of extrasynaptic $\alpha 4\beta 2$ receptors in control conditions proceeds from diffusion of ACh at short-distance from the synapse, presumably by spillover from the synaptic cleft, whereas AChE inhibition unveils ACh release from varicosities distant from the postsynaptic neuron.

Our results indicate that both point-to-point and tonic nicotinic transmission occur in the neocortex depending on the regime of BF neurons. Indeed, temporal summation of $\alpha 4\beta 2$ currents presumably occurs in L1 and L6 when BF fibers discharge exceeds 1 Hz. Hence, pure nicotinic transmission that prevails in the neocortex presumably undergoes a switch from point-to-point to tonic mode accompanied with loss of temporal fidelity at moderate discharge frequency of BF neurons. In contrast, ACh-glutamate co-transmission occurring at other synapses (Lamotte d'Incamps and Ascher 2008; Ren et al. 2011) may allow the co-existence of time-locked point-to-point and tonic transmission over a larger range of frequency. Hence, the operating mode of nicotinic transmission is likely to depend critically on the brain region and behavioral state.

REFERENCES:

- Albuquerque EX, Pereira EF, Alkondon M, Rogers SW. 2009. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 89:73-120.
- Anderson CR, Stevens CF. 1973. Voltage clamp analysis of acetylcholine produced end-plate current fluctuations at frog neuromuscular junction. *J Physiol* 235:655-691.
- Arroyo S, Bennett C, Aziz D, Brown SP, Hestrin S. 2012. Prolonged disynaptic inhibition in the cortex mediated by slow, non-alpha7 nicotinic excitation of a specific subset of cortical interneurons. *J Neurosci* 32:3859-3864.
- Arvidsson U, Riedl M, Elde R, Meister B. 1997. Vesicular acetylcholine transporter (VACHT) protein: a novel and unique marker for cholinergic neurons in the central and peripheral nervous systems. *J Comp Neurol* 378:454-467.
- Bailey CD, De Biasi M, Fletcher PJ, Lambe EK. 2010. The nicotinic acetylcholine receptor alpha5 subunit plays a key role in attention circuitry and accuracy. *J Neurosci* 30:9241-9252.
- Bejanin S, Cervini R, Mallet J, Berrard S. 1994. A unique gene organization for two cholinergic markers, choline acetyltransferase and a putative vesicular transporter of acetylcholine. *J Biol Chem* 269:21944-21947.
- Bennett C, Arroyo S, Berns D, Hestrin S. 2012. Mechanisms generating dual-component nicotinic EPSCs in cortical interneurons. *J Neurosci* 32:17287-17296.
- Bertrand D, Galzi JL, Devillers-Thiery A, Bertrand S, Changeux JP. 1993. Mutations at two distinct sites within the channel domain M2 alter calcium permeability of neuronal alpha 7 nicotinic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:6971-6975.
- Buhler AV, Dunwiddie TV. 2001. Regulation of the activity of hippocampal stratum oriens interneurons by alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. *Neuroscience* 106:55-67.
- Buisson B, Gopalakrishnan M, Arneric SP, Sullivan JP, Bertrand D. 1996. Human alpha4beta2 neuronal nicotinic acetylcholine receptor in HEK 293 cells: A patch-clamp study. *J Neurosci* 16:7880-7891.
- Cauli B, Tong XK, Rancillac A, Serluca N, Lambolez B, Rossier J, Hamel E. 2004. Cortical GABA interneurons in neurovascular coupling: relays for subcortical vasoactive pathways. *J Neurosci* 24:8940-8949.
- Christophe E, Roebuck A, Staiger JF, Lavery DJ, Charpak S, Audinat E. 2002. Two types of nicotinic receptors mediate an excitation of neocortical layer I interneurons. *J Neurophysiol* 88:1318-1327.
- Couturier S, Bertrand D, Matter JM, Hernandez MC, Bertrand S, Millar N, Valera S, Barkas T, Ballivet M. 1990. A neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit (alpha 7) is developmentally regulated and forms a homo-oligomeric channel blocked by alpha-BTX. *Neuron* 5:847-856.
- Cruikshank SJ, Urabe H, Nurmikko AV, Connors BW. 2010. Pathway-specific feedforward circuits between thalamus and neocortex revealed by selective optical stimulation of axons. *Neuron* 65:230-245.
- Dani JA, Bertrand D. 2007. Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47:699-729.
- Dzubay JA, Jahr CE. 1996. Kinetics of NMDA channel opening. *J Neurosci* 16:4129-4134.
- English DF, Ibanez-Sandoval O, Stark E, Tecuapetla F, Buzsaki G, Deisseroth K, Tepper JM, Koos T. 2012. GABAergic circuits mediate the reinforcement-related signals of striatal cholinergic interneurons. *Nat Neurosci* 15:123-130.
- Fatt P, Katz B. 1951. An analysis of the end-plate potential recorded with an intracellular electrode. *J Physiol* 115:320-370.
- Gerzanich V, Wang F, Kuryatov A, Lindstrom J. 1998. alpha 5 Subunit alters desensitization, pharmacology, Ca⁺⁺ permeability and Ca⁺⁺ modulation of human neuronal alpha 3 nicotinic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 286:311-320.

- Gong S, Doughty M, Harbaugh CR, Cummins A, Hatten ME, Heintz N, Gerfen CR. 2007. Targeting Cre recombinase to specific neuron populations with bacterial artificial chromosome constructs. *J Neurosci* 27:9817-9823.
- Gritti I, Mainville L, Mancina M, Jones BE. 1997. GABAergic and other noncholinergic basal forebrain neurons, together with cholinergic neurons, project to the mesocortex and isocortex in the rat. *J Comp Neurol* 383:163-177.
- Grybko MJ, Hahm ET, Perrine W, Parnes JA, Chick WS, Sharma G, Finger TE, Vijayaraghavan S. 2011. A transgenic mouse model reveals fast nicotinic transmission in hippocampal pyramidal neurons. *Eur J Neurosci* 33:1786-1798.
- Gulledge AT, Park SB, Kawaguchi Y, Stuart GJ. 2007. Heterogeneity of phasic cholinergic signaling in neocortical neurons. *J Neurophysiol* 97:2215-2229.
- Heck N, Betuing S, Vanhoutte P, Caboche J. 2012. A deconvolution method to improve automated 3D-analysis of dendritic spines: application to a mouse model of Huntington's disease. *Brain Struct Funct* 217:421-434.
- Hedreen JC, Bacon SJ, Cork LC, Kitt CA, Crawford GD, Salvaterra PM, Price DL. 1983. Immunocytochemical identification of cholinergic neurons in the monkey central nervous system using monoclonal antibodies against choline acetyltransferase. *Neurosci Lett* 43:173-177.
- Hendry SH, Jones EG, Killackey HP, Chalupa LM. 1987. Choline acetyltransferase-immunoreactive neurons in fetal monkey cerebral cortex. *Brain Res* 465:313-317.
- Herzog E, Landry M, Buhler E, Bouali-Benazzouz R, Legay C, Henderson CE, Nagy F, Dreyfus P, Giros B, El Mestikawy S. 2004. Expression of vesicular glutamate transporters, VGLUT1 and VGLUT2, in cholinergic spinal motoneurons. *Eur J Neurosci* 20:1752-1760.
- Hestrin S, Nicoll RA, Perkel DJ, Sah P. 1990. Analysis of excitatory synaptic action in pyramidal cells using whole-cell recording from rat hippocampal slices. *J Physiol* 422:203-225.
- Ifune CK, Steinbach JH. 1990. Rectification of acetylcholine-elicited currents in PC12 pheochromocytoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:4794-4798.
- Kalmbach A, Hedrick T, Waters J. 2012. Selective optogenetic stimulation of cholinergic axons in neocortex. *J Neurophysiol* 107:2008-2019.
- Kasashima S, Kawashima A, Muroishi Y, Futakuchi H, Nakanishi I, Oda Y. 1999. Neurons with choline acetyltransferase immunoreactivity and mRNA are present in the human cerebral cortex. *Histochem Cell Biol* 111:197-207.
- Kassam SM, Herman PM, Goodfellow NM, Alves NC, Lambe EK. 2008. Developmental excitation of corticothalamic neurons by nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurosci* 28:8756-8764.
- Katz B, Miledi R. 1970. Membrane noise produced by acetylcholine. *Nature* 226:962-963.
- Kolisnyk B, Guzman MS, Raulic S, Fan J, Magalhaes AC, Feng G, Gros R, Prado VF, Prado MA. 2013. ChAT-ChR2-EYFP mice have enhanced motor endurance but show deficits in attention and several additional cognitive domains. *J Neurosci* 33:10427-10438.
- Kuryatov A, Onksen J, Lindstrom J. 2008. Roles of accessory subunits in alpha4beta2(*) nicotinic receptors. *Mol Pharmacol* 74:132-143.
- Lamotte d'Incamps B, Ascher P. 2008. Four excitatory postsynaptic ionotropic receptors coactivated at the motoneuron-Renshaw cell synapse. *J Neurosci* 28:14121-14131.
- Lamotte d'Incamps B, Krejci E, Ascher P. 2012. Mechanisms shaping the slow nicotinic synaptic current at the motoneuron-Renshaw cell synapse. *J Neurosci* 32:8413-8423.
- Leao RN, Mikulovic S, Leao KE, Munguba H, Gezelius H, Enjin A, Patra K, Eriksson A, Loew LM, Tort AB, Kullander K. 2012. OLM interneurons differentially modulate CA3 and entorhinal inputs to hippocampal CA1 neurons. *Nat Neurosci* 15:1524-1530.
- Lee MG, Hassani OK, Alonso A, Jones BE. 2005. Cholinergic basal forebrain neurons burst with theta during waking and paradoxical sleep. *J Neurosci* 25:4365-4369.
- Lendvai B, Vizi ES. 2008. Nonsynaptic chemical transmission through nicotinic acetylcholine receptors. *Physiol Rev* 88:333-349.
- Li P, Steinbach JH. 2010. The neuronal nicotinic alpha4beta2 receptor has a high maximal probability of being open. *Br J Pharmacol* 160:1906-1915.

- Mattis J, Tye KM, Ferenczi EA, Ramakrishnan C, O'Shea DJ, Prakash R, Gunaydin LA, Hyun M, Fenno LE, Gradinaru V, Yizhar O, Deisseroth K. 2011. Principles for applying optogenetic tools derived from direct comparative analysis of microbial opsins. *Nat Methods* 9:159-172.
- McQuiston AR, Madison DV. 1999. Nicotinic receptor activation excites distinct subtypes of interneurons in the rat hippocampus. *J Neurosci* 19:2887-2896.
- Mechawar N, Cozzari C, Descarries L. 2000. Cholinergic innervation in adult rat cerebral cortex: a quantitative immunocytochemical description. *J Comp Neurol* 428:305-318.
- Mrzljak L, Pappy M, Leranath C, Goldman-Rakic PS. 1995. Cholinergic synaptic circuitry in the macaque prefrontal cortex. *J Comp Neurol* 357:603-617.
- Nicholson C, Phillips JM. 1981. Ion diffusion modified by tortuosity and volume fraction in the extracellular microenvironment of the rat cerebellum. *J Physiol* 321:225-257.
- Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbet A, Prochiantz A. 1984. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 307:462-465.
- Parikh V, Kozak R, Martinez V, Sarter M. 2007. Prefrontal acetylcholine release controls cue detection on multiple timescales. *Neuron* 56:141-154.
- Petreanu L, Huber D, Sobczyk A, Svoboda K. 2007. Channelrhodopsin-2-assisted circuit mapping of long-range callosal projections. *Nat Neurosci* 10:663-668.
- Porter JT, Cauli B, Tsuzuki K, Lambolez B, Rossier J, Audinat E. 1999. Selective excitation of subtypes of neocortical interneurons by nicotinic receptors. *J Neurosci* 19:5228-5235.
- Ramirez-Latorre J, Yu CR, Qu X, Perin F, Karlin A, Role L. 1996. Functional contributions of alpha5 subunit to neuronal acetylcholine receptor channels. *Nature* 380:347-351.
- Ren J, Qin C, Hu F, Tan J, Qiu L, Zhao S, Feng G, Luo M. 2011. Habenula "cholinergic" neurons co-release glutamate and acetylcholine and activate postsynaptic neurons via distinct transmission modes. *Neuron* 69:445-452.
- Rigo JM, Badiu CI, Legendre P. 2003. Heterogeneity of postsynaptic receptor occupancy fluctuations among glycinergic inhibitory synapses in the zebrafish hindbrain. *J Physiol* 553:819-832.
- Roghani A, Feldman J, Kohan SA, Shirzadi A, Gundersen CB, Brecha N, Edwards RH. 1994. Molecular cloning of a putative vesicular transporter for acetylcholine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:10620-10624.
- Salas R, Orr-Urtreger A, Broide RS, Beaudet A, Paylor R, De Biasi M. 2003. The nicotinic acetylcholine receptor subunit alpha 5 mediates short-term effects of nicotine in vivo. *Mol Pharmacol* 63:1059-1066.
- Sarter M, Parikh V, Howe WM. 2009. Phasic acetylcholine release and the volume transmission hypothesis: time to move on. *Nat Rev Neurosci* 10:383-390.
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9:676-682.
- Schoenenberger P, Scharer YP, Oertner TG. 2011. Channelrhodopsin as a tool to investigate synaptic transmission and plasticity. *Exp Physiol* 96:34-39.
- Sigworth FJ. 1980. The variance of sodium current fluctuations at the node of Ranvier. *J Physiol* 307:97-129.
- Smiley JF, Morrell F, Mesulam MM. 1997. Cholinergic synapses in human cerebral cortex: an ultrastructural study in serial sections. *Exp Neurol* 144:361-368.
- Srinivas S, Watanabe T, Lin CS, Williams CM, Tanabe Y, Jessell TM, Costantini F. 2001. Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus. *BMC Dev Biol* 1:4.
- Stanchev D, Sargent PB. 2011. alpha7-Containing and non-alpha7-containing nicotinic receptors respond differently to spillover of acetylcholine. *J Neurosci* 31:14920-14930.
- Sun YG, Pita-Almenar JD, Wu CS, Renger JJ, Uebele VN, Lu HC, Beierlein M. 2013. Biphasic cholinergic synaptic transmission controls action potential activity in thalamic reticular nucleus neurons. *J Neurosci* 33:2048-2059.

- Turrini P, Casu MA, Wong TP, De Koninck Y, Ribeiro-da-Silva A, Cuello AC. 2001. Cholinergic nerve terminals establish classical synapses in the rat cerebral cortex: synaptic pattern and age-related atrophy. *Neuroscience* 105:277-285.
- Ullian EM, McIntosh JM, Sargent PB. 1997. Rapid synaptic transmission in the avian ciliary ganglion is mediated by two distinct classes of nicotinic receptors. *J Neurosci* 17:7210-7219.
- Umbriaco D, Watkins KC, Descarries L, Cozzari C, Hartman BK. 1994. Ultrastructural and morphometric features of the acetylcholine innervation in adult rat parietal cortex: an electron microscopic study in serial sections. *J Comp Neurol* 348:351-373.
- von Engelhardt J, Eliava M, Meyer AH, Rozov A, Monyer H. 2007. Functional characterization of intrinsic cholinergic interneurons in the cortex. *J Neurosci* 27:5633-5642.
- Woodhull AM. 1973. Ionic blockage of sodium channels in nerve. *J Gen Physiol* 61:687-708.
- Zhang ZW, Coggan JS, Berg DK. 1996. Synaptic currents generated by neuronal acetylcholine receptors sensitive to alpha-bungarotoxin. *Neuron* 17:1231-1240.
- Zhou FM, Hablitz JJ. 1996. Morphological properties of intracellularly labeled layer I neurons in rat neocortex. *J Comp Neurol* 376:198-213.

FIGURE LEGENDS.

Figure 1. Cell type-specific nicotinic transmission

A and C. *Left*, firing patterns of L1 (A) and L6 (C) neurons. *Right*, confocal reconstruction of recorded neurons illustrating the absence (L1) or the presence (L6) of dendritic spines. Scale bar: 50 μm , inset, 10 μm . **B and D.** Responses of the same neurons as in A and C to a 10 ms light pulse (grey traces) plotted using either a decimal (left) or logarithmic (right) vertical scale. Black traces represent the fit of the responses by a sum of 2 (L6) or 3 (L1) exponential functions.

Figure 2. Differential expression of $\alpha 7$ and $\alpha 4\beta 2$ receptors determine kinetics of nicotinic transmission in L1 and L6 neurons

A and C. *Left*, responses of L1 and L6 neurons in control condition and in the presence of $\alpha 7$ antagonist (MLA, 100 nM) and non- $\alpha 7$ antagonist (DH β E, 2 μM). *Right*, Mean amplitudes of $\alpha 7$ and non- $\alpha 7$ currents normalized to control condition. **B and D.** *Left*, light-induced currents recorded at holding potentials ranging from -133 mV to +47 mV. *Right*, current-voltage relationships of $\alpha 7$ and non- $\alpha 7$ currents. For each cell, current amplitudes were normalized to the current obtained at -73 mV. The continuous lines represent a fit of the I-V relations using a Woodhull model (1973, see methods). The values of the parameters are given in Results.

Figure 3. 3D confocal reconstruction reveals contacts between ChR2-expressing cholinergic fibers and responsive neurons

A. Maximal projection of a z-stack illustrating ChR2-YFP+ cholinergic fibers (green) and a responsive L1 neuron filled with biocytin (red). **B.** Single confocal sections of the subfield delineated in A showing appositions between the dendrite and two ChR2-YFP+ varicosities. **C.** 3D rendering of the subfield delineated in A following 3D deconvolution. **D-E.** Same as C following rotation to get different viewpoints of contacts indicated by arrowheads. **F-J.** Same as A-E for an L6 neuron. **K.** Distribution of Euclidean distances between appositions and the

center of the soma measured in 6 L1 and 9 L6 neurons and corresponding cumulative probabilities.

Figure 4. Activation of postsynaptic clusters of nicotinic receptors is insensitive to inhibition of acetylcholine esterase

A. Examples of nicotinic currents recorded in an L1 and an L6 neuron in the presence or absence of the AChE inhibitor neostigmine (2 μ M). Insets illustrate the invariance of latencies and onset kinetics of these currents. **B.** Mean kinetics and amplitudes of light-evoked currents. In middle and right panels, data were plotted using a logarithmic scale. Note that the only effect of neostigmine was on the decay of α 4 β 2 currents.

Figure 5: Single channel properties of postsynaptic nicotinic receptors in L6 neurons

A-B. Example of non-stationary noise analysis of light-evoked currents in a single L6 neuron. **A.** Traces illustrate the low trial-to-trial variability of individual responses and histogram shows the distribution of current amplitudes from the same cell (30 events). **B.** The mean variance of the current as a function of the mean current amplitude was fitted with a parabolic function to determine the number (N), unitary conductance (γ) and opening probability (P_o) of nAChR channels mediating light-evoked currents. The parabolic shape of the dataset reflects high P_o value. Inset: variance of the baseline current. **C.** The linear relationship between N and mean current amplitude calculated for each L6 neuron ($n=13$) indicates that P_o is constant over a large range of current amplitudes. **D.** Examples of nicotinic currents recorded in a L6 neuron in control (single trial) or low Ca/High Mg (average of 22 successful trials) conditions. Inset illustrates the invariance of response kinetics between the two conditions. The histogram shows the distribution of current amplitude from the same cell in low Ca/High Mg condition. **E.** Comparison of light-induced currents recorded in L6 neurons ($n=7$) before and after switching from control to low Ca/High Mg conditions.

Figure 6: Burst stimulation induces tonic responses and activates extrasynaptic receptors

A. The response of an L1 neuron to a train of light pulses illustrates repetitive ACh release along the train. Note that this neuron did not exhibit detectable $\alpha 4\beta 2$ component. Insets show the invariance of $\alpha 7$ current kinetics along the train and the occurrence of additional fast currents during inter-pulse intervals. **B.** Train stimulation induced tonic responses in L1 and L6 neurons. Responses increased during the train and slowly decayed at the end (L1) or during (L6) the stimulation period in control condition. Neostigmine abolished the difference between L1 and L6 responses, suggesting a dynamic role of AChE in shaping L6 responses. **C.** Mean amplitudes and decay kinetics of responses to train stimulation. Amplitudes were measured at the first stimulus (A_1) or at the maximum of the response (A_{max}). Decay kinetics of responses to single pulse are derived from experiments described in Figure 4. Comparison of A_1 versus A_{max} and of decay kinetics of responses to single pulse versus train stimulation indicates recruitment of extrasynaptic receptors upon train stimulation.

Figure 7. The $\alpha 5$ nAChR subunit regulates short term plasticity at L6 nicotinic synapses

A. Superimposed responses of an L6 neuron to two successive light pulses of increasing duration. Inset: increasing pulse duration did not significantly alter the paired-pulse ratio (P_2/P_1). **B.** Nicotinic currents recorded in $\alpha 5^{+/+}$ and $\alpha 5^{-/-}$ mice and evoked with increasing inter-stimulus interval (from 1 s to 60 s). The recovery of $\alpha 4\beta 2$ currents in $\alpha 5^{+/+}$ mice was slower in L6 than in L1 neurons. L6 nicotinic currents recovered faster and more completely in $\alpha 5^{-/-}$ than in $\alpha 5^{+/+}$ mice. **C.** Normalized group data showing the ratio between current amplitudes measured at the n^{th} and at the 1^{st} light pulse (P_n/P_1) as a function of time after the 1^{st} pulse.

Supplementary Figure 1. Selective expression of ChR2 in cholinergic neurons

A. Expression of choline acetyltransferase (ChAT, red) and of the Cre reporter YFP (green) in the basal forebrain (BF), medial septum (MS), striatum and cortex of $\text{ChAT}^{\text{Cre}}::\text{ROSA}^{\text{YFP}}$

mice. Note that ChAT and YFP colocalization was high in BF and low in cortex. Scale bar: 20 μm except 40 μm for cortex. **B.** Expression of ChAT and YFP in BF and cortex 6 weeks after injection of AAV-DIO-ChR2-YFP in the BF of ChATCre mice. Scale bar: 20 μm in left panel, 50 μm in middle panels and 5 μm in right panel. **C.** *Left*, responses of a YFP-positive BF neuron to current step injections after transduction of BF cholinergic neurons with ChR2-YFP. *Right*, responses of the same neuron to a 10 Hz train of 1 ms light pulses (*upper*) and to a 5 s light step. **D.** *Left*, responses of a YFP-negative striatal medium spiny neuron to current step injections after transduction of local cholinergic neurons with ChR2-YFP. *Right*, responses of the same neuron to 10 ms light pulses persisted in the presence of CNQX (10 μM), APV (50 μM) and gabazine (GBZ, 10 μM) but were inhibited by DH β E (2 μM) showing direct nicotinic transmission.

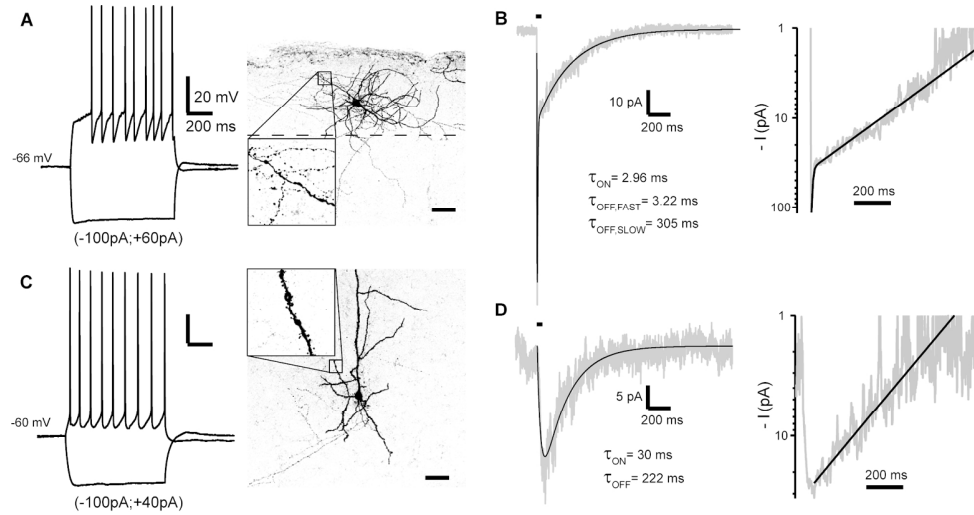


Figure 1. Cell type-specific nicotinic transmission

A and C. Left, firing patterns of L1 (A) and L6 (C) neurons. Right, confocal reconstruction of recorded neurons illustrating the absence (L1) or the presence (L6) of dendritic spines. Scale bar: 50 μ m, inset, 10 μ m. B and D. Responses of the same neurons as in A and C to a 10 ms light pulse (grey traces) plotted using either a decimal (left) or logarithmic (right) vertical scale. Black traces represent the fit of the responses by a sum of 2 (L6) or 3 (L1) exponential functions.

167x87mm (300 x 300 DPI)

Review

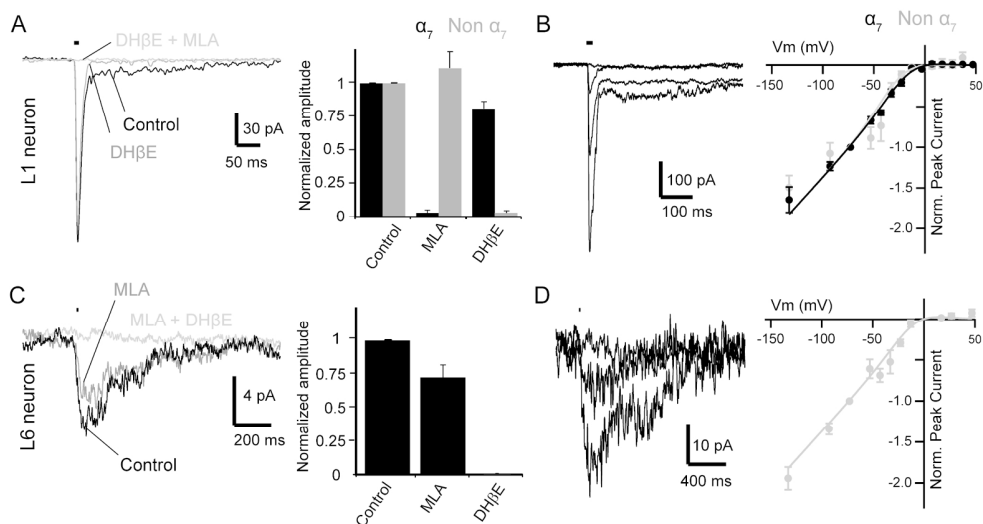


Figure 2. Differential expression of $\alpha 7$ and $\alpha 4\beta 2$ receptors determine kinetics of nicotinic transmission in L1 and L6 neurons

A and C. Left, responses of L1 and L6 neurons in control condition and in the presence of $\alpha 7$ antagonist (MLA, 100 nM) and non- $\alpha 7$ antagonist (DH β E, 2 μ M). Right, Mean amplitudes of $\alpha 7$ and non- $\alpha 7$ currents normalized to control condition. B and D. Left, light-induced currents recorded at holding potentials ranging from -120 mV to +60 mV. Right, current-voltage relationships of $\alpha 7$ and non- $\alpha 7$ currents. For each cell, current amplitudes were normalized to the current obtained at -60 mV. The continuous lines represent a fit of the I-V relations using a Woodhull model (1973, see methods). The values of the parameters are given in Results.

175x94mm (300 x 300 DPI)

Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

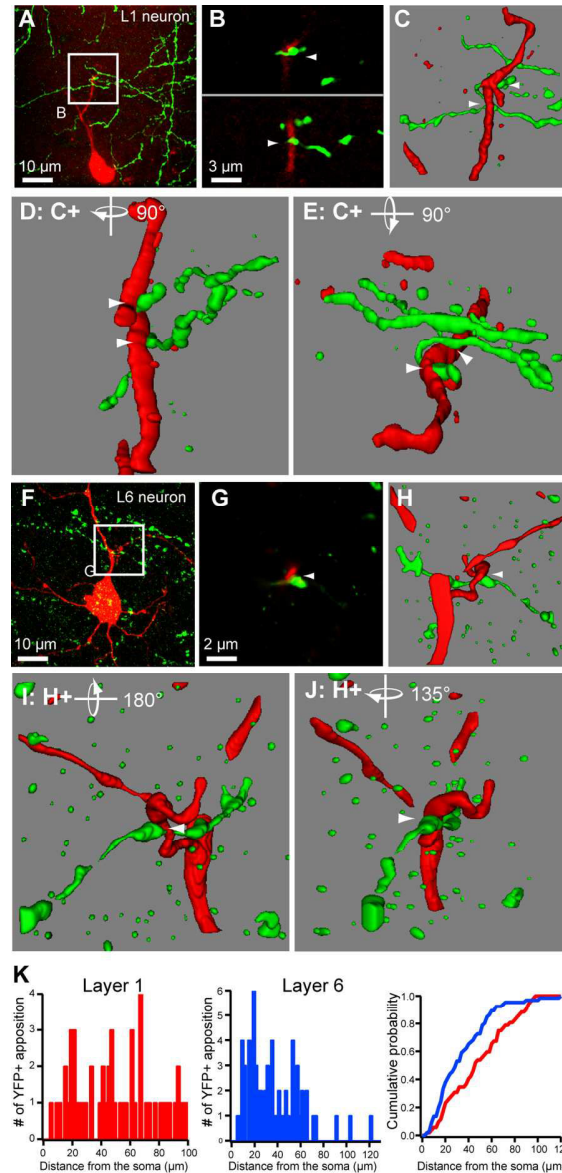


Figure 3. 3D confocal reconstruction reveals contacts between Chr2-expressing cholinergic fibers and responsive neurons

A. Maximal projection of a z-stack illustrating Chr2-YFP+ cholinergic fibers (green) and a responsive L1 neuron filled with biocytin (red). B. Single confocal sections of the subfield delineated in A showing appositions between the dendrite and two Chr2-YFP+ varicosities. C. 3D rendering of the subfield delineated in A following 3D deconvolution. D-E. Same as C following rotation to get different viewpoints of contacts indicated by arrowheads. F-J. Same as A-E for an L6 neuron. K. Distribution of Euclidean distances between appositions and the center of the soma measured in 6 L1 and 9 L6 neurons and corresponding cumulative probabilities.

85x177mm (300 x 300 DPI)

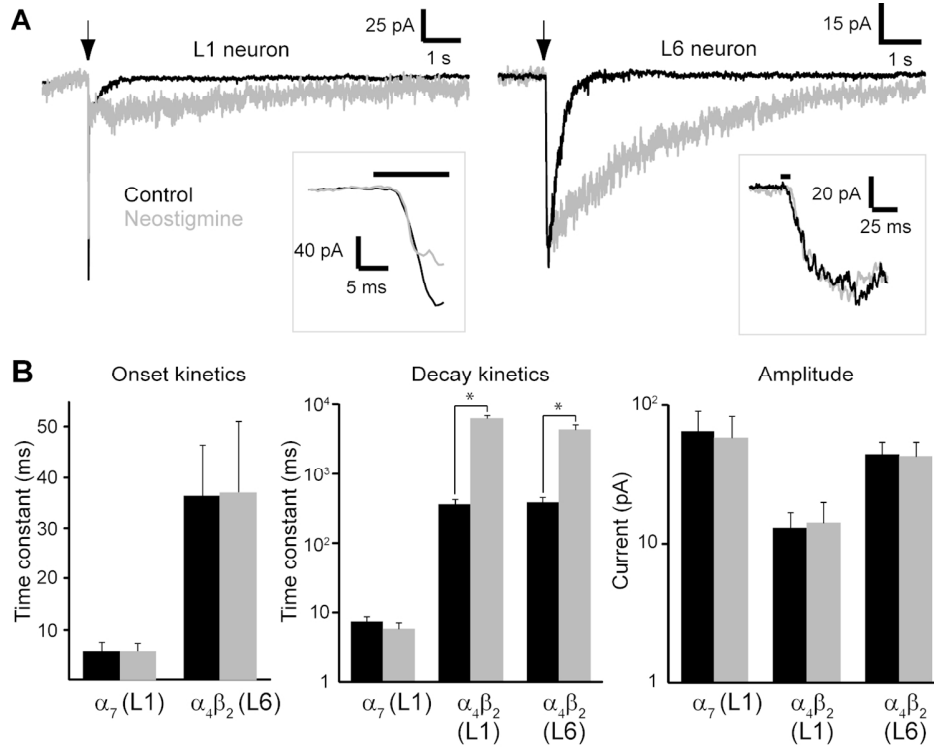


Figure 4. Activation of postsynaptic clusters of nicotinic receptors is insensitive to inhibition of acetylcholine esterase

A. Examples of nicotinic currents recorded in an L1 and an L6 neuron in the presence or absence of the AChE inhibitor neostigmine (2 μ M). Insets illustrate the invariance of latencies and onset kinetics of these currents. B. Mean kinetics and amplitudes of light-evoked currents. In middle and right panels, data were plotted using a logarithmic scale. Note that the only effect of neostigmine was on the decay of $\alpha_4\beta_2$ currents.

127x97mm (300 x 300 DPI)



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

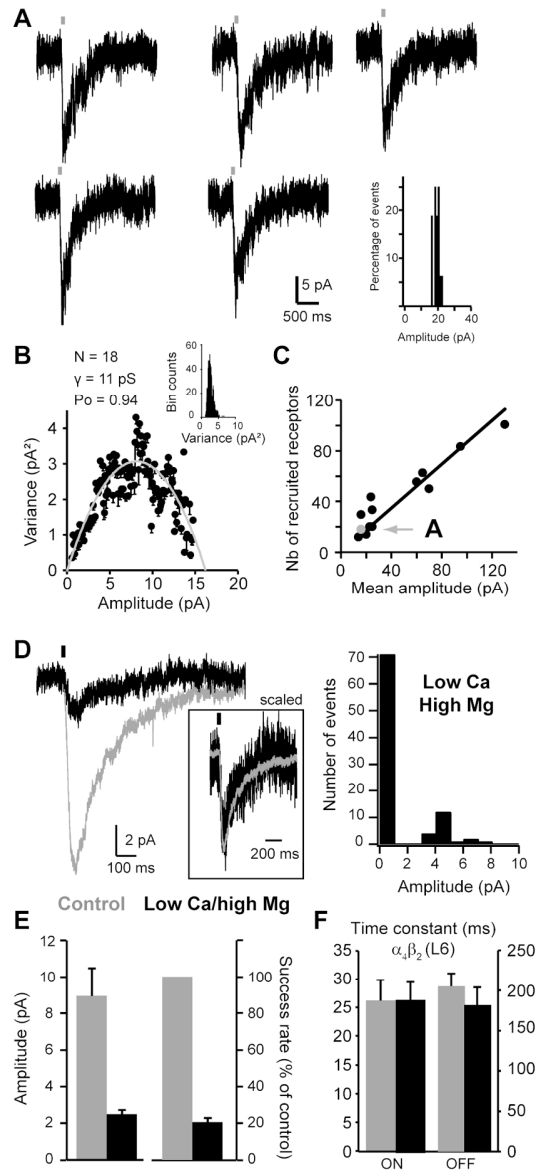


Figure 5: Single channel properties of postsynaptic nicotinic receptors in L6 neurons
 A-B. Example of non-stationary noise analysis of light-evoked currents in a single L6 neuron. A. Traces illustrate the low trial-to-trial variability of individual responses and histogram shows the distribution of current amplitudes from the same cell (30 events). B. The mean variance of the current as a function of the mean current amplitude was fitted with a parabolic function to determine the number (N), unitary conductance (γ) and opening probability (P_o) of nAChR channels mediating light-evoked currents. The parabolic shape of the dataset reflects high P_o value. Inset: variance of the baseline current. C. The linear relationship between N and mean current amplitude calculated for each L6 neuron ($n=13$) indicates that P_o is constant over a large range of current amplitudes. D. Examples of nicotinic currents recorded in a L6 neuron in control (single trial) or low Ca/High Mg (average of 22 successful trials) conditions. Inset illustrates the invariance of response kinetics between the two conditions. The histogram shows the distribution of current amplitude from the same cell in low Ca/High Mg condition. E. Comparison of light-induced currents recorded in L6 neurons ($n=7$) before and after switching from control to low Ca/High Mg

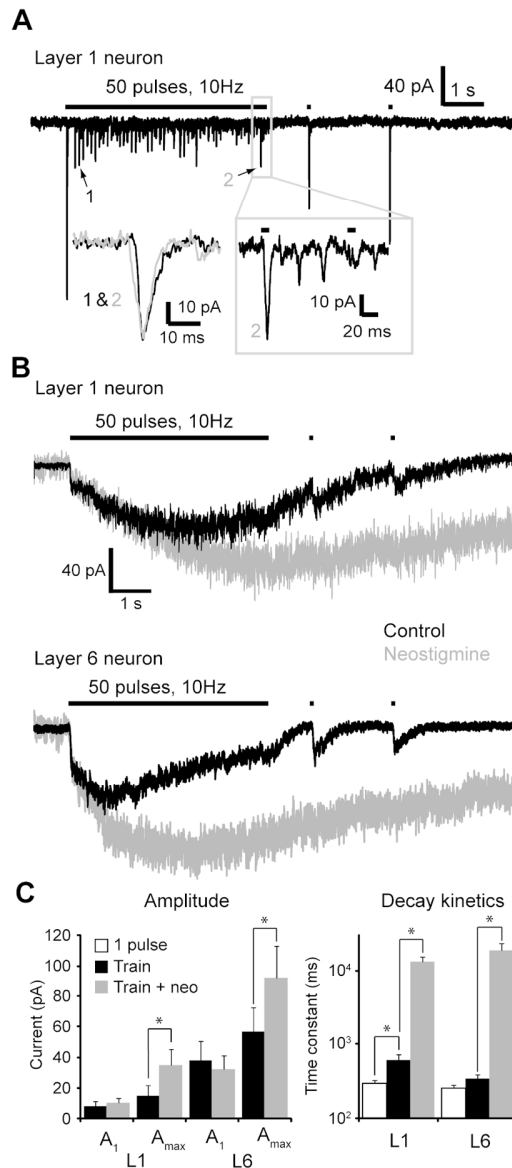


Figure 6: Burst stimulation induces tonic responses and activates extrasynaptic receptors

A. The response of an L1 neuron to a train of light pulses illustrates repetitive ACh release along the train. Note that this neuron did not exhibit detectable $\alpha 4\beta 2$ component. Insets show the invariance of $\alpha 7$ current kinetics along the train and the occurrence of additional fast currents during inter-pulse intervals. B. Train stimulation induced tonic responses in L1 and L6 neurons. Responses increased during the train and slowly decayed at the end (L1) or during (L6) the stimulation period in control condition. Neostigmine abolished the difference between L1 and L6 responses, suggesting a dynamic role of AChE in shaping L6 responses. C. Mean amplitudes and decay kinetics of responses to train stimulation. Amplitudes were measured at the first stimulus (A_1) or at the maximum of the response (A_{max}). Decay kinetics of responses to single pulse are derived from experiments described in Figure 4. Comparison of A_1 versus A_{max} and of decay kinetics of responses to single pulse versus train stimulation indicates recruitment of extrasynaptic receptors upon train stimulation.

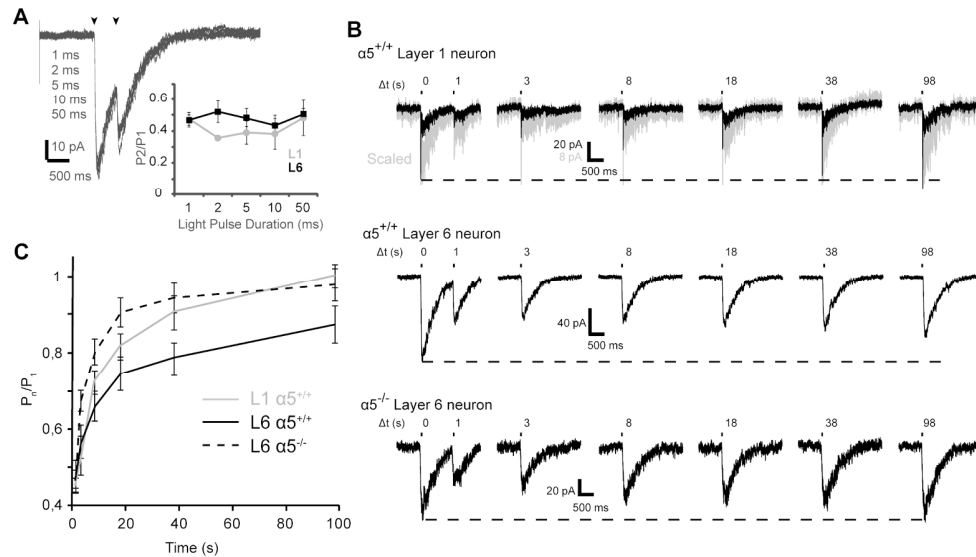


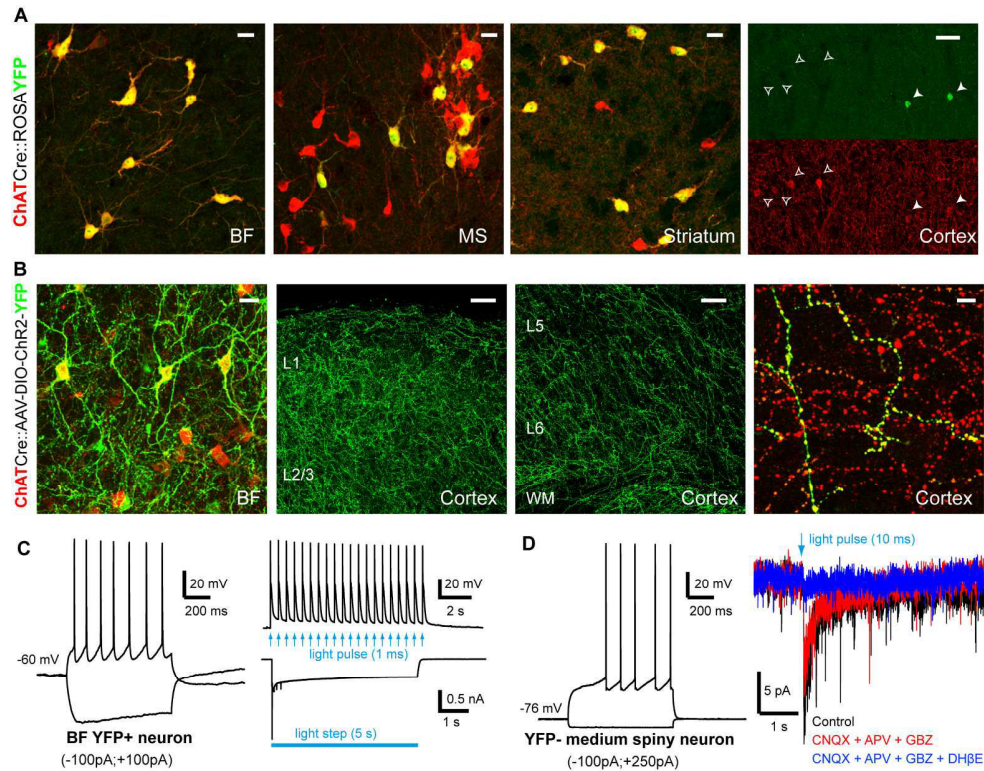
Figure 7. The $\alpha 5$ nAChR subunit regulates short term plasticity at L6 nicotinic synapses

A. Superimposed responses of an L6 neuron to two successive light pulses of increasing duration. Inset: increasing pulse duration did not significantly alter the paired-pulse ratio (P2/P1). B. Nicotinic currents recorded in $\alpha 5^{+/+}$ and $\alpha 5^{-/-}$ mice and evoked with increasing inter-stimulus interval (from 1 s to 60 s). The recovery of $\alpha 4\beta 2$ currents in $\alpha 5^{+/+}$ mice was slower in L6 than in L1 neurons. L6 nicotinic currents recovered faster and more completely in $\alpha 5^{-/-}$ than in $\alpha 5^{+/+}$ mice. C. Normalized group data showing the ratio between current amplitudes measured at the n th and at the 1st light pulse (P_n/P_1) as a function of time after the 1st pulse.

186x105mm (300 x 300 DPI)

Supplementary Figure 1. Selective expression of ChR2 in cholinergic neurons

1
2
3
4
5 **A.** Expression of choline acetyltransferase (ChAT, red) and of the Cre reporter YFP (green)
6 in the basal forebrain (BF), medial septum (MS), striatum and cortex of ChATCre::ROSA^{YFP}
7 mice. Note that ChAT and YFP colocalization was high in BF and low in cortex. Scale bar: 20
8 μm except 40 μm for cortex. **B.** Expression of ChAT and YFP in BF and cortex 6 weeks after
9 injection of AAV-DIO-ChR2-YFP in the BF of ChATCre mice. Scale bar: 20 μm in left panel,
10 50 μm in middle panels and 5 μm in right panel. **C.** *Left*, responses of a YFP-positive BF
11 neuron to current step injections after transduction of BF cholinergic neurons with ChR2-
12 YFP. *Right*, responses of the same neuron to a 10 Hz train of 1 ms light pulses (*upper*) and
13 to a 5 s light step. **D.** *Left*, responses of a YFP-negative striatal medium spiny neuron to
14 current step injections after transduction of local cholinergic neurons with ChR2-YFP. *Right*,
15 responses of the same neuron to 10 ms light pulses persisted in the presence of CNQX (10
16 μM), APV (50 μM) and gabazine (GBZ, 10 μM) but were inhibited by DH β E (2 μM) showing
17 direct nicotinic transmission.
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



Supplementary Figure 1. Selective expression of ChR2 in cholinergic neurons

A. Expression of choline acetyltransferase (ChAT, red) and of the Cre reporter YFP (green) in the basal forebrain (BF), medial septum (MS), striatum and cortex of ChATCre::ROSA-YFP mice. Note that ChAT and YFP colocalization was high in BF and low in cortex. Scale bar: 20 μ m except 40 μ m for cortex. B. Expression of ChAT and YFP in BF and cortex 6 weeks after injection of AAV-DIO-ChR2-YFP in the BF of ChATCre mice. Scale bar: 20 μ m in left panel, 50 μ m in middle panels and 5 μ m in right panel. C. Left, responses of a YFP-positive BF neuron to current step injections after transduction of BF cholinergic neurons with ChR2-YFP. Right, responses of the same neuron to a 10 Hz train of 1 ms light pulses (upper) and to a 5 s light step. D. Left, responses of a YFP-negative striatal medium spiny neuron to current step injections after transduction of local cholinergic neurons with ChR2-YFP. Right, responses of the same neuron to 10 ms light pulses persisted in the presence of CNQX (10 μ M), APV (50 μ M) and gabazine (GBZ, 10 μ M) but were inhibited by DH β E (2 μ M) showing direct nicotinic transmission.

182x143mm (300 x 300 DPI)

Quatrième partie

Discussion

Au cours de ma thèse, j'ai cherché à comprendre comment trois structures impliquées dans l'éveil agissent sur la dynamique du réseau cortical. En particulier, je me suis intéressée à la spécificité de couches et de types cellulaires ciblés par l'orexine, l'acétylcholine et le thalamus non-spécifique. Mes travaux ont permis de montrer trois modes d'action différents qui peuvent agir de façon complémentaire sur la dynamique du réseau cortical. Cette discussion me permettra dans un premier temps de faire une synthèse des différents travaux et de montrer que ces trois structures participent à l'éveil cortical mais agissent à différentes échelles de temps sur la dynamique corticale. Puis, je discuterai en détail de l'existence d'une synapse nicotinique dans le néocortex en comparant mes résultats à ceux publiés en 2012 par Shaul Hestrin et son équipe (Bennett et al., 2012). Enfin, je tenterai d'intégrer mes travaux de dissection des projections thalamocorticales dans la perspective plus intégrée de l'encodage des informations mnémoniques.

1 | Encodage temporel des informations liées au contexte et en particulier à l'état d'éveil de l'animal

L'orexine, l'acétylcholine et le thalamus non-spécifique sont tous impliqués dans la modulation des états d'éveil corticaux, mais chacun agit avec des dynamiques temporelles très différentes. Ceci peut s'expliquer entre autres par le fait que tous trois agissent selon des modalités de transmission et des cibles cellulaires et laminaires différentes. En effet, j'ai mis en avant durant ma thèse que l'orexine cible principalement la couche VIb via une transmission aux cinétiques très lentes, tandis que les transmissions nicotinique et du thalamus non-spécifique présentent des cinétiques rapides. De plus, la stimulation des fibres nicotiques active de façon ubiquitaire les neurones des couches I et VI alors que le thalamus non-spécifique cible préférentiellement les couches infragranulaires. L'ensemble de ces travaux suggère que l'éveil cortical n'est pas un phénomène homogène mais un processus complexe qui requiert l'action combinée de modulateurs aux cinétiques complémentaires.

L'éveil est classiquement divisé en éveil actif et passif en fonction des oscillations corticales mais cet éveil peut être redéfini localement en fonction de la tâche effectuée par l'animal. Ainsi, par exemple, lors d'une tâche visuelle, le cortex visuel sera dans un état d'éveil plus prononcé que les autres cortex sensoriels. De plus, l'implication des cortex associatifs est fondamentale dans la gestion d'une tâche comportementale, l'état d'éveil de ces régions est par conséquent crucial pour la réalisation de la tâche. En effet, toutes les modalités non-sensorielles impliquées dans la réalisation d'une tâche, motivation, mémoire, prise de décision sont associées à l'activation de ces aires. Il est d'ailleurs intéressant de noter que l'orexine, l'acétylcholine et le thalamus non-spécifique agissent préférentiellement dans la modulation des entrées non-sensorielles. Il convient donc de redéfinir l'éveil plus précisément et la modulation à trois échelles de temps différentes peut permettre

d'en aborder la complexité.

Dans cette partie, je reprendrai donc les différents aspects de mes travaux de thèse pour montrer comment chacun de ces neuromodulateurs permet dans une échelle de temps différente d'influer sur la gestion des états d'éveil.

Transmission orexinergique et cycle circadien

Je me suis dans un premier temps intéressée à la modulation du réseau cortical par l'orexine. Ce peptide active des récepteurs métabotropiques exprimés par l'ensemble des neurones, excitateurs et inhibiteurs, de la couche VIb (Bayer et al., 2004 et Publication 2). L'application d'orexine exogène montre que, comme l'ensemble des transmissions peptidergiques, la transmission orexinergique est lente. La dépolarisation des neurones de la couche VIb en présence d'orexine est progressive avec une émission de potentiels d'action après environ une minute d'application qui perdurent jusqu'à 10 minutes après la fin de l'application (Bayer et al., 2004 et publication 2). Cette transmission lente et à longue durée active donc la couche VIb de façon tonique.

L'orexine est impliquée dans la modulation du rythme circadien. En effet, la mesure de l'activité neuronale par quantification de l'expression de c-FOS indique une activation des neurones à orexine pendant la période de veille. L'enregistrement *in vivo* des neurones à orexine confirme que ces neurones ont une activité corrélée à l'état d'éveil de l'animal, avec un taux de décharge presque nul pendant le sommeil et un taux de décharge tonique à 1 – 2 Hz pendant l'éveil (Estabrooke et al., 2001). De façon intéressante, l'activation des neurones à orexine précède le réveil, indiquant que l'orexine promeut la transition sommeil–veille de la souris. Enfin, la stimulation des neurones à orexine ou l'injection d'orexine dans les ventricules promeut l'éveil de la souris (Hagan et al., 1999).

Au cours de cette étude, j'ai cherché à comprendre comment l'orexine agissait au niveau du cortex cérébral. Mes travaux suggèrent que l'action de l'orexine n'est pas aussi ubiquitaire qu'on pourrait l'imaginer. En effet, elle cible spécifiquement les neurones de la couche VIb qui projettent principalement dans les couches infragranulaires du néocortex et semblent éviter les neurones de la couche IV. Or ces neurones sont la principale voie d'entrée des entrées sensorielles. L'orexine semble donc privilégier les processus d'intégration cognitive plutôt que le relais des informations sensorielles. De plus, il est intéressant de constater que les fibres orexinergiques ne ciblent pas les noyaux thalamiques primaires impliqués dans le relais des informations sensorielles. En revanche, les noyaux thalamiques non-spécifiques, impliqués dans la transmission d'informations contextuelles, sont des cibles privilégiées des neurones à orexine.

Mes résultats suggèrent donc que, à l'échelle du rythme circadien, l'orexine agi-

rait principalement via une augmentation de l'excitabilité des couches impliquées dans l'intégration de signaux contextuels plutôt que par la prise en compte d'entrées sensorielles précises. De façon originale, la couche VIb agirait alors comme un relais des informations contextuelles, relais qui serait modulé par l'orexine. Finalement, les neurones à orexine étant situés dans l'hypothalamus latéral, une région impliquée dans le contrôle endocrinien et autonome, on pourrait spéculer que l'orexine favoriserait l'intégration de signaux sur l'état interne de l'animal, stress, faim, etc. plutôt que sur le contexte environnemental.

Transmission nicotinique biphasique

Je me suis également intéressée à la transmission nicotinique dans le néocortex. Mes travaux ainsi que ceux de l'équipe de S. Hestrin sur les courants nicotiques endogènes (Arroyo et al., 2012, Bennett et al., 2012 et publication 3), tout comme des travaux antérieurs utilisant des applications d'agonistes nicotiques (Christophe et al., 2002, Kassam et al., 2008, Porter et al., 1999) ont mis en évidence la rapidité de la transmission nicotinique dans le néocortex. Cette transmission est sous-tendue par l'activation de récepteurs ionotropiques aux cinétiques rapides. Mes résultats ont permis de montrer que tant en couche I qu'en couche VI, la transmission nicotinique est soutenue par une synapse.

Pourtant, le dosage de l'acétylcholine dans le néocortex montre qu'à l'instar de l'orexine la libération d'acétylcholine suit le rythme circadien avec un fort taux d'acétylcholine libéré pendant l'éveil et le sommeil non-REM et une libération très faible pendant le sommeil REM. À cette rythmicité circadienne se superposent des pics de libération d'acétylcholine ainsi qu'une activité augmentée des neurones cholinergiques pendant les périodes d'attention (Jasper and Tessier, 1971). Pour détecter les variations d'acétylcholine, les techniques principalement utilisées se basent sur la mesure de la concentration extra-synaptique en acétylcholine soit par prélèvement de fluide cérébral soit par micro-dialyse (Persike et al., 2010, Paolone et al., 2013). Ces méthodes mesurent donc l'acétylcholine issue du *spill-over* ou libérée par les varicosités libres, mais ne permettent pas la détection de la libération d'acétylcholine lors d'événements synaptiques (Persike et al., 2010, Paolone et al., 2013). Comment peut-on dès lors concilier les échelles de temps synaptique et circadienne qui semblent être mises en jeu dans le cadre de la modulation nicotinique ?

Mes résultats montrent que la stimulation unitaire des fibres cholinergiques entraîne une libération rapide et brève d'acétylcholine qui se traduit par une activation brève des neurones corticaux. Cette stimulation est suffisante pour induire le déclenchement d'un potentiel d'action dans la cellule cible mais n'entraîne pas d'activation tonique de la cellule à l'inverse de ce qu'on peut observer dans la mo-

dulation orexinergique. De plus, la libération synaptique suppose une libération des neurotransmetteurs dans un espace restreint ce qui limite l'excitation des cellules adjacentes et les variations de concentration d'acétylcholine dans la matrice intercellulaire. La stimulation phasique des fibres cholinergiques ne peut donc expliquer les variations circadiennes de la concentration d'acétylcholine observées en micro-dialyse.

En revanche, la stimulation tonique des fibres, dans notre cas 10 Hz pendant 5 secondes, entraîne le développement d'un courant tonique d'acétylcholine, qui persiste en présence d'antagonistes muscariniques. Ce courant est dû à l'activation de récepteurs synaptiques et extra-synaptiques, qui sont activés par le *spill-over* d'acétylcholine. Cette acétylcholine libérée par la stimulation tonique des fibres pourrait être celle détectée par micro-dialyse. L'activation tonique des neurones cholinergiques à différentes fréquences permettrait alors d'expliquer les variations d'acétylcholine au cours du cycle circadien ou pendant les périodes d'activité de la souris.

Ces résultats indiquent donc une bi-modalité de la transmission nicotinique avec d'une part, lors d'une activation phasique, un signal relativement bref et précis dans le temps passant par une transmission synaptique, et d'autre part, lors d'une activation tonique, le développement d'un courant nicotinique tonique qui peut être mesuré par micro-dialyse. Mais on peut alors se demander si la libération phasique d'acétylcholine a un sens physiologique.

Un argument qui permet d'accréditer la thèse d'une libération phasique physiologique est la présence au sein de la synapse de récepteurs homomériques $\alpha 7$. Ces récepteurs ont des cinétiques de désensibilisation qui semblent très rapide et ne pourraient pas être activés pendant une stimulation tonique des neurones cholinergiques. Cette transmission très rapide n'est pas cohérente avec l'implication de l'acétylcholine dans la modulation des états d'éveil. Mais on pourrait envisager que la libération phasique serait impliquée dans le transfert d'informations contextuelles plus liées à des changements rapides de situation environnementale. Ceci serait cohérent avec l'expression de récepteurs $\alpha 7$ dans les pyramides de la couche V du mPFC, dont on a vu au cours de l'introduction qu'elle pouvait entrer dans des régimes d'activité persistante lors de tâches de mémoire de travail requérant ponctuellement un haut niveau d'attention (Funahashi et al., 1989, Goldman-Rakic, 1995, Poorthuis et al., 2013). Cependant, dans les autres couches corticales, cette sous-unité n'est exprimée que par des interneurons GABAergiques avec une expression ubiquitaire dans les interneurons de la couche I et de façon plus spécifique dans les interneurons à VIP de la couche II/III et VI (Christophe et al., 2002, Arroyo et al., 2012, Bennett et al., 2012 et Publications 2 et 3). L'excitation phasique des interneurons pourrait induire la désynchronisation du réseau cortical mis en évidence lors des processus nécessitant un haut niveau d'attention. Les courants

GABAergiques ayant une cinétique de *decay* plus lente que les courants $\alpha 7$, ils pourraient contre-balancer les cinétiques très rapides des courants $\alpha 7$, mais cela reste très spéculatif.

On pourrait donc envisager que la transmission synaptique puisse agir via ces deux mécanismes sur deux modalités cognitives : d'une part une libération tonique impliquée dans les processus lents comme la modulation du rythme circadien, et d'autre part une stimulation couplant épisodes toniques et phasiques agissant en particulier sur les interneurons GABAergiques et impliquée dans la désynchronisation des réseaux corticaux observée lors des tâches requérant un niveau d'attention élevé.

Transmission glutamatergique thalamocorticale

Enfin, mes travaux ont porté sur les effets d'une stimulation du thalamus non-spécifique sur le réseau cortical. Le thalamus non-spécifique est considéré comme le pendant rostral de l'ARAS, une région du mésencéphale comprenant les noyaux cholinergiques pontins dont la stimulation électrique promeut l'éveil (Moruzzi and Magoun, 1949). En effet, une stimulation électrique des noyaux du thalamus non-spécifique induit une désynchronisation des oscillations corticales, signature de l'éveil. Cependant, le patron de décharge des neurones du thalamus non-spécifique dans les différentes phases du cycle veille-sommeil et donc son impact sur le réseau cortical restent totalement inconnus. De plus, contrairement aux deux modes de modulations précédentes, cette transmission est glutamatergique. Or le glutamate est un neurotransmetteur très rapide dont l'implication dans la gestion des états d'éveil reste peu étudiée.

Pourtant cette transmission permet, elle aussi, de moduler l'activité corticale via une activation particulière du réseau cortical. En effet, mes travaux ont montré que le faible recrutement des interneurons FS permet une activation prolongée du réseau cortical. Le recrutement préférentiel des interneurons Ad au détriment des interneurons FS peut paraître anecdotique au premier abord. En effet, le décalage de l'inhibition que j'observe n'est que de 4 ms par rapport à l'inhibition antérograde due à l'activation des FS. Cependant, elle a des conséquences fondamentales sur la dynamique du réseau puisqu'elle autorise la sommation des EPSCs et donc l'émission de potentiels d'action dans une large fenêtre de temps. La durée de l'activation induite par la stimulation du Rh serait donc de l'ordre de la centaine de millisecondes. Or ces échelles de temps sont celles observées lors de processus nécessitant un haut niveau d'attention.

Nous avons donc, dans le cas du thalamus non-spécifique, une transmission glutamatergique pouvant induire une activation prolongée du néocortex. Ce n'est pas la transmission par elle-même qui permet de générer un signal prolongé mais la

structure de l'organisation du réseau cortical et la sélectivité des entrées thalamo-corticales. Ces activations glutamatergiques permettent une modulation à l'échelle de la seconde des processus d'éveil qui cible de façon privilégiée les aires corticales associatives.

2 | Quelques réflexions sur l'existence d'une synapse nicotinique dans le cortex

La controverse sur la synapse nicotinique dans le SNC anime les anatomistes et les physiologistes depuis plusieurs décennies. L'existence d'une synapse nicotinique a été clairement établie au niveau du ganglion ciliaire du poulet ainsi qu'à la synapse entre le motoneurone et la cellule de Renshaw (Chen et al., 2001, Lamotte d'Incamps and Ascher, 2008, Lamotte d'Incamps et al., 2012) mais elle est encore remise en doute dans le cerveau. En effet, si la microscopie électronique permet l'observation de différenciations synaptiques, la proportion de varicosités impliquée dans une synapse varie beaucoup entre les études. De plus, l'absence d'anticorps spécifique pour les sous-unités nicotiniques interdit d'affirmer formellement la présence de ces récepteurs au sein d'une synapse. Enfin, jusqu'à récemment, il n'existait pas de méthode de stimulation sélective des fibres cholinergiques, la stimulation électrique des fibres de la couche I permettant d'enregistrer la résultante d'une libération d'acétylcholine dans le cortex mais pas les courants nicotiniques directement (Lucas-Meunier et al., 2009, Amar et al., 2010). L'avènement des outils d'optogénétique qui permettent une stimulation spécifique des fibres cholinergiques a permis de surpasser cette difficulté technique et de relancer le débat de l'existence de la synapse.

Anatomie des varicosités cholinergiques

La présence de différenciations synaptiques a été observée en microscopie électronique dans le cortex pariétal par plusieurs groupes (Umbriaco et al., 1994, Mrzljak et al., 1995, Mechawar et al., 2002, Turrini et al., 2001). Les premières études révèlent un taux très faible, 10 à 15 %, de différenciations synaptiques au niveau des varicosités cholinergiques dans le cortex du rat (Umbriaco et al., 1994). L'existence de 85 % de varicosités cholinergiques libres semble indiquer que la modulation

cholinergique dans le cortex est principalement soutenue par de la transmission volumique (Descarries, 1998). Cependant, une autre étude suggère la présence de différenciations synaptiques sur 67 % des varicosités dans les couches I/II du lobe temporal humain (Figure IV.1 et Smiley et al., 1997). Plus récemment, l'amélioration des techniques de fixation et d'enrobage pour la microscopie électronique a permis de réviser la proportion de varicosités impliquée dans une synapse chez le rat, et ainsi il semblerait qu'à l'instar des études menées chez l'Homme, environ 65 % des varicosités présenteraient des différenciations synaptiques (Turrini et al., 2001). L'ensemble de ces données suggère donc qu'au moins une partie de la transmission nicotinique est synaptique.

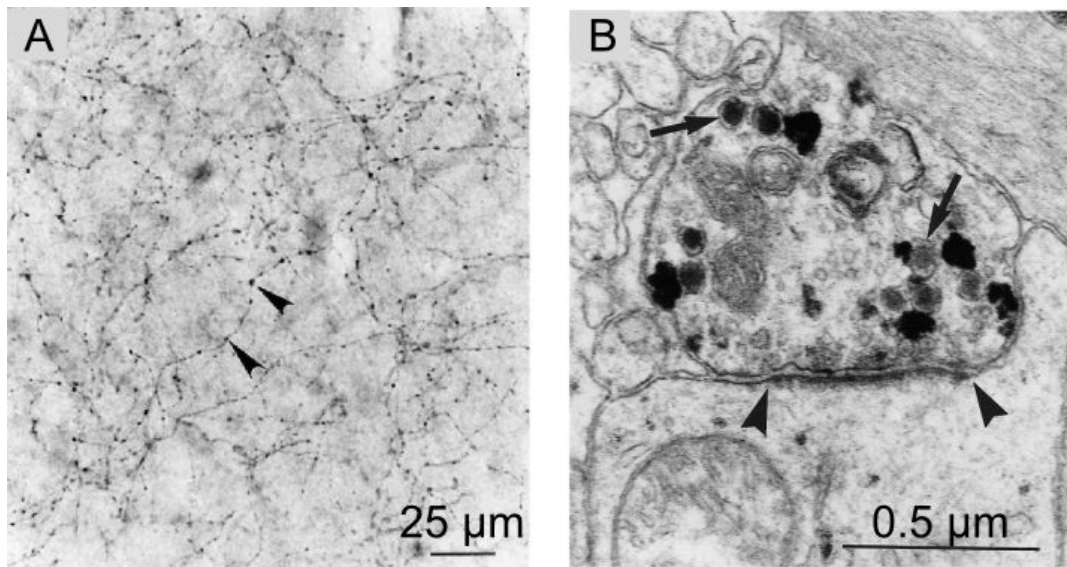


FIGURE IV.1 – Synapse nicotinique vue en microscopie électronique. **A.** Vue des couches I/II du cortex temporal humain. Marquage ChAT, les flèches indiquent les varicosités. **B** Synapse nicotinique sur une section fine en microscopie électronique. *Adapté de Smiley et al., 1997.*

Cependant les études de microscopie électronique ne permettent pas de distinguer si les synapses présentent des récepteurs nicotiniques ou muscariniques. Les marquages immunohistochimiques indiquent que les récepteurs muscariniques sont présents à la fois à l'intérieur et hors des différenciations synaptiques (Mrzljak et al., 1993, Csaba et al., 2013). En revanche, l'absence d'anticorps spécifique pour les différentes sous-unités nicotiniques ne permet pas d'observer la localisation subcellulaire des récepteurs nicotiniques.

Apports des outils d'optogénétiques pour l'étude de la synapse nicotinique

L'étude des courants nicotiques dans le néocortex s'est principalement basée sur l'application pharmacologique d'agonistes nicotiques. Si cette technique permet de mettre en évidence l'existence conjointe de courants présentant des cinétiques différentes, elle ne permet pas de répondre à la question de l'existence de la synapse. Le développement des outils d'optogénétique permet de surmonter cette difficulté technique. Plusieurs équipes ont ainsi cherché à déterminer le mode de libération de l'acétylcholine dans les différentes aires cérébrales (Arroyo et al., 2012, Bennett et al., 2012, Sun et al., 2013 et publication 3). Dans le cadre de ma thèse, je me suis principalement intéressée au néocortex.

Alors que j'étais en train d'achever mon étude de comparaison des courants nicotiques synaptiques en couche I et VI, Shaul Hestrin et son équipe ont publié successivement deux études sur les courants nicotiques induits par photostimulation des fibres cholinergiques en couche I. Leurs résultats suggèrent que les courants soutenus par l'ouverture du récepteur $\alpha 7$ sont synaptiques tandis que les courants soutenus par les récepteurs $\alpha 4\beta 2$ seraient volumiques (Arroyo et al., 2012, Bennett et al., 2012). Plusieurs arguments suggèrent néanmoins que la transmission $\alpha 4\beta 2$ pourrait être également de nature synaptique.

Stabilité des courants $\alpha 4\beta 2$ et variabilité des courants $\alpha 7$

Un argument fort de la démonstration de S. Hestrin est la stabilité des courants $\alpha 4\beta 2$ au cours des stimulations successives alors que les courants $\alpha 7$ présentent une large variabilité. Cette observation est discutée par S. Hestrin de deux façons.

D'une part, il suggère que cette différence de comportement est une preuve de la séparation spatiale des deux types de récepteurs car dans son hypothèse elle serait due à un mécanisme pré-synaptique : les deux réservoirs putatifs de vésicules n'auraient pas la même probabilité de relargage des vésicules. Cependant, en se basant sur la concentration présumée en acétylcholine au sein de la synapse, déterminée par application pharmacologique en configuration *outside out* par le groupe de S. Hestrin (Bennett et al., 2012), et sur les affinités différentielles des récepteurs $\alpha 4\beta 2$ et $\alpha 7$, on observe qu'à cette concentration les récepteurs $\alpha 4\beta 2$ sont saturés alors que les récepteurs $\alpha 7$ sont à 20 % de saturation. Par conséquent, la libération synaptique d'acétylcholine entraînerait la saturation des récepteurs $\alpha 4\beta 2$ alors que les récepteurs $\alpha 7$ ne seraient que partiellement occupés. Mes analyses de bruit non-stationnaires confirment qu'en couche VI, l'activation des fibres cholinergiques entraîne la saturation de ces récepteurs (Publication 3). La différence de comportement des deux courants est donc au contraire très cohérente

avec l'hypothèse d'une activation par le même *pool* de vésicules synaptiques.

D'autre part, S. Hestrin interprète de façon très légitime la stabilité des courants $\alpha 4\beta 2$ en affirmant que cette stabilité est due à une libération multiquantale de vésicules cholinergiques, c'est-à-dire, une libération de plusieurs varicosités situées à distance des récepteurs $\alpha 4\beta 2$ (Bennett et al., 2012). En effet, dans cette hypothèse, l'amplitude des courants $\alpha 4\beta 2$ est nécessairement tamponnée par le grand nombre de vésicules cholinergiques libérées. Cependant, en me basant sur les données de S. Hestrin ainsi que sur les EC50 des courants $\alpha 7$ et $\alpha 4\beta 2$ mesurés en système hétérologue, je suggérais que la concentration en acétylcholine supposée au sein de la synapse était saturante pour les récepteurs $\alpha 4\beta 2$ alors que la probabilité d'ouverture des canaux $\alpha 7$ n'est que de 20% à cette concentration. Afin d'étayer cette observation, j'ai entre temps effectué une analyse de bruit non-stationnaire sur les courants $\alpha 4\beta 2$ que j'ai enregistrés. Cette analyse indique qu'une stimulation unique des fibres cholinergiques sature le *pool* de récepteurs $\alpha 4\beta 2$, confirmant que la faible variabilité des courants $\alpha 4\beta 2$ est due non à une concentration en acétylcholine constante d'une stimulation à l'autre mais plutôt à une saturation des récepteurs synaptiques dans nos conditions de stimulation.

Interprétation des données anatomiques en couche I

Les travaux de S. Hestrin ont été effectués uniquement sur les interneurons de la couche I (Bennett et al., 2012). Or dans son hypothèse, la présence de 15-60% de différenciations synaptiques au niveau des varicosités cholinergiques s'explique par l'existence d'une synapse pour les courants soutenus par $\alpha 7$. Les courants $\alpha 4\beta 2$ seraient alors induits par la libération de vésicules contenues dans les varicosités cholinergiques libres. Cependant, les données de déconvolution 3D des images de microscopie confocale obtenues par Ludovic Tricoire suggèrent l'existence d'appositions proches entre les dendrites des pyramides de la couche VI et les varicosités cholinergiques. Les neurones excitateurs de la couche VI n'expriment pas $\alpha 7$ comme nous l'avons montré par scPCR (Publication 2) et par photostimulation des fibres cholinergiques (Publication 3). Par conséquent, on peut légitimement supposer que ces appositions qui sont probablement des synapses sont la base structurelle de la transmission $\alpha 4\beta 2$ dans la couche VI.

Préservation des courants en stimulation minimale

Un argument supplémentaire en faveur d'une transmission synaptique est la préservation de courants nicotiques discriminés en condition de stimulation minimale. Dans leur article sur la transmission $\alpha 4\beta 2$ dans le NRT, Beierlein et son équipe se placent en condition de stimulation minimale des fibres cholinergiques

dans le paradigme classique de la stimulation électrique (Sun et al., 2013). Ils observent alors des réponses en "tout ou rien" avec un taux d'échec de 50 %, suggérant fortement une transmission synaptique. Dans le cortex, la stimulation électrique est impossible du fait du caractère diffus du réseau de fibres cholinergiques, nous avons donc choisi de diminuer la probabilité de libération en combinant une augmentation de la concentration de Mg^{2+} et une diminution de celle en Ca^{2+} extracellulaires. Dans ces conditions, j'observe de la même façon que Sun et collaborateurs une diminution de la probabilité de libération des vésicules tout en conservant la cinétique des courants nicotiques, suggérant une libération synaptique des vésicules d'acétylcholine.

cinétique des courants $\alpha 4\beta 2$

Enfin, un dernier argument avancé par S. Hestrin pour étayer sa démonstration est la très lente constante de *decay* du courant synaptique. En effet, les courants $\alpha 4\beta 2$ ont une constante de temps qui varie de 100 à 300 ms dans les différentes structures où les courants nicotiques $\alpha 4\beta 2$ induits par photostimulation des fibres cholinergiques ont été enregistrés (Bell et al., 2011, Ren et al., 2011, Arroyo et al., 2012, Bennett et al., 2012, Leão et al., 2012, Sun et al., 2013). Pour S. Hestrin, ce long *decay* s'explique par la dégradation progressive de l'acétylcholine qui éteint peu à peu le signal. Cependant, ces constantes sont comparables à celles mesurées pour les courants NMDA ou pour certains courants GABA_A. De plus, la lenteur du retour des courants $\alpha 4\beta 2$ peut s'expliquer facilement par l'expression au sein de la synapse de l'isoforme HS du récepteur $\alpha 4\beta 2$ (Nelson et al., 2003, Moroni et al., 2006).

Conclusion

En conclusion, sur la base de mes résultats, je propose que le modèle de transmission synaptique, où les récepteurs $\alpha 7$ sont synaptiques et les récepteurs $\alpha 4\beta 2$ extra-synaptiques, proposé par S. Hestrin soit remplacé par un modèle plus nuancé avec des récepteurs $\alpha 7$ dans la fente synaptique et la présence de récepteurs $\alpha 4\beta 2$ à la fois dans la fente et en extra-synaptique. Dans ces conditions, l'activation phasique des fibres cholinergiques induirait une réponse transitoire dans les neurones corticaux connectés synaptiquement tandis qu'une activation tonique des fibres permettrait le *spill-over* d'acétylcholine et donc à la fois une activation tonique du neurone cible mais aussi peut-être une activation des neurones adjacents.

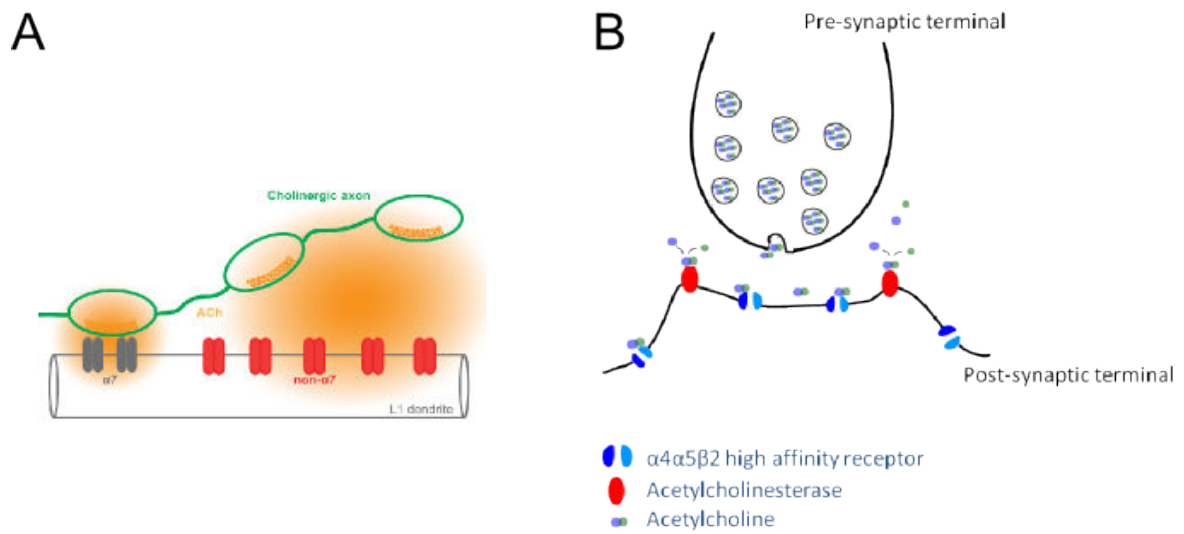


FIGURE IV.2 – Deux modèles de transmission nicotinique dans le néocortex. **A.** Modèle de l'équipe de S. Hestrin avec une transmission $\alpha 7$ synaptique et une transmission $\alpha 4 \beta 2$ volumique. *D'après Bennett et al., 2012.* **B.** Modèle d'une transmission synaptique mixte et d'une transmission volumique médiée par les récepteurs $\alpha 4 \beta 2$. *D'après Publication 3.*

3 | Rhomboïde, activités persistantes et mémoire

Comme je l'ai indiqué au cours de l'introduction (voir chapitre 3), le complexe Re/Rh est impliqué dans différents processus mnésiques : mémoire de travail ou mémoire à long terme. Ces processus impliquent la genèse d'activités persistantes, qui peuvent être induites par différents mécanismes et sont entretenues par les entrées synaptiques et par le réseau cortical (voir chapitre 2). Mes travaux ont montré que les entrées du Rh dans le pariétal induisent une activation prolongée du réseau cortical (Publication 1). Ces travaux suggèrent que le complexe Re/Rh pourrait induire directement des activations persistantes dans le néocortex et ainsi participer de façon active à la mise en place de traces mnésiques.

Mémoire de travail et mémoire à long terme

Comme nous l'avons vu précédemment, la mémoire de travail est le substrat qui permet de faire le lien entre les événements passés et l'action en cours. Par exemple, elle est essentielle dans tous les processus linguistiques où elle permet de comprendre et construire une phrase. Elle est également nécessaire à tous les processus de calcul mental, de musique ou pour planifier une action (Goldman-Rakic, 1995). La mémoire de travail permet de garder en stockage temporaire des informations qui vont être très vite utilisées par exemple pour prendre une décision comportementale. Ces informations à court terme sont généralement stockées sous la forme de réseaux de neurones activés de façon persistantes qui sont localisés soit au niveau de l'hippocampe soit dans le mPFC (Funahashi et al., 1989).

Le stockage d'informations à long terme nécessite le transfert de ces informations du mPFC ou de l'hippocampe vers d'autres aires corticales associatives comme le cortex pariétal. Ce processus passe par la consolidation du souvenir qui se déroule en dehors de la sollicitation active de ce souvenir. Cette consolidation, qui a lieu principalement pendant le sommeil, passe par une réactivation, dans un premier temps des connexions entre le mPFC et l'hippocampe, puis entre les

différents cortex. La consolidation des connexions met en jeu des phénomènes de plasticité des synapses. De façon schématique, le renforcement d'une connexion passe par un phénomène de plasticité à long terme qui est induit par la stimulation répétée de la synapse. Ce phénomène implique donc à nouveau la capacité à induire des activités de longue durée dans les aires corticales mises en jeu lors de la consolidation.

Réseau cortical et activités persistantes

Les enregistrements chez le singe éveillé montrent que lorsque celui effectue une tâche comportementale impliquant l'utilisation de la mémoire de travail les neurones pyramidaux du mPFC peuvent entrer dans un régime d'activité persistante (Funahashi et al., 1989). Ces activités persistantes sont donc supposées être le substrat cellulaire de la mémoire de travail. Différentes études ont cherché à comprendre comment les activités persistantes sont générées et entretenues. Les principales hypothèses sont la neuromodulation, en particulier muscarinique, ou les propriétés intrinsèques du réseau cortical (Fraser and MacVicar, 1996, Haj-Dahmane and Andrade, 1996, 1998, Egorov et al., 2002). La modulation muscarinique semble au premier abord un candidat intéressant, en effet, les périodes de haut niveau attentionnel sont corrélées à une libération importante d'acétylcholine. Néanmoins, les mêmes enregistrements chez le singe éveillé montre que la décharge persistante des neurones pyramidaux présente une sélectivité, par exemple dans le cas présent, une sélectivité à l'angle du stimulus visuel. Or la modulation muscarinique n'est pas sélective puisque ces récepteurs sont principalement extra-synaptiques et sont donc activés par transmission volumique. L'hypothèse de réseau semble autoriser la sélectivité grâce à la sélectivité des connexions. Cependant, cette hypothèse est difficile à tester et les principales études cherchant à évaluer l'impact du réseau sur la génération des activités persistantes sont des études de modélisation. Ces études se basent principalement sur des modèles corticaux comprenant un type d'interneurone GABAergique de type FS et une population pyramidale excitatrice qui représente environ 80 % des neurones. Ces études suggèrent qu'un ratio de récepteurs AMPA/NMDA précis permet la génération d'activités persistantes (Lisman et al., 1998, Wang, 2001). Néanmoins, ces études ne prennent pas en compte la diversité cellulaire observée dans le néocortex, qui nous l'avons vu dans l'étude du Rh (Publication 1), peut jouer un rôle critique dans l'activation récurrente du réseau cortical.

les activités prolongées induites par le Rh peuvent-elles être le substrat de la mémoire ?

Les études de lésion ou d'inactivation du complexe Re/Rh suggèrent que ces noyaux sont indispensables au dialogue entre le mPFC et l'hippocampe, deux structures nécessaires au stockage de la mémoire de travail et à la sollicitation d'informations stockées dans d'autres aires et nécessaires à la réalisation d'une tâche.

Plusieurs arguments viennent étayer ces conclusions. D'un point de vue anatomique, le complexe Re/Rh est la principale voie directe entre le mPFC et l'hippocampe avec lesquels il a des connexions réciproques (Vertes, 2006). De plus, le Rh envoie des projections massives vers le cortex pariétal. Le complexe Re/Rh est donc central dans le dialogue entre ces structures (Cholvin et al., 2013). D'autre part, le marquage c-FOS indique que la sollicitation d'un souvenir ancien entraîne une activation forte des neurones du complexe Re/Rh (Loureiro et al., 2012). Enfin, des données récentes de marquage c-FOS indiquent que l'inactivation du complexe Re/Rh empêche le transfert de mémoire vers le cortex pariétal.

Mes données montrent que le Rh permet de générer des activités prolongées dans le cortex pariétal. Ces activités ne sont pas le fruit d'une neuromodulation mais sont dues à une activation spécifique de deux populations neuronales. Ce type d'activation de réseau n'avait pas été envisagée par la modélisation qui se limite généralement à des réseaux de neurones ne comportant que deux populations de neurones. Or dans cette étude, nous montrons que le Rh évite les interneurons de type FS. Ces interneurons sont impliqués dans le phénomène d'inhibition antérograde qui empêche l'activation récurrente du réseau cortical (Swadlow, 2003, Cruikshank et al., 2007). Le fait que ces interneurons sont exclus de la régulation de l'arrivée des entrées du Rh dans un premier temps autorise la mise en place d'une première boucle de réverbération, contrairement à ce qui est observé au niveau du cortex somatosensoriel pour les entrées du thalamus spécifique. Les entrées du Rh ont donc les propriétés nécessaires à la mise en place d'activités persistantes et pourraient par conséquent être le substrat de la mémoire.

Néanmoins, comme nous l'avons mentionné dans la première partie de cette discussion, les activations toniques ne sont pas forcément synonymes de mémoire. En effet, les activations toniques sont également la base des phénomènes d'éveil cortical, car elles permettent d'augmenter l'excitabilité du réseau. On pourrait donc imaginer que l'activation prolongée induite par la stimulation du Rh permet une augmentation de l'excitabilité du réseau. Or la formation de traces mnésiques ainsi que leur sollicitation requérant un niveau d'attention élevé, la stimulation du Rh serait nécessaire pour atteindre un niveau d'excitabilité suffisant à leur mise en œuvre. Le débat reste donc encore ouvert sur le rôle exact du Rh : promoteur

d'éveil cortical ou acteur de la formation de traces mnémoniques. Finalement, en montrant que le Rh pouvait induire des activités persistantes marqueurs de l'éveil comme de la mémoire, je n'ai pu que confirmer que les deux hypothèses sont plausibles...

4 | Conclusion générale et perspectives

L'éveil cortical ne peut être réduit à un concept homogène mais doit être considéré comme un ensemble d'états complexes et gradués. Il existe plusieurs niveaux d'éveil et d'attention qui sont modulés par différentes structures mettant en jeu des échelles de temps différentes. De plus, les niveaux d'éveil sont indissociables de la capacité du cortex cérébral à induire la formation de traces mnémoniques. Au cours de ma thèse, j'ai pu aborder trois de ces modulations et j'ai contribué à mettre en évidence comment chacune, par son mécanisme d'action et ses cibles cellulaires corticales, module l'activité corticale. Il me semble important de retenir de l'ensemble de ces travaux que le type cellulaire et la couche corticale ciblée par les différentes structures joue un rôle primordiale dans la modulation de la dynamique corticale, ce qui semble indiquer le cortex possède intrinsèquement l'architecture permettant l'entretien de l'éveil.

Néanmoins, ces travaux ont été réalisés sur le modèle de la tranche qui ne permet d'accéder qu'à un cortex sans activité basale. Ces hypothèses doivent donc être confirmées par un travail chez l'animal entier dont le cortex présente des activités de réseau qui dépendent de l'état d'éveil. En effet, comme nous l'avons abordé brièvement au cours de ce manuscrit, les états d'éveil corticaux sont caractérisés par des oscillations dont la fréquence dépend du niveau d'attention : oscillations lentes et amples pour le sommeil profond, rythme α (5 – 12 Hz) pour l'éveil passif et enfin rythmes γ et θ (20 – 40 Hz) pour l'éveil actif. Il serait donc intéressant de chercher à comprendre les effets de l'activation du thalamus non-spécifique sur l'induction et l'entretien des rythmes corticaux. De plus, l'activation du thalamus non-spécifique en fonction des états d'éveil ou au cours d'une tâche comportementale est encore très mal connue, il pourrait être intéressant d'enregistrer son activité afin de mieux comprendre son rôle physiologique.

Cinquième partie

**Annexe 1 : Validation des modèles
de souris et rats transgéniques et
des vecteurs d'expression viraux
pour Philippe Faure et Uwe Maskos**

1 | Introduction

L'aire tegmentale ventrale (VTA) et la substance noire compacte (SNc) sont les deux principaux noyaux dopaminergiques du mésencéphale (Dahlström and Fuxe, 1964). La VTA est impliquée dans les processus d'encodage de valeurs de gain, de motivation et de récompense. Elle est souvent considérée comme le siège de la mise en place et du maintien des addictions via un biais de la valeur de récompense (Wise, 2004). De plus, la plupart des drogues entraînent une modification de l'activité basale des neurones de la VTA. C'est en particulier le cas pour la nicotine qui agit directement via les récepteurs nicotiques exprimés par les neurones de la VTA (Maskos, 2008).

La VTA est composée de deux types neuronaux principaux : des neurones dopaminergiques de projection et des interneurons GABAergiques locaux. Les neurones dopaminergiques projettent dans de nombreuses structures cérébrales dont le striatum et le cortex préfrontal.

La libération de dopamine dans les régions cibles dépend fortement du mode de décharge des neurones dopaminergiques. Ces neurones présentent en effet un mode de décharge tonique de fréquence assez faible (~ 3 Hz) et un mode de décharge phasique en bouffée de potentiel d'action. Il a été montré que lors de la décharge tonique, très peu de dopamine est libérée dans le striatum, alors que l'émission de bouffées de potentiels d'action permet la libération de quantité importante de dopamine dans le striatum et le mPFC. Or le taux de dopamine libéré conditionne la valeur motivationnelle de l'action. Les mécanismes permettant l'émission de bouffées de potentiels d'action par les neurones dopaminergiques est par conséquent une problématique très importante. Or les drogues, comme la nicotine, agissent à la fois sur la décharge tonique mais aussi sur l'émission de bouffées de potentiels d'action, il est donc essentiel de comprendre leur mode de fonctionnement et l'impact sur le réseau de la VTA.

Les neurones de la VTA et ceux qui projettent vers la VTA expriment une large variété de récepteurs nicotiques. En particulier, les neurones dopaminergiques et GABAergiques expriment la sous-unité $\beta 2$ et les neurones dopaminergiques expriment également la sous-unité accessoire $\alpha 5$. De plus, on retrouve sur les terminaisons glutamatergiques le récepteur homomérique $\alpha 7$. Il existe donc

plusieurs voies sur lesquelles la nicotine peut agir pour influencer la dynamique des neurones dopaminergiques. Effectivement, les enregistrements *in vivo* de neurones dopaminergiques montrent un déséquilibre de la balance train/bouffée de potentiels d'action lors de l'injection intra-veineuse de nicotine chez l'animal WT.

Les travaux menés conjointement par les équipes de P. Faure et U. Maskos cherchent à déterminer l'impact de ses différentes sous-unités nicotiques dans la modulation du réseau neuronal de la VTA et en particulier l'impact sur les différents types de neurones et leur mode de décharge.

Dans une première étude, les équipes de P. Faure et U. Maskos ont cherché à déterminer les contributions des neurones dopaminergiques et GABAergiques dans le genèse des bouffées de potentiels d'action induites par la nicotine. Ils ont d'abord observé que les souris $\beta 2$ KO ne présentent pas d'addiction à la nicotine et que les neurones dopaminergiques et GABAergiques ne sont pas sensibles à la nicotine chez ces souris. Ces résultats suggèrent que la sensibilité à la nicotine est médiée par l'activation somatodendritique des récepteurs $\beta 2$ et non par une activation du réseau neuronal. Puis ils ont cherché à ré-exprimer spécifiquement la sous-unité $\beta 2$ dans les neurones dopaminergiques ou GABAergiques. Les résultats de la ré-expression spécifique montrent que la sensibilité aux agonistes nicotiques des neurones dopaminergiques est nécessaire à leur activation, mais que l'augmentation de décharge de bouffées de potentiels d'action nécessite un modelage de l'activité des neurones dopaminergiques par les neurones GABAergiques (Tolu et al., 2013).

Lors de cette étude, l'équipe de P. Faure a mis en évidence une population de neurones dopaminergiques inhibée par l'injection de nicotine. Le marquage de ces neurones inhibés montre qu'ils sont situés en position médiale tandis que les neurones dopaminergiques excités par la nicotine sont situés dans une région plus latérale de la VTA. De plus, les résultats de l'étude suggèrent que l'inhibition de cette population de neurones est due à une activité de réseau plutôt qu'à une propriété intrinsèque des neurones. Enfin, ils montrent que les neurones excités (respectivement inhibés) par la nicotine sont excités (respectivement inhibés) par l'alcool. Cette propriété ne se retrouve pas avec un stimulus douloureux, suggérant que deux voies différentes mettent en jeu ces deux processus (*Eddine et al., soumis à Journal of Neurosciences*).

Les neurones dopaminergiques de la VTA expriment la sous-unité accessoire $\alpha 5$. L'étude des souris $\alpha 5$ KO montre que cette sous-unité joue un rôle majeur dans la sensibilité nicotinique des neurones dopaminergiques de la VTA. En effet, chez la souris KO, les neurones dopaminergiques ne répondent plus à l'injection de nicotine. Un polymorphisme humain d' $\alpha 5$ D398N induit chez les individus porteurs et fumeurs une consommation de nicotine multipliée par trois par rapport aux non-porteurs de la mutation, qui serait à l'origine d'une incidence plus élevée du cancer du poumon dans cette population. Pour cette étude, une courbe dose-réponse de

la réponse à la nicotine a été effectuée chez des animaux WT, $\alpha 5$ KO, $\alpha 5$ KO réinjecté dans la VTA par un virus contenant une version sauvage de $\alpha 5$ ($\alpha 5$ -VEC) et enfin $\alpha 5$ KO réinjecté dans la VTA par un virus contenant une version de $\alpha 5$ contenant le polymorphisme D398N ($\alpha 5$ -SNP). La courbe dose-réponse montre que les $\alpha 5$ -VEC ont un profil similaire aux WT, que les $\alpha 5$ KO ont une sensibilité très faible et enfin que les $\alpha 5$ -SNP ont un décalage de leur courbe dose-réponse vers des doses beaucoup plus élevées. (Morel et al., 2013).

L'étude du comportement de la souris est limitée par la complexité des tâches cognitives qu'elle peut apprendre. Il devient donc crucial de développer des modèles de rats transgéniques pour permettre une étude plus fine des comportements. De plus, le modèle rat est bien plus proche de l'humain que la souris en particulier en ce qui concerne les rythmes et la modulation cholinergique. Cependant, la manipulation génétique des rats est beaucoup plus ardue que celle des souris car chez les rates, l'état de pseudo-gestation n'existe pas, rendant le transfert d'embryon impossible. Afin de créer une lignée de rat KO pour la sous-unité $\alpha 5$, l'équipe de U. Maskos a donc utilisé une technique dite *zinc finger nuclease*. Cette technique consiste à utiliser une nucléase classique à doigts de zinc qui a été modifiée pour repérer spécifiquement une portion de la séquence du gène codant $\alpha 5$. Cette étude est encore en cours, néanmoins les premiers résultats de sensibilité à la nicotine sont cohérents avec les observations chez la souris. De plus, mes travaux en tranche laissent supposer que cette sensibilité est bien due à un déficit d' $\alpha 5$ dans la VTA plutôt que dans la mHb ou dans le cortex (*Forget et al., en préparation*).

2 | Résultats

Mon travail avec les équipes de P. Faure et U. Maskos a donné lieu à quatre articles de collaboration publiés ou en préparation. Pour ces études, j'ai effectué tous les enregistrements électrophysiologiques en tranche, ainsi que les marquages immunohistochimiques pour la localisation des neurones dopaminergiques enregistrés en tranche pour les articles de R. Eddine et de C. Morel.

Article 1 : Tolu et al., 2013

Co-activation of VTA DA and GABA neurons mediates nicotine reinforcement.

S. Tolu, R. Eddine, F. Marti, V. David, M. Graupner, S. Pons, M. Baudonnat, M. Husson, M. Besson, C. Reperant, J. Zemdegs, C. Pagès, Y.A. Hay, B. Lambolez, J. Caboche, B. Gutkin, A.M. Gardier, J.-P. Changeux, P. Faure and U. Maskos

ORIGINAL ARTICLE

Co-activation of VTA DA and GABA neurons mediates nicotine reinforcement

S Tolu^{1,2,11}, R Eddine^{3,11}, F Marti^{3,11}, V David⁴, M Graupner⁵, S Pons^{1,2}, M Baudonnat⁴, M Husson⁴, M Besson^{1,2}, C Reperant⁶, J Zemdegs⁶, C Pagès⁷, YAH Hay⁸, B Lambolez⁸, J Caboche⁷, B Gutkin⁹, AM Gardier⁶, J-P Changeux^{2,10}, P Faure^{3,11} and U Maskos^{1,2,11}

Smoking is the most important preventable cause of mortality and morbidity worldwide. This nicotine addiction is mediated through the nicotinic acetylcholine receptor (nAChR), expressed on most neurons, and also many other organs in the body. Even within the ventral tegmental area (VTA), the key brain area responsible for the reinforcing properties of all drugs of abuse, nicotine acts on several different cell types and afferents. Identifying the precise action of nicotine on this microcircuit, *in vivo*, is important to understand reinforcement, and finally to develop efficient smoking cessation treatments. We used a novel lentiviral system to re-express exclusively high-affinity nAChRs on either dopaminergic (DAergic) or γ -aminobutyric acid-releasing (GABAergic) neurons, or both, in the VTA. Using *in vivo* electrophysiology, we show that, contrary to widely accepted models, the activation of GABA neurons in the VTA plays a crucial role in the control of nicotine-elicited DAergic activity. Our results demonstrate that both positive and negative motivational values are transmitted through the dopamine (DA) neuron, but that the concerted activity of DA and GABA systems is necessary for the reinforcing actions of nicotine through burst firing of DA neurons. This work identifies the GABAergic interneuron as a potential target for smoking cessation drug development.

Molecular Psychiatry advance online publication, 3 July 2012; doi:10.1038/mp.2012.83

Keywords: dopamine; GABAergic interneuron; lentiviral vector; nicotine addiction; nicotinic acetylcholine receptor

INTRODUCTION

Tobacco abuse is the worldwide leading cause of preventable morbidity and mortality. According to the World Health Organization, more than five million smokers die every year from the consequences.¹ Dissecting the underlying neurobiological mechanisms of this disorder has recently made important progress with the use of genetically modified mice,² but they remain far from being understood in detail. The identification of novel drug targets for the design of smoking cessation medication is becoming a priority in pharmacological research.³ Nicotine, the principal, if not sole, addictive component of tobacco smoke,⁴ exerts its reinforcing effects through its action on nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs), a heterogeneous family of pentameric, ligand-gated ion channels.⁵ nAChRs situated in the mesolimbic reward system mediate nicotine-induced dopamine (DA) release in the nucleus accumbens (NAc) from midbrain dopaminergic (DAergic) neurons located in the ventral tegmental area (VTA).⁶ Among the different nAChRs expressed in this region, β 2-containing nAChRs (β 2*-nAChRs) have been shown to play a crucial role in the positive rewarding properties of nicotine, as they are the essential partner to form high-affinity receptors.⁷ β 2*-nAChRs are expressed on both DAergic and γ -aminobutyric acid-releasing (GABAergic) interneurons present in the VTA,⁸ and nicotine modulates the activity of both neuronal populations.⁹

Pharmacological studies have addressed the complex and often opposing influences of the DA- and GABA-dependent neural systems,¹⁰ but none of them has yet elucidated the nature of their interaction, that is, whether they cooperate to produce the rewarding effect,^{9,11,12} or mediate, respectively, the acute rewarding and aversive psychological effects of nicotine.¹⁰

The complexity of nicotine's action to result in enhanced DA release has been reviewed recently.^{13,14} Several independent mechanisms have been identified, or postulated. These are enhanced excitation of the DA cells,¹⁵ or their disinhibition, or modification of presynaptic terminals onto the soma of DA neurons. Previous *in vitro* studies proposed that the desensitization of β 2*-nAChRs on GABA interneurons following nicotine exposure, resulting in decreased GABAergic neuron activity, produces a disinhibition of DA neurons, and hence increased presynaptic excitation.^{9,11,16} We have here comprehensively addressed the respective role of β 2*-nAChRs expressed on DA or GABAergic VTA neurons in their response to nicotine, and the behavioral consequences. The work presented is arranged according to the following outline: using *in vivo* electrophysiology of single neurons in the VTA, we found surprisingly that putative GABAergic neurons do not desensitize following repeated nicotine injections as postulated by current models. We then set out to understand the physiological basis of their role in DA neuron

¹Département de Neurosciences, Institut Pasteur, Unité Neurobiologie intégrative des systèmes cholinergiques, Paris, France; ²CNRS, URA2182, Paris, France; ³Université P. et M. Curie, CNRS UMR 7102, Neurobiologie des Processus Adaptatifs, Equipe Neurophysiologie et comportement, Paris, France; ⁴Université de Bordeaux, Institut de Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine, Talence, France; ⁵Center for Neural Science, New York University, New York, NY, USA; ⁶EA3544 Pharmacologie des troubles anxio-dépressifs et Neurogenèse, Univ Paris-Sud, Fac Pharmacie, Châtenay-Malabry, France; ⁷Université P. et M. Curie, INSERM UMRS 952, CNRS UMR 7224, Physiopathologie des Maladies du Système Nerveux Central, Equipe Signalisation Intracellulaire et Neuroadaptations, Paris, France; ⁸Université P. et M. Curie, CNRS UMR 7102, Neurobiologie des Processus Adaptatifs, Equipe Réseau cortical et couplage neurovasculaire, Paris, France; ⁹Group for Neural Theory, LNC INSERM U960, DEC ENS, Paris, France and ¹⁰Collège de France, Paris, France. Correspondence: U Maskos or P Faure, Département de Neurosciences, Institut Pasteur, Unité Neurobiologie intégrative des systèmes cholinergiques, Institut Pasteur, 25 rue du Dr Roux, Cedex 15, Paris 75724, France.

E-mail: umaskos@pasteur.fr or philippe.faure@snv.jussieu.fr

¹¹These authors contributed equally to this work.

Received 5 December 2011; revised 2 May 2012; accepted 7 May 2012

activity. This was achieved by the selective expression of high-affinity nicotinic receptors on either DA or GABAergic interneurons, or both, and the correlation of DA firing patterns with intra-VTA self-administration behavior. We conclude that GABA-dependent burst firing of DA neurons is a crucial element in the reinforcing effect of nicotine.

MATERIALS AND METHODS

Viral production and analysis of transduced VTA cells

Viral production. Viral particles were generated by co-transfection of HEK-293T cells by the vector plasmid, a packaging plasmid and an envelope plasmid using Lipofectamine Plus (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. At 2 days after transfection, viral particles were harvested in the supernatant, treated with DNaseI and MgCl₂, filtered through 0.45 μm pores, concentrated by ultracentrifugation and resuspended in a small volume of phosphate-buffered saline (PBS). Viral stocks were stored in small aliquots at –80 °C before use. Viral titers were estimated by quantification of the p24 capsid protein using HIV-1 p24 antigen immunoassay (ZeptoMetrix Corporation, Buffalo, NY, USA) according to the manufacturer's instructions. Lentivectors were diluted in PBS before stereotaxic injection to achieve a dose corresponding to 230 ng of p24 protein in 2 μl.

Stereotaxic procedure. Mice aged 6–12 weeks were anesthetized using ketamine/xylazine in PBS. A mouse was introduced into a stereotaxic frame adapted for use with mice. Lentivectors (enhanced green fluorescent protein (eGFP)-expressing vector: 2 μl at 50 ng p24 protein per μl; β2-expressing vector: 2 μl at 115 ng p24 protein per μl) were injected bilaterally at: antero-posterior –3.4 mm, lateral ±0.5 mm from Bregma and –4.4 mm from the surface. All procedures were carried out in accordance with European Commission directives 219/1990 and 220/1990, and approved by Animalerie centrale and Médecine du travail, Institut Pasteur. The authors carrying out surgery hold an Animal Surgery Authorization from the French Ministry of Agriculture.

Analysis of transduced VTA cells

Immunostaining. To analyze eGFP and mCherry transduction on DAergic and GABAergic neurons, sections from vectorized DAT-Cre and GAD67-Cre mice were stained for tyrosine hydroxylase (TH) antibody. Fluorescence immunohistochemistry was performed as follows: free-floating VTA brain sections were incubated 1 h at 4 °C in a fixative solution of PBS containing 10% normal goat serum (Sigma, Lyon, France) and 0.2% Triton X-100, and then overnight at 4 °C in PBS containing a mouse anti-TH (Sigma) at 1:200 dilution, 2% normal goat serum and 0.2% Triton X-100. The next day, sections were rinsed with PBS and then incubated 3 h at room temperature with secondary antibody (Cy5-conjugated anti-mouse, Jackson Immuno-research, London, UK) at 1:200 dilution in a solution of 2% normal goat serum in PBS. After three rinses in PBS, slices were wet-mounted using Mowiol 4-88 (Calbiochem Corporation, La Jolla, CA, USA).

Cell counting by image analysis. Anti-TH-immunostained sections from DAT-Cre mice were imaged at ×25, ×40 and ×63 with a Zeiss LSM510 confocal laser scanning microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). A quantitative analysis of transduced neurons was performed automatically with the software identifying spot positions using a statistical analysis of the multiscale decomposition of the image. The program (QUIA; <http://www.bioimageanalysis.org>) detects nuclei (Cre-positive cells) by first filtering the image with an undecimated wavelet at different scales and then thresholding it with a statistical procedure,^{17,18} which takes into account the noise level. To perform colocalization, we computed for each pixel of each detection the number of corresponding pixels in the green channel (eGFP-positive cells), considering a fixed threshold. The detection is labeled as colocalized if the number of green pixels reaches 50% of the area of the nuclei. For phosphorylated-extracellular signal-regulated kinase (P-ERK) immunostaining, quantifications were performed using the image analyzer software (Image-Pro Plus; Media Cybernetics, Silver Spring, MD,

USA), taking into account the cells with nuclear immunofluorescence above the background.

Determination of the efficiency of DA cell transduction

The percentage of transduced TH-positive neurons in vectorized DAT-Cre mice was quantified on one of every three sections for each mouse. This results in 73 ± 12% of DA neurons being transduced.

Epibatidine binding studies

The β^{-/-}, β2^{-/-} × DAT-Cre and β2^{-/-} × GAD-Cre mice aged 12–13 weeks were injected bilaterally in the VTA. After 4 weeks of viral expression, brains were dissected, frozen in dry ice and stored at –80 °C until use. Coronal sections, 20-μm thick, were cut at –20 °C and thaw mounted on Menzel Glasser SuperFrost Plus microscope slides. Slides were incubated at room temperature with 220 pM [¹²⁵I]-epibatidine (NEN Perkin-Elmer, Boston, MA, USA; specific activity 2200 Ci/mmol) in 50 mM Tris (pH 7.4) for 1 h. After incubation, sections were rinsed twice 5 min in the same buffer and briefly in distilled water. Nonspecific binding was not distinguishable from background. Sections were exposed for 36 h to Kodak Biomax films. As reported previously,¹⁹ high-affinity [¹²⁵I]-epibatidine binding sites were absent from the brain of β2 knockout (KO) mice, with the exception of structures of the habenulo-peduncular system. The quantification of lentiviral restoration of functional β2*-nAChRs in the VTA was carried out by ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) on eight coronal sections for each brain. To obtain the mean value of the optical density, the same ROI was reported on every section of each brain.

In vivo electrophysiological recording of VTA DAergic and GABAergic neurons

Single unit extracellular recordings were performed in wild-type (WT), KO and VEC (vectorized) mice as detailed in the Supplementary Information. Animals were anesthetized with chloral hydrate (400 mg/kg, intraperitoneally). Spontaneously active DA and GABA neurons were identified on the basis of previously established electrophysiological criteria (see Supplementary Material and Mameli-Engvall *et al.*¹⁵). Intravenous injection of 0.5 mm nicotine tartrate into the saphenous vein (30 μg/kg free base in a final volume of 10 μl) was performed as described. Firing frequency was quantified over 30 s periods, expressed as a percentage of average basal firing, and means were calculated within each group.

In vitro electrophysiological recording of VTA DAergic and GABAergic neurons

Slice recordings were performed in WT, KO and VEC mice as detailed in the Supplementary Information.

In vivo microdialysis

In vivo microdialysis was carried out as described in the Supplementary Information, with a probe placed unilaterally in the shell of the NAC, coordinates from Bregma (in mm): anterior 1.34, lateral 0.7, ventral –5.4. Probe placement was verified histologically.

Intracranial self-administration procedure

Intracranial self-administration (ICSA) behavior was investigated using a procedure previously described for morphine^{20,21} and cocaine,^{22,23} and then adapted to nicotine.^{19,24} This model is based on choice behavior in a Y-maze discrimination task between a nicotine-reinforced arm and a neutral arm. Discrimination tasks relying on choice behavior provide a more accurate assessment of reward than rate-dependent paradigms.²⁵ This task is particularly well adapted to detect reward-related deficits in mutant mice.^{24,26,27} ICSA allows excellent temporal and spatial, region-specific delivery of nicotine for targeting specifically brain structures such as the VTA.^{24,28} The present experiments were conducted in a gray Plexiglas Y-maze, see Figure 4a. Its arms were separated by an angle of 90°. The stem and the arms were 31 cm long and 12 cm high. The starting box (14 × 8 cm²) is separated from the stem by a sliding door. Each arm is

composed of a sliding door at its entrance and a photoelectric cell 6 cm from its end. Mice are implanted unilaterally into the posterior VTA, using the coordinates of lentiviral injections. Before each experimental session, a stainless-steel injection cannula (outer diameter 0.229 mm, inner diameter 0.127 mm; Figure 4a) is inserted into the VTA and held in a fixed position by means of a small connector. The tip of the injection cannula projects beyond the guide cannula by 1.5 mm (Figure 4a). It is connected by flexible polyethylene tubing to the microinjection system, which houses a 5- μ l Hamilton syringe containing a solution of nicotine in the artificial cerebrospinal fluid (Microperfusion Fluid; Phymep, Paris, France), the pH of which being adjusted to neutrality with NaOH 0.1 N. Mice were tested for nine consecutive days, with each daily session composed of 10 successive trials. The first session consisted in a 10-min free exploration of the Y-maze. During a second session, mice were habituated to be connected to the self-injection system, but no injection was available. In subsequent sessions, interruption of photocell beams by entering the reinforced arm of the Y-maze triggered an intra-VTA injection of nicotine that lasted 4 s (100 ng nicotine tartrate in 50 nl of artificial cerebrospinal fluid, resulting in a nicotine concentration of 4 mM as referred to the base). As photobeams are located only 6 cm from the end of each arm, mice had to enter completely into an arm to end a trial. Therefore, partial entrance into the arm did not count as a choice. Entering completely the non-reinforced arm produces no injection, and entering either arm terminated the trial. The animal's movements are detected using an optical system and transmitted to a computer, which rotated in turn the injector in the same direction, thus avoiding twisting. The number of times mice trigger a self-injection within the nicotine-reinforced arm (the number of self-administrations) and the time between the opening of the starting box door and triggering of self-injections (self-injection latency) were recorded by a computer running a program specifically developed for ICSEA (YAA; Imetronic, Pessac, France). The mean of one daily session provided one graph plot. Both WT and mutant mice exhibited a similar number of intra-VTA injections of vehicle (artificial cerebrospinal fluid, data not shown) that was not different from chance level (50%). All groups were

constituted of at least $n = 7$ and up to $n = 10$ subjects per group. Following thionin-stained histological control of stereotaxic implantation, only mice with a self-injection cannula located within the VTA were included in the statistical analysis. For the ICSEA, all data were analyzed by repeated measures analysis of variance using StatView 5.0 (Abacus Concepts, Piscataway, NJ, USA), followed by *post-hoc* Fisher's test for which the level of statistical significance was set at $P < 0.05$.

RESULTS

In vivo electrophysiology of the nicotine response in the VTA

We wanted to obtain a comprehensive understanding of nicotine responses in the microcircuits of the VTA. As most previous studies were carried out in slice preparations, we decided to address the nicotinic-cholinergic regulation of the VTA using *in vivo* electrophysiology.¹⁵ There, all afferents to the VTA are preserved, and in particular the cholinergic input from the tegmentum, a key player in VTA physiology^{29,30} (see Figure 1). Intravenous administration of nicotine (30 μ g/kg) in naive animals resulted in a rapid and pronounced increase in the firing rate of DA cells (Figure 2a), and also of putative GABAergic interneurons (Figure 2b). This latter result is incompatible with a rapid, desensitization-dependent decrease in GABA activity postulated by the disinhibition hypothesis. We then performed paired injections of nicotine at intervals of 5 or 15 min. If disinhibition were the main mechanism underlying the DA cell response, subsequent nicotine injections would further enhance receptor desensitization in GABA neurons, resulting in an increase in the consecutive peak response of DA cells to nicotine. At a 15-min interval, when no accumulation of nicotine in blood and brain was possible due to nicotine pharmacokinetics,³¹ we observed no change in the amplitude of the DA response to nicotine (Figure 2c). However, at the interval of 5 min, allowing accumulation of nicotine upon injections, DA

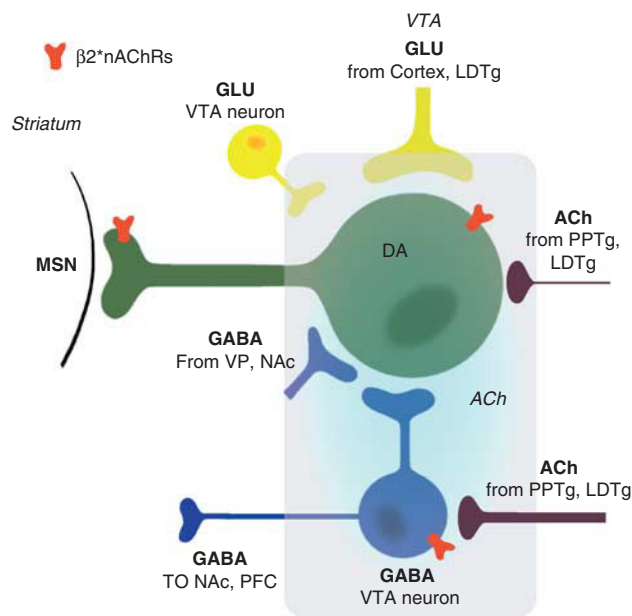


Figure 1. A schematic representation of the ventral tegmental area (VTA) and afferents. The focus of the work is on the shaded area of the VTA. The dopaminergic (DAergic) output neuron (green) contains high-affinity β_2 -containing nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) (red). It is locally inhibited by γ -aminobutyric acid-releasing (GABAergic) interneurons that also contain high-affinity β_2^* -nAChRs. Additional GABAergic projections arrive from the ventral pallidum (VP), and glutamatergic projections from the cortex, the tegmental LDTg (laterodorsal tegmental nucleus, in yellow) and locally from recently identified interneurons. The important feature of cholinergic control in the VTA is the ACh release from afferents originating in the LDTg/PPTg pontine tegmental nuclei.^{29,30} Dopamine (DA) is released in the striatum onto medium spiny neurons (MSNs) in the nucleus accumbens (NAc), which show biochemical alterations after stimulation (see Figure 5).

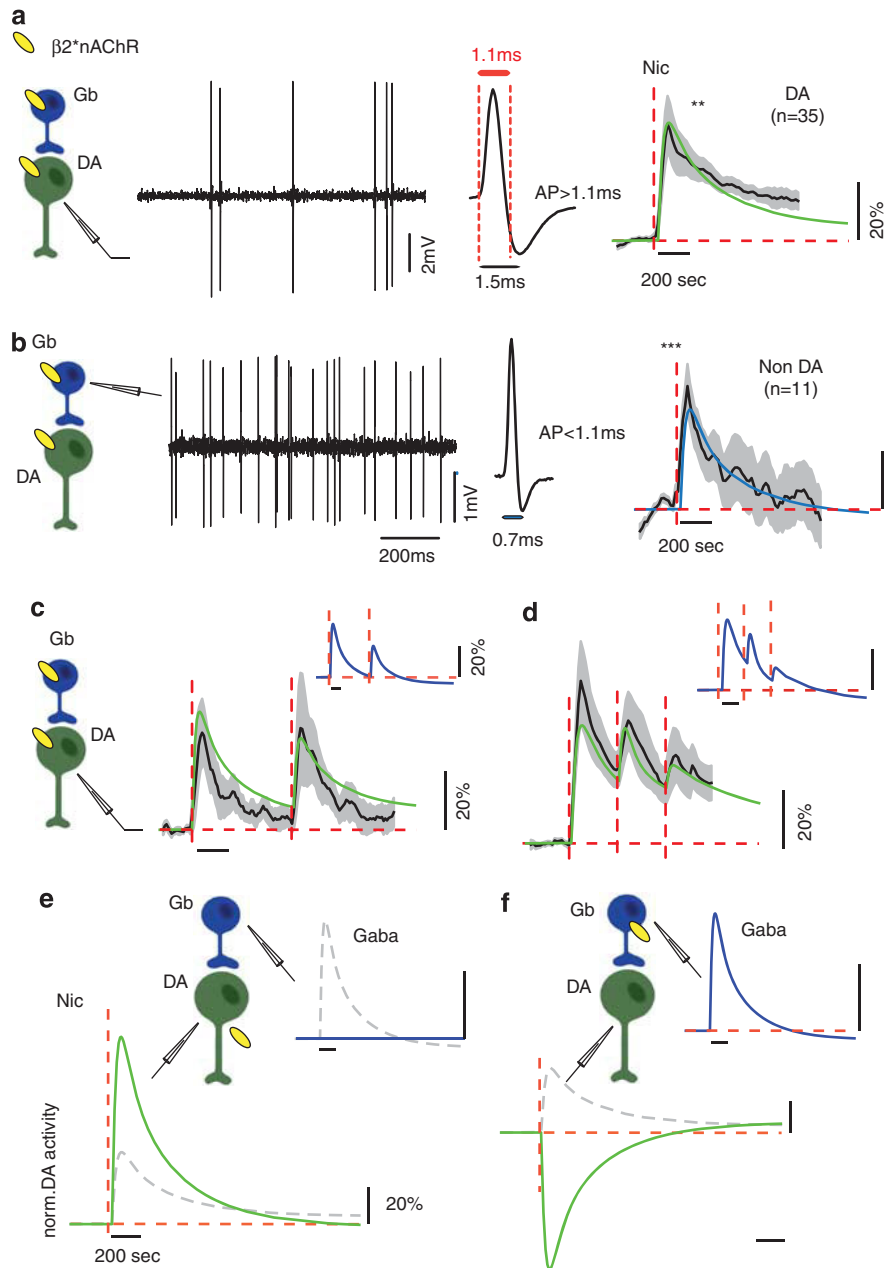


Figure 2. *In vivo* response of ventral tegmental area (VTA) neurons to nicotine and modeling. The sketches to the left of all panels represent the dopamine (DA)/ γ -aminobutyric acid (GABA) microcircuit. The dopaminergic (DAergic) neuron is in green (DA) and the γ -aminobutyric acid-releasing (GABAergic) interneuron in blue (Gb). The β_2^* -nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) in yellow indicate their differential expression between the two cell types, and the electrode marks the cell from which recordings were obtained. The traces obtained with *in vivo* electrophysiological recordings are in black and the standard error painted in gray. Green traces are from the model fitted to the experimental values for DA recordings and the blue trace corresponds to GABA cells. The time points of nicotine (Nic) injections are marked by red vertical dashed lines. **(a)** DA neuron identification and response to nicotine. (Left) Example of raw traces of DA cells (1 among $n=43$, mean firing rate = 3.31 ± 0.27). (Middle) Example of action potential (AP) waveform of a VTA DAergic neuron. (Right) Nicotine-elicited modifications of firing frequency (mean \pm s.e.m.) of VTA DAergic neurons (black, $n=43$, mean of basal firing rate 3.31 ± 0.27 Hz, mean of the maximal variation $+54.33 \pm 12.036\%$, $P=1.55 \times 10^{-7}$, Wilcoxon's signed-rank test). Green, model DA activity response to nicotine. **(b)** GABA neuron identification and response to nicotine. (Left) Example of raw traces of GABA neurons (1 among $n=11$, mean firing rate = 20.06 ± 3.74). (Middle) Example of non-filtered AP waveform of a VTA non-DAergic neuron. (Right) Nicotine-elicited modifications of firing frequency (mean \pm s.e.m.) of putative GABAergic neurons ($n=11$, mean of basal firing rate 20.06 ± 3.74 Hz, mean of the maximal variation $+49.32 \pm 6.39\%$, $P=0.0009$, Wilcoxon's signed-rank test). Blue, model GABA neuron activity response to nicotine. **(c)** DA neuron response to two repeated nicotine injections with an interval of 15 min ($n=7$, mean of basal firing rate 3.67 ± 0.8 Hz). Inset shows corresponding GABA responses, in blue. **(d)** DA neuron response to three repeated nicotine injections at 5-min intervals ($n=11$, mean of basal firing rate 3.41 ± 0.38 Hz). Inset shows corresponding GABA responses. Note that the model has been fitted to all four experimental recordings from panels a to d simultaneously. **(e)** Predicted DA neuron response to a single nicotine injection with β_2^* -nAChRs on DA neurons only, see sketch to the left. **(f)** Predicted DA neuron response to a single nicotine injection with β_2^* -nAChRs on GABA neurons only, see sketch to the left. All horizontal scale bars are 200 s and vertical scale bars show 20% relative changes in firing rate. Dashed curves show the control responses (that is, β_2 on both DA and GABA neurons) for comparison.

neurons exhibited a decrease in the amplitude of nicotine response (Figure 2d). Therefore, *in vivo*, the immediate firing rate increase of DAergic cells in response to an acute injection of nicotine entails DA excitation, and a competition with inhibition, rather than desensitization of nAChRs on GABAergic interneurons.

Modeling the *in vivo* response to nicotine

To corroborate the proposed direct excitation mechanism of nicotine action, we used a minimal model of the VTA microcircuit to account quantitatively for the recorded responses of DA and GABA neurons, a model modified from Graupner and Gutkin.^{32,33} The model reflects the cholinergic (ACh) afferents to the DA and GABA cells in the VTA, local inhibition of DA cells by GABA neurons as well as the pharmacology of the nAChRs (Figure 1). In this minimal model, we chose to leave aside a potential contribution from local glutamatergic neurons as described very recently, as no data exist as to their expression of nicotinic receptors.³⁴ Nicotine-evoked changes are thus exclusively mediated by $\beta 2^*$ -nAChRs expressed somatically on both DA and GABA neurons. This is in line with experiments and modeling studies suggesting that the $\beta 2$ -containing subtype plays the dominant role in nicotinic modulation of DA signaling.^{7,15,32,35}

The model, see Supplementary Information, fitted to the recordings of DA and GABA firing rate responses (green and blue traces in Figure 2), respectively, shows that nicotine drives both $\beta 2^*$ -nAChR activation and desensitization. The early response to nicotine in DA and GABA neurons, for example, to a single nicotine injection, is dominated by direct receptor activation that boosts the firing rates in both neuron types (Figures 2a and b). Subsequent nicotine injections further recruit receptor desensitization giving rise to an accommodation in the peak response of DA cells to nicotine (Figures 2c and d). This accommodation is stronger for shorter inter-injection intervals (compare Figure 2c for 15-min intervals and Figure 2d for 5 min). In addition, in our model nicotine-dependent receptor desensitization in GABA neurons decreases their firing rate below baseline after nicotine clearance, thereby producing a prolonged elevated DA response in the model (see Figures 2c and d).

Experimental and model data suggest that receptor desensitization does not govern the immediate DA response and confirms the predominant role of early excitation due to acute nicotine. The model results furthermore suggest that long-lasting disinhibition might give rise to a secondary delayed and prolonged elevated DA activity after nicotine clearance (Figures 2c and d). Finally, these results also suggest that both DA and GABA pathways are activated by nicotine. Dissociating the consequences of the activation of the two pathways by acute nicotine on firing of identified DA cells would confirm the respective role of $\beta 2^*$ -nAChRs on DA and GABA neurons. A simulation of two variants of the model, that is, where we set $\beta 2^*$ -nAChRs to be expressed only on DA neurons, or only on the GABA neurons, illustrates the potential benefit of this experiment. The first model gives rise to a rapid DA activity boost through direct nicotine-evoked excitation of DA neurons alone (Figure 2e). The second yields only a nicotine-evoked immediate inhibition of the DA firing rate (Figure 2f). This predicts that a differential expression of $\beta 2^*$ -nAChRs on the DA or on the GABA neuron would favor excitation versus inhibition of the DA firing rates.

A novel system for the cell-type-specific expression of nicotinic receptors

To test these respective *in vivo* roles of the DAergic and GABAergic neurons in the microcircuits involved in nicotine reinforcement, we used a Cre recombinase-activated lentiviral expression vector¹⁸ (Figure 3a) to drive specific $\beta 2^*$ -nAChR re-expression in DA or GABAergic neurons of the VTA. We created two new mouse lines expressing Cre recombinase only in DAergic neurons

($\beta 2^{-/-} \times \text{DAT-Cre}$ mice),³⁶ or only in GABAergic neurons ($\beta 2^{-/-} \times \text{GAD67-Cre}$ mice).^{18,37} [¹²⁵I]Epibatidine autoradiography on coronal brain slices demonstrated the recovery of high-affinity receptors at the injection site in the VTA and in axon terminals in the NAc (Figure 3b) for vectorized $\beta 2^{-/-} \times \text{DAT-Cre}$ mice (referred to as $\beta 2^{\text{DA-VEC}}$), but only in the VTA for $\beta 2^{-/-} \times \text{GAD67-Cre}$ mice ($\beta 2^{\text{GABA-VEC}}$) injected with the floxed lentivirus. Sections of these mice labeled with epibatidine were quantified, and as shown in Supplementary Figure S2, restoration of between 70 and 85% of high-affinity binding sites compared to WT mice were obtained. We injected mice with a GFP-expressing lentivector (Figure 3a)¹⁸ to confirm that transgene expression was completely restricted only to DAergic cells of DAT-Cre mice, and to GABAergic cells of GAD67-Cre mice (Figure 3c), and to quantify the efficiency of the re-expression. We found that 75% of DA neurons re-express the gene with this approach, see Materials and methods. This correlates well with the restoration observed in the binding studies. We also established slice electrophysiology of vectorized mice, see Supplementary Figure S3. We were thus able to demonstrate in an independent set of experiments that vectorization of either the DA or GABA neurons fully restores responsiveness of high-affinity nAChRs.

We then compared nicotine-evoked modification of firing pattern in DAergic neurons of WT mice with those of $\beta 2^{-/-}$ (see Supplementary Material for $\beta 2^{-/-}$ group definition), $\beta 2^{\text{DA-VEC}}$ and $\beta 2^{\text{GABA-VEC}}$ mice (Figures 3d and e). Selective re-expression of the $\beta 2$ subunit in DAergic neurons only resulted in an increased firing frequency after systemic nicotine injection, whereas $\beta 2^{\text{GABA-VEC}}$ mice exhibited a decrease (Figure 3e). The duration of the DA cell inhibition in $\beta 2^{\text{GABA-VEC}}$ tallies well with the duration of GABAergic excitation observed in WT animals (Figure 2b). As with the WT mice (Figures 2c and d), repeated nicotine injections were carried out as shown in Supplementary Figure S4. Similar to WT mice, $\beta 2^{\text{DA-VEC}}$ exhibited a decrease in the peak response of DA neurons to consecutive injections of nicotine (Supplementary Figure S4b). This is in accordance with model data suggesting that successive nicotine injections further recruit receptor desensitization and give rise to an accommodation in the peak response of DA cells to nicotine. Results suggesting a similar phenomenon were obtained in $\beta 2^{\text{GABA-VEC}}$ mice (Supplementary Figure S4c). Taken together, these data indicate that $\beta 2^*$ -nAChRs are desensitized by nicotine at the level of both the DA and GABA neurons. However, in WT mice, the net effect of this desensitization, at a timescale on the order of minutes, results in a reduction of the peak response of DA cells, and *not* in a strong disinhibition.

These experiments dissociate the competitive effect of direct nicotine excitation revealed in $\beta 2^{\text{DA-VEC}}$ and the indirect inhibition through GABAergic nAChR excitation. We had previously shown that the nicotine-elicited increase in the tonic activity of DA cells is abolished in $\beta 2^{-/-}$ mice, and is restored when the $\beta 2$ subunit is re-expressed in all neurons of the VTA.^{15,27} To exclude any possible contribution from other cell types in the VTA, for example, recently described glutamatergic interneurons (see Figure 1), we created a third mouse line crossing the DAT-Cre and GAD67-Cre lines together onto a $\beta 2^{-/-}$ background. Injecting these double transgenic lines with the floxed $\beta 2$ -expressing lentivirus, referred to as $\beta 2^{\text{DA+GABA-VEC}}$ mice, leads to the targeted expression of the $\beta 2$ subunit on *both* DA and GABA neurons, but not any other cell type. Injecting nicotine intravenously into these mice and recording from the DA neurons resulted in a WT pattern of responding (Figure 3e, bottom).

DA neuron transmits positive and negative motivational value
Midbrain DAergic neuron activity is associated with reward-related behaviors and positive motivation.³⁸ Recent studies suggest that they also transmit signals related to aversive and alerting events.³⁹ We investigated the behavioral effect of selective DA cell

excitation or inhibition by nicotine using an ICSA model based on choice behavior in a Y-maze^{20–23} (Figure 4a). In this paradigm, WT mice actively self-administer nicotine at the dose of 100 ng per injection (Figure 4b), whereas $\beta 2^{-/-}$ mice do not acquire this behavior.^{24,27}

Here, we report that $\beta 2^{DA-VEC}$ mice exhibited no acquisition of nicotine ICSA over the course of daily sessions, as evidenced by both the number of injections and latency (Figures 4c and d). However, $\beta 2^{DA-VEC}$ mice behaved differently from GFP-vectorized subjects: they exhibited initially a transient approach behavior toward the nicotine-reinforced arm, but did not develop a stable, chronic nicotine self-administration over sessions (Supplementary Figures S5a and b). In contrast, $\beta 2^{GABA-VEC}$ exhibited a *decreased* choice of the reinforced arm, which remained below chance level (Figure 4c). Preferential choice of the non-reinforced arm is typically associated with the aversive effects of drugs of abuse, as previously demonstrated with cocaine.²³ To determine whether decreasing the nicotine dose would extend ICSA responding, the $\beta 2^{DA-VEC}$ mice were tested further with lower concentrations of nicotine (see Supplementary Figures S5c and d). The use of a 50 ng dose led to an initial increase quickly followed by chance level

responding, whereas no response was observed with the 10 ng dose. These results demonstrate that the $\beta 2$ subunit expressed selectively on DA or GABA neurons of the VTA encodes, respectively, for positive or negative motivational value: direct excitation of DA neurons enhances the incentive value of nicotine, while inhibition of DA neurons through GABAergic excitation and/or direct inhibition of GABAergic efferent decreases it. However, in both cases nicotine effects were transient, as neither the positive (in $\beta 2^{DA-VEC}$ mice) nor negative value (in $\beta 2^{GABA-VEC}$ mice) were followed by subsequent acquisition of steady, chronic ICSA or avoidance.

A critical role for nicotine-evoked DA burst firing

To identify the mechanisms underlying stable ICSA acquisition, we studied DA release in response to nicotine and subsequent downstream signaling in DAergic target areas. *In vivo* microdialysis in freely moving mice was carried out to measure DA release after systemic injection of nicotine. Unlike WT mice, but similar to KO animals, the DA vectorized group did not exhibit a nicotine elicited increase in free DA (Figure 5a and Supplementary

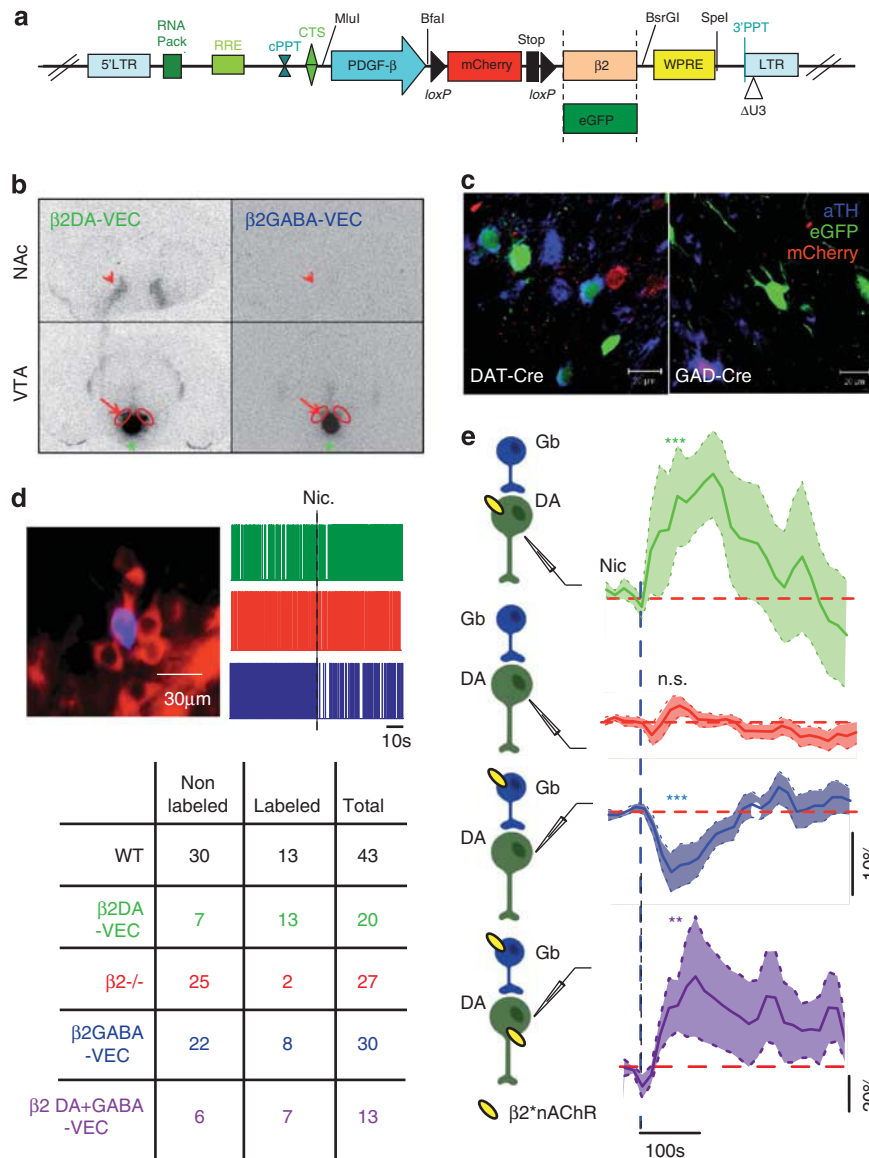


Figure S6). We then assessed the impact of this lack of DA release on DA-dependent cellular modifications in the NAc. The mitogen-activated protein kinase/ERK signaling pathway is activated by most drugs of abuse, including nicotine, within neurons of the NAc.⁴⁰ Interestingly, ERK activation caused by nicotine in the NAc critically depends on DA D1 receptor activation, as it is blocked by SCH23390, a D1 receptor antagonist. Furthermore, the blockade of ERK phosphorylation prevents immediate-early gene expression and long-lasting behavioral changes associated with exposure to drugs of abuse.⁴¹ Quantifying the number of phospho-ERK-positive nuclei in NAc revealed an abolition of ERK phosphorylation in response to nicotine in $\beta 2^{-/-}$ mice (Figure 5b). This indicates a critical role of $\beta 2^*$ -nAChRs in nicotine-elicited ERK activation in the NAc. It is of interest that we failed to restore ERK activation caused by nicotine in $\beta 2^{\text{DA-VEC}}$ (Figure 5b). Therefore, nicotine elicited firing rate increase in $\beta 2^{\text{DA-VEC}}$ is not sufficient to elicit DA release within the NAc, nor to activate downstream signaling pathways and maintain ICSCA.

We then investigated the causes of transient ICSCA. Because they have distinct influences on learning and motivation, tonic to phasic activity transitions are an essential component of the DA reward response.^{42,43} Indeed, bursts are more effective in enhancing transmitter release,⁴⁴ and activating immediate-early genes in DA target areas.⁴⁵ Optogenetic methods have recently shown that the burst firing of DA neurons is a crucial property for reward.⁴⁶ We have therefore analyzed the burst structures in all of our groups by calculating the percentage of spikes within a burst (%SWB = number of spikes within burst divided by total number of spikes in a 30 s time window, see Supplementary Material for details). Our previous work had shown that lentiviral re-expression of high-affinity nAChRs in the VTA using a ubiquitous PGK promoter results in nicotine-elicited burst firing.¹⁵ However, burst analysis in $\beta 2^{\text{DA-VEC}}$ and $\beta 2^{\text{GABA-VEC}}$ mice revealed that acute systemic nicotine did not evoke bursting (Figure 5c). Only WT and $\beta 2^{\text{DA+GABA-VEC}}$ mice, vectorized specifically in DA and GABA neurons of the VTA, exhibited a significant increase in burst firing. The analysis of spontaneous, acetylcholine-dependent activity is shown for firing rate in Figure 5d. This analysis is carried out as

described in our previous publication.¹⁵ For each neuron, spontaneous activity was quantified using firing rate (mean number of spikes per second) in Hz (Figure 5d, left) and %SWB (Figure 5d, right). These values are defined on the basis of at least 5 min of spontaneous activity before nicotine injection. It confirmed the role of GABA neurons in burst generation. In $\beta 2^{\text{GABA-VEC}}$ and $\beta 2^{\text{DA+GABA-VEC}}$ mice the spontaneous bursting pattern observed in the WT were restored, which was not the case in $\beta 2^{\text{DA-VEC}}$. These results reveal that burst firing is a cooperative effect resulting from the interplay between direct excitation and inhibition.

We then tested a $\beta 2^{\text{DA+GABA-VEC}}$ group in ICSCA to determine whether habit-forming actions of nicotine could be observed in the doubly re-expressed mice. We found their nicotine-induced response to be strikingly similar to WT mice (Figure 5e). In contrast to $\beta 2^{\text{DA-VEC}}$ mice, $\beta 2^{\text{DA+GABA-VEC}}$ displayed a rapid and steady acquisition of nicotine ICSCA. This means that burst firing can be correlated with stable ICSCA acquisition.

DISCUSSION

One of the critical steps in the transition from nicotine intake to addiction is the development of nicotine-elicited habits that contribute to stimulate and maintain chronic consumption. Self-administration is a powerful behavioral paradigm to investigate important aspects of these critical early steps toward nicotine addiction.^{47,48} Identifying, *in vivo*, the neural circuitry underlying the acquisition of nicotine self-administration provides essential clues to our understanding of nicotine addiction, and its treatment.

Novel lentiviral vectors for the cell-type-specific expression of nicotinic receptors

One of the major difficulties in analyzing the nicotinic system is that almost every neuron in the brain, and cells in most other tissues,⁴⁹ expresses nAChRs. We have therefore developed a general method for the neurotransmitter-specific expression of

Figure 3. Generation and analysis of $\beta 2^{\text{DA-VEC}}$, $\beta 2^{\text{GABA-VEC}}$ and $\beta 2^{\text{DA+GABA-VEC}}$ mice. **(a)** Schematic representation of the lentiviral vectors used in this study, conditionally expressing the $\beta 2$ subunit or eGFP. Cre recombinase recognizes the two loxP sites and removes the mCherry-Stop DNA sequence, activating $\beta 2$ subunit expression. Restriction enzymes used in the DNA construct are indicated above the vector. **(b)** [¹²⁵I]Epibatidine autoradiography on coronal brain slices of axon terminals in the nucleus accumbens (NAc) (top) and in the ventral tegmental area (VTA) (bottom), in $\beta 2^{\text{DA-VEC}}$ mice (left) and $\beta 2^{\text{GABA-VEC}}$ (right) mice. Arrowheads point to axonal label in the NAc and arrows to somatic label in the VTA (circled). **(c)** mCherry and eGFP expression in VTA sections of DAT-Cre and GAD67-Cre mice. eGFP expression (green) is restricted to tyrosine hydroxylase (TH)-positive neurons (blue) of DAT-Cre mice (left) and to TH-negative neurons of GAD67-Cre mice (right). mCherry expression (red) was only found in TH-negative neurons of DAT-Cre mice (left), and only in TH-positive neurons of GAD67-Cre mice (right). Scale bar, 20 μm . **(d)** Summary of the size of DAergic neuron populations used in this study and proportion of labeled cells. (Top, left) Example of labeling showing colocalization of neurobiotin (blue) and TH (red), allowing identification of the recorded neuron. (Top, right) Raster plot of raw traces from electrophysiological recordings; 50 s before and 50 s after nicotine injection (Nic) are shown. Colors correspond to $\beta 2^{\text{DA-VEC}}$ (green), $\beta 2^{-/-}$ (red) and $\beta 2^{\text{GABA-VEC}}$ (blue). Scale bar, 10 s. (Bottom) Table summarizing the pool of DA neurons recorded and labeled in this study. **(e)** Nicotine-elicited modifications of firing frequency (mean \pm s.e.m.) in VTA DAergic neurons. Sketches to the left indicate the differential expression of the $\beta 2^*$ -nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) (yellow) in DA (green) or GABA neurons (blue), and the recorded neuron (electrode, always the DA neuron). Vertical dashed line indicates the nicotine injection (blue). Horizontal dashed line indicates the baseline level (red). (Top) DAergic neurons in $\beta 2^{\text{DA-VEC}}$ mice (green, $n = 20$, mean of basal firing rate 2.62 ± 0.24 Hz, mean of the maximal variation $+22.54 \pm 7.03\%$, $P = 0.00032$, Wilcoxon's signed-rank test). (Second row) DAergic neurons in $\beta 2^{-/-}$ mice (red, $n = 27$, mean of basal firing rate 2.28 ± 0.17 Hz, mean of the maximal variation $+2.62 \pm 0.24\%$, $P = 0.7$, Wilcoxon's signed-rank test). (Third row) DAergic neurons in $\beta 2^{\text{GABA-VEC}}$ mice (blue, $n = 30$, mean of basal firing rate 3.48 ± 0.33 Hz, mean of the maximal variation $-22 \pm 3.7\%$, $P = 6 \times 10^{-8}$, Wilcoxon's signed-rank test). (Bottom) DAergic neurons in $\beta 2^{\text{DA+GABA-VEC}}$ mice (purple, $n = 13$, mean of basal firing rate 2.29 ± 0.43 Hz, mean of maximal variation $+53.16 \pm 25.81\%$, $P = 0.00012$, paired Wilcoxon's test). Group comparison: wild-type (WT) vs $\beta 2^{-/-}$, $P = 6 \times 10^{-6}$; WT vs $\beta 2^{\text{GABA-VEC}}$, $P = 1.6 \times 10^{-6}$; $\beta 2^{-/-}$ vs $\beta 2^{\text{DA-VEC}}$, $P = 0.006$; $\beta 2^{-/-}$ vs $\beta 2^{\text{GABA-VEC}}$, $P = 1.56 \times 10^{-6}$; $\beta 2^{-/-}$ vs $\beta 2^{\text{DA+GABA-VEC}}$, $P = 0.00067$ (Wilcoxon's signed-rank test with a sequential Bonferroni correction). WT was first compared to $\beta 2^{-/-}$. If significant, a series of six comparisons were then performed (WT or $\beta 2^{-/-}$ vs $\beta 2^{\text{DA-VEC}}$, $\beta 2^{\text{GABA-VEC}}$ or $\beta 2^{\text{DA+GABA-VEC}}$), only significant comparisons are indicated (see Supplementary Material). $\beta 2$, mouse wild-type $\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor subunit cDNA; cPPT, central polypurine tract; CTS, central termination sequence; DA, dopamine; $\Delta U3$, 400bp deletion in 3'-LTR; eGFP, enhanced green fluorescent protein cDNA; GABA, γ -aminobutyric acid; loxP, recognition sites for Cre recombinase; LTR, long terminal repeats; mCherry, monomeric red Cherry fluorescent protein coding sequence; PDGF- β , platelet-derived growth factor β chain promoter; 3'-PPT, 3'-polypurine tract; RNA pack, genomic RNA packaging signal; RRE, rev response element; Stop, multiple STOP codons; VEC, vector.

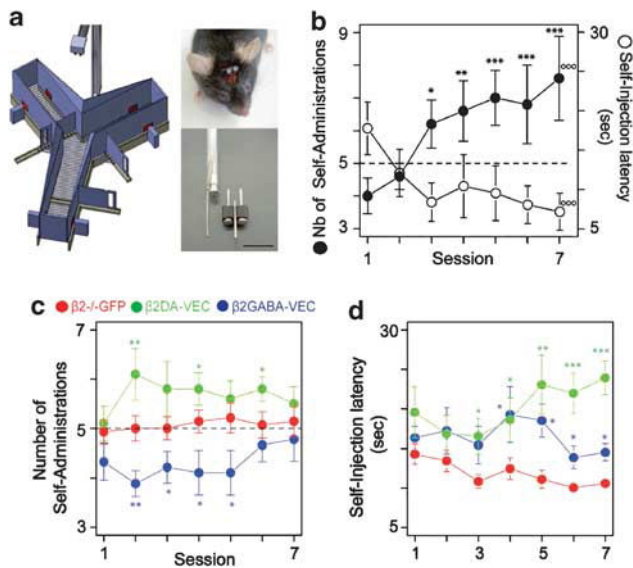


Figure 4. $\beta 2$ Subunit re-expressed either on dopaminergic (DAergic) or γ -aminobutyric acid-releasing (GABAergic) neurons of the ventral tegmental area (VTA) encodes, respectively, for positive or negative motivational value. (a) The mouse model of intracranial nicotine self-administration (ICSA). (Left) Detailed three-dimensional sketch of the Y-maze apparatus used to assess choice of the nicotine-reinforced vs non-reinforced arm. (Right, top) Example of mouse implanted with the injection guide. (Right, bottom) Micro-connector, guide cannula and cannula used for intracranial injection of nicotine. Scale bar, 5 mm. (b) Intra-VTA nicotine self-administration in wild-type (WT) ($*P < 0.05$; $**P < 0.01$; $***P < 0.001$; WT vs $\beta 2^{GFP-VEC}$ (red; c). On the abscissa, the daily test sessions from days 1 to 7. On the left ordinate, the number of self-administration events per 10 daily trials, corresponding to the filled circles. On the right ordinate, self-injection latency in seconds. $^{ooo}P < 0.001$, session effect. (c) Intra-VTA nicotine self-administration in vectorized mice. Number of self-administrations in $\beta 2^{DA-VEC}$ (green), $\beta 2^{-/-}$ (red) and $\beta 2^{GABA-VEC}$ (blue) mice per daily session (abscissa, 1–7) expressed as mean \pm s.e.m., with 100 ng nicotine (as salt) per self-administered dose ($*P < 0.05$; $**P < 0.01$; $***P < 0.001$; $\beta 2^{DA-VEC}$ or $\beta 2^{GABA-VEC}$ vs $\beta 2^{-/-}$; two-way analysis of variance (ANOVA); genotype effect: $F(2,30) = 6.292$, $P < 0.01$; session effect: $F(6,180) = 0.793$, NS). (d) Self-injection latency in $\beta 2^{DA-VEC}$ (blue), $\beta 2^{-/-}$ (green) and $\beta 2^{GABA-VEC}$ (red) mice. Ordinate, self-injection latency in seconds per daily session (abscissa, days 1–7) is expressed as mean \pm s.e.m., with 100 ng nicotine (as salt) per self-administered dose ($*P < 0.05$; $**P < 0.01$; $***P < 0.001$; $\beta 2^{DA-VEC}$ or $\beta 2^{GABA-VEC}$ vs $\beta 2^{-/-}$). VEC, vectorized.

nAChRs through lentiviral vectors in the brain and applied it to the VTA of mice, the principal target of all drugs of abuse.^{6,13} In the case of nicotine addiction, the cellular organization and relevant pharmacology of the VTA is complex as different nAChRs are present on a variety of cell types: DAergic projection neurons, local GABAergic neurons and terminals from cortical, pallidal and tegmental afferents (see Figure 1). Recently, also glutamatergic neurons have been identified in the VTA, but no data exist as to their expression of nicotinic receptors.^{34,50} We have focused on the contribution of nAChRs on GABAergic neurons, which has been a challenging and little explored issue.^{8,51} Our system allowed us to re-express exclusively the $\beta 2$ nAChR subunit, responsible for high-affinity nAChRs, on either DAergic or GABAergic cells, or both in $\beta 2^{DA+GABA-VEC}$ mice, in the VTA of $\beta 2$ KO. We demonstrate that the increase or decrease of DA firing frequency caused by nicotine acting exclusively on DA or GABA cells, respectively, correlates with positive or negative incentive value to drug-associated cues. However, only the concerted activation of nAChRs on DAergic and GABAergic cells correlates with the acquisition of a steady nicotine self-administration.

A crucial role for burst firing of DAergic neurons in nicotine reinforcement

We show that a particular firing pattern of the DA neurons, burst firing, is a critical physiological mechanism required for the long-term acquisition of nicotine self-administration. Tonic to phasic transition is an essential part of the functional role of the DAergic system.⁴³ DA cell bursts of action potentials are related to elevated DA outflow and to the signaling of novel rewards or environmental stimuli.^{43,52} Disruption of NMDA receptor-dependent burst firing impairs the acquisition of several conditioned behavioral responses and learning about cues that predict salient events.⁵³ In addition, optogenetic tools have been used recently to demonstrate that DA bursting activity is sufficient to mediate reinforcement.⁴⁶ Burst firing can be triggered by a number of events.^{54,55} Among these are glutamatergic receptor activation,⁵³ activation of voltage-gated ion channels following NMDA receptor activation,⁵⁶ alteration of SK conductance^{57,58} and decrease of tonic GABAergic inhibition. However, our results suggest that cholinergic input, relying on the activation of $\alpha 4\alpha 6\beta 2^*$ -nAChR expressed within the VTA,^{15,27,29,30,59} play the role of a permissive gate that allows these various stimuli to trigger burst firing.^{60–62}

In this paper we show, however, that $\beta 2^*$ -nAChRs at the level of VTA DA cells alone are not sufficient to restore bursts evoked by nicotine. Accordingly, as a functional readout, we failed to restore ERK activation induced in the NAC by nicotine in $\beta 2^{DA-VEC}$ mice and an increase in DA release. These data suggest, first, that an increase in frequency due to $\beta 2^*$ -nAChRs on DA cells can be dissociated from enhancement of bursting, and second, that cholinergic input from tegmental nuclei also has a key role on GABA cells, and on burst control.

Redefining the role for VTA GABA neurons

The role we assign to GABAergic interneurons in the VTA differs significantly from proposals formulated over the past decade on the basis of data obtained with *in vitro* slice preparations.^{9,11,12} Although Mansvelder and McGehee⁹ did show some transient activation of GABAergic neurons in slices, all subsequent models describing the acute effect of nicotine on DA cell excitability were centered on disinhibition following GABA cell desensitization, and glutamatergic activation. Our results emphasize the role of $\beta 2^*$ -nAChRs on DA cells to increase firing, and importantly, on the interplay between DA and GABA activation to produce burst firing, the key property of DA neurons. An increase in GABAergic activity, and not a decrease, is thus necessary to shape DA cell bursting.

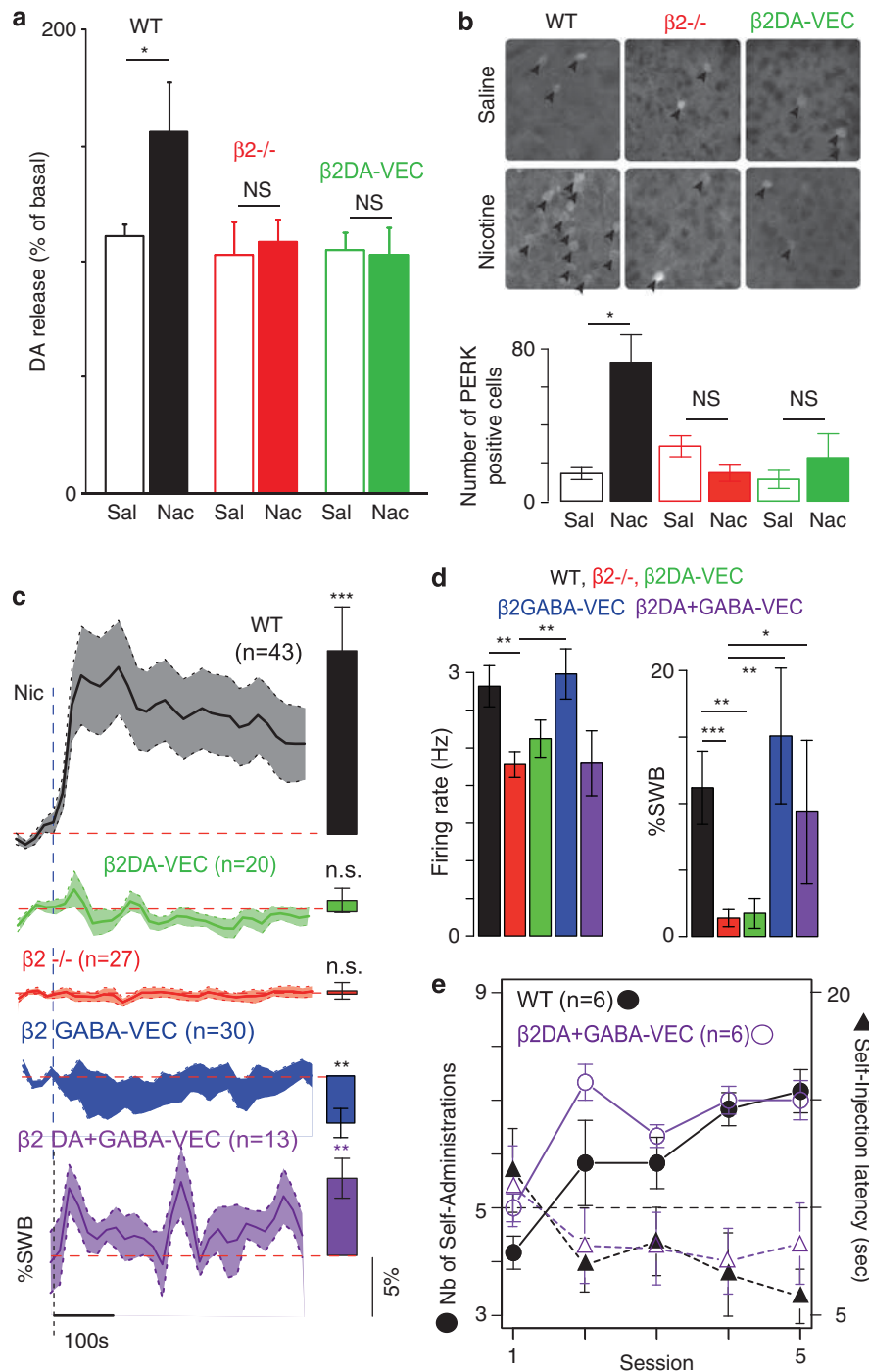
Our initial results on GABA neuron activation (Figure 2b) might be seen difficult to interpret directly as a GABA-mediated inhibition for two reasons. First, in these experiments we recorded 'putative' GABAergic neurons. Second, GABAergic neurons in the VTA are not exclusively interneurons as some of them project to the same forebrain targets as do the DA neurons.⁶³ Nicotine-dependent excitation could thus be an exclusive property of GABAergic neurons that project outside the VTA. To circumvent conclusively these issues, we focused our electrophysiological analyses on DA cells, and on the effect of $\beta 2^*$ -nAChR activation on GABAergic interneurons using cell-type-specific expression of nicotinic receptors (Figure 3). Our results demonstrate that these GABAergic interneurons are activated by nicotine, and consequently inhibit DA cell firing (see Figure 3e). This major novel finding is substantiated by unambiguous identification and labeling of the recorded DA neurons (see Figure 3d and Supplementary Information). Interestingly, the minimal computational model with nAChRs expressed only on the DA cells also reproduces the shorter time courses of the DA response in $\beta 2^{DA-VEC}$ animals as compared to the WT (compare green and grey lines in Figure 2e). And in the models with GABA-nAChRs, an increase above baseline after inhibition is observed in $\beta 2^{GABA-VEC}$ (compare Figure 2e to Figure 2f). This further supports the notion

that late, but not short-term, DA responses are governed by receptor desensitization.

We also show that cholinergic modulation of GABAergic cells is required for spontaneous DA neuron bursting. Recent data suggest that GABAergic input can act through phasic disinhibition as an excitatory drive, promoting rebound burst firing in DA neurons.^{64,65} In line with this view, our results demonstrate conclusively that re-expression of the $\beta 2$ subunit in GABA neurons allows spontaneous burst firing in DA neurons. In $\beta 2^{GABA-VEC}$ mice, increased GABAergic input causes increased IPSPs in DA neurons, which has been shown to produce irregular firing

patterns,⁶⁶ allowing us to link the restoration of spontaneous bursting in DA neurons with the cholinergic modulation of GABA neuron activity.

Finally, burst firing and irregularity would require a balance between excitation and inhibition. Strong and synchronous activation of GABAergic cells, such as those caused by nicotine in $\beta 2^{GABA-VEC}$ DA neurons, cannot evoke bursting in DA cells if it is not counterbalanced by excitation. We suggest that this balance is endorsed by $\beta 2^*$ -nAChRs expressed, respectively, at the DA and GABA level within the VTA as suggested by our results on $\beta 2^{DA+GABA-VEC}$ mice.



Towards a comprehensive understanding of the *in vivo* effects of nicotine

There are a number of conundrums in the study of the *in vivo* effects of nicotine: we show that, in mice, nicotine modulates the nAChRs in a few seconds, activation of DA neurons persists for about 10 min, and nicotine-dependent axonal release of DA lasts for 1–2 h. Finally, behavioral effects such as those observed in self-administration protocols take several days to be established. We have started to tackle the mechanisms of these different timescales and their significance. In particular, our computational modeling shows that a rapid phasic increase of DA activity, and hence a DA output spike, is likely to be due to the direct excitation of receptors on DA neurons, whereas the longer lasting increase of DA firing rate by nicotine is due to desensitization of GABA neuron nAChRs. The latter may also be a mechanism that shifts the DA cell activity from tonic to bursting.⁶⁷ Further computational study has suggested that receptor desensitization by nicotine may play an important role in shaping DA responses to environmental stimuli, notably reducing the impact of negative motivational stimuli and rendering DA responding to previously learned stimuli again labile.⁶⁸

It is generally admitted that tobacco and nicotine are repeatedly used because they provide positive feelings, and that this is linked with the increased activity in the mesocorticolimbic DA system.⁶⁹ There is some initial evidence that VTA DAergic cells encode rewarding and aversive stimuli by increases and decreases of their firing frequency, respectively.³⁹ We show here with our experiments using $\beta_2^{\text{DA-VEC}}$ and $\beta_2^{\text{GABA-VEC}}$ mice that this increase in DA firing frequency caused by nicotine correlates with a positive or negative incentive value to stimuli, whereas decreased DA firing frequency and increased VTA GABA neuron activity correlates with a negative incentive value. Indeed, we cannot

exclude that VTA GABA neurons may alter reward function not only by their interaction with DA neurons and their burst patterns, but also with their interaction with the downstream targets in the mesolimbic and mesocortical DA terminal fields, or the tegmentum.¹⁰ However, this result suggests that nicotine can transmit positive and negative value as a function of its action on DAergic or GABAergic neurons in the VTA. A number of different drugs, and in particular nicotine, have been postulated to act through disinhibition of the DA system.¹⁴ According to this view, the GABAergic system acts to support and enhance excitatory input to DA neurons via somatic or presynaptic activation. Our results rather suggest that, while a predominant influence of GABA would elicit mainly aversive effects,¹⁰ the co-activation of DA and GABA systems is required for the habit-forming action of nicotine.⁷⁰

A novel mechanism, potentially defining a novel drug target

We elucidate, for the first time, microcircuits engaged *in vivo* in a critical step of drug addiction and its regulation by endogenous neurotransmitters. We propose that within the VTA, DA-GABA neuron interplay is essential for the acquisition of persistent nicotine-directed behavior. Now, we need to further establish the role of GABAergic neurons in the chronic response to nicotine. Future studies should investigate how GABAergic activity is required for the long-term maintenance of nicotine dependence and the relevant loss of control, thus identifying a potentially novel drug target. Chronic nicotine exposure upregulates specifically the amount of nAChRs containing the $\alpha 4$ subunit in GABAergic neurons.⁵¹ Our study thus could pave the way for the development and pre-clinical testing of smoking cessation agents, targeting the heteromeric $\alpha 4\beta 2$ -containing receptors on

Figure 5. Bursting activity and pharmacological consequences. **(a)** Microdialysis measuring extracellular dopamine (DA) levels in the nucleus accumbens (NAc) shell, showing area under the curve values (AUC, mean \pm s.e.m. as % of baseline) during a 2 h post-treatment period. * $P < 0.05$ and NS = not statistically significant (wild-type (WT), black, $n = 9$; $\beta_2^{-/-}$, red, $n = 6$; $\beta_2^{\text{DA-VEC}}$, green, $n = 7$ mice per group). Open bars, injection of saline. Filled-in bars, response to nicotine. **(b)** Quantification of increase in the number of phosphorylated-extracellular signal-regulated kinase (P-ERK)-positive nuclei after acute nicotine injection in mice. (Top) Photomicrographs of the NAc showing P-ERK immunostained neurons after saline (upper row) and nicotine (bottom row) administration. Arrowheads point to several P-ERK-positive nuclei. (Bottom) Quantification of increase in the number of P-ERK-positive nuclei after acute nicotine injection in WT mice (black, $n = 4$ for saline and nicotine, $P < 0.05$, Wilcoxon's signed-rank test), $\beta_2^{-/-}$ mice (red, $n = 3$ for saline and nicotine, $P > 0.05$, exact Wilcoxon's signed-rank test), $\beta_2^{\text{DA-VEC}}$ mice (green, $n = 3$ for saline and nicotine, $P > 0.05$, Wilcoxon's signed-rank test). **(c)** Nicotine-elicited modifications of the percent of spikes within bursts (%SWB) (mean \pm s.e.m.) in VTA DAergic neurons of WT mice (black, $n = 43$, mean of the maximal variation $+ 15.42 \pm 3.68\%$, $P = 6.78 \times 10^{-6}$, paired Wilcoxon's test), $\beta_2^{\text{DA-VEC}}$ (green, $n = 20$, mean of the maximal variation $+ 0.97 \pm 1.03\%$, $P = 0.724$, paired Wilcoxon's test), $\beta_2^{\text{GFP-VEC}}$ ($n = 27$, mean of the maximal variation $+ 0.27 \pm 0.69\%$, $P = 0.16$, paired Wilcoxon's test), $\beta_2^{\text{GABA-VEC}}$ (blue, $n = 30$, mean of the maximal variation $- 3.76 \pm 1.63\%$, $P = 0.0025$, paired Wilcoxon's test) and $\beta_2^{\text{DA+GABA-VEC}}$ mice (purple, $n = 13$, mean of the maximal variation $+ 6.49 \pm 1.67\%$, $P = 0.0028$, paired Wilcoxon's test). Vertical dashed line indicates the nicotine injection (blue). Horizontal dashed lines indicate the baseline level (red, for value see **d**). Group comparison: WT vs $\beta_2^{-/-}$, $P = 0.005$; WT vs $\beta_2^{\text{DA-VEC}}$, $P = 0.0005$; WT vs $\beta_2^{\text{GABA-VEC}}$, $P = 8.4 \times 10^{-7}$; $\beta_2^{-/-}$ vs $\beta_2^{\text{GABA-VEC}}$, $P = 3.7 \times 10^{-5}$; $\beta_2^{-/-}$ vs $\beta_2^{\text{DA+GABA-VEC}}$, $P = 0.0005$ (Wilcoxon's signed rank test with a sequential Bonferroni correction, only significant comparisons are indicated, see Supplementary Material). **(d)** Quantification of spontaneous firing of DA cells. (Left) Bar-plot representation of the mean basal firing rate (Hz) represented as means \pm s.e.m. WT (black, $n = 43$, mean = 3.31 ± 0.27 Hz), $\beta_2^{-/-}$ (red, $n = 27$, mean = 2.28 ± 0.17 Hz), $\beta_2^{\text{DA-VEC}}$ (green, $n = 20$, mean = 2.62 ± 0.24 Hz), $\beta_2^{\text{GABA-VEC}}$ (blue, $n = 30$, mean = 3.48 ± 0.33 Hz) and $\beta_2^{\text{DA+GABA-VEC}}$ mice (purple, $n = 30$, mean = 2.29 ± 0.43 Hz). Group comparison: WT vs $\beta_2^{-/-}$, $P = 0.006$; $\beta_2^{-/-}$ vs $\beta_2^{\text{GABA-VEC}}$, $P = 0.004$ (Wilcoxon's signed-rank test with a sequential Bonferroni correction, ** $P < 0.01$; see Figure 3e and Supplementary Material for statistical procedures). (Right) Bar-plot representation of the %SWB represented as means \pm s.e.m. WT (black, mean = $11.19 \pm 2.75\%$), $\beta_2^{-/-}$ (red, $n = 27$, mean = $1.38 \pm 0.64\%$), $\beta_2^{\text{DA-VEC}}$ (green, $n = 20$, mean = $1.74 \pm 1.13\%$), $\beta_2^{\text{GABA-VEC}}$ (blue, $n = 30$, mean = $15.08 \pm 5.09\%$) and $\beta_2^{\text{DA+GABA-VEC}}$ mice (purple, $n = 13$, mean = $9.37 \pm 5.38\%$). Group comparison: WT vs $\beta_2^{-/-}$, $P = 0.001$; WT vs $\beta_2^{\text{DA-VEC}}$, $P = 0.0048$; $\beta_2^{-/-}$ vs $\beta_2^{\text{GABA-VEC}}$, $P = 0.0073$; $\beta_2^{-/-}$ vs $\beta_2^{\text{DA+GABA-VEC}}$, $P = 0.012$ (Wilcoxon's signed-rank test with a sequential Bonferroni correction, only significant comparisons are indicated; see Figure 3e and Supplementary Material for statistical procedures). **(e)** Number of self-administrations (circle, solid line) in $\beta_2^{\text{DA+GABA-VEC}}$ (empty circle) and WT mice (full circle) per daily session (abscissa, 1–5) expressed as mean \pm s.e.m., with 100 ng nicotine (as salt) per self-administered dose (two-way analysis of variance (ANOVA), genotype effect: $F(1,10) = 2.357$, NS; session effect: $F(4,40) = 17.136$, $P < 0.001$; genotype \times session effect: $F(4,40) = 1.717$, NS. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ as compared to chance level). $\beta_2^{\text{DA+GABA-VEC}}$ displayed a steady nicotine self-administration and earned significantly more self-injections than $\beta_2^{\text{DA-VEC}}$ ($F(1,14) = 7.738$, $P < 0.02$) and $\beta_2^{-/-}$ ($F(1,12) = 16.331$, $P < 0.01$). As typically observed during acquisition of intracranial self-administration (ICSA), the self-injection latency (triangle, dashed lines) decreased over sessions, this effect being similar in $\beta_2^{\text{DA+GABA-VEC}}$ (empty triangle) and WT (full triangle) (genotype effect: $F(1,10) = 0.126$, NS; Session effect: $F(4,40) = 3.247$, $P < 0.05$). $\beta_2^{\text{DA+GABA-VEC}}$ also triggered nicotine injections faster than $\beta_2^{\text{DA-VEC}}$ ($F(1,14) = 8.735$, $P < 0.01$) and tend to be even faster than $\beta_2^{-/-}$, which are known to exhibit a spontaneously active phenotype ($F(1,12) = 4.213$, $P < 0.06$). VEC, vectorized.

GABAergic interneurons, and *not* DAergic receptors, as frequently attempted by pharmaceutical companies.³

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Benoît Forget and Henri Korn for helpful comments on the manuscript, and Jochen Roeper for help with slice electrophysiology. This work was supported by the Institut Pasteur, Centre National de la Recherche Scientifique CNRS URA 2182, UMR 7102, UMR 5287 and ATIP programme, de l'Agence Nationale pour la Recherche (ANR Neuroscience, Neurologie et Psychiatrie 2005 and 2009, and ANR BLANC 2009), Neuropôle IdF, INSERM U960, the RTRA Ecole des Neurosciences de Paris and the Bettencourt Schueller Foundation. The research leading to these results has received funding from the European Union Seventh Framework Programme under Grant no. HEALTH-F2-2008-202088 ('NeuroCypres' project to U.M.). ST acknowledges financial support from Fondation de la Recherche Médicale (FRM), and Pasteur-Weizmann.

REFERENCES

- WHO. World Health Organization Report on the Global Tobacco Epidemic, available from: <http://www.who.int/tobacco/mpower/2009/en/>, 2009.
- Changeux JP. Nicotine addiction and nicotinic receptors: lessons from genetically modified mice. *Nat Rev Neurosci* 2010; **11**: 389–401.
- Taly A, Corringer PJ, Guedin D, Lestage P, Changeux JP. Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. *Nat Rev Drug Discov* 2009; **8**: 733–750.
- Marti F, Arib O, Morel C, Dufresne V, Maskos U, Corringer PJ *et al*. Smoke extracts and nicotine, but not tobacco extracts, potentiate firing and burst activity of ventral tegmental area dopaminergic neurons in mice. *Neuropsychopharmacology* 2011; **36**: 2244–2257.
- Changeux JP, Edelstein SJ. *Nicotinic Acetylcholine Receptors: From Molecular Biology to Cognition*. Odile Jacob: New York, 2005.
- Pontieri FE, Tanda G, Orzi F, Chiara GD. Effects of nicotine on the nucleus accumbens and similarity to those of addictive drugs. *Nature* 1996; **382**: 255–257.
- Piccio MR, Zoli M, Rimondini R, Lena C, Marubio LM, Pich EM *et al*. Acetylcholine receptors containing the beta2 subunit are involved in the reinforcing properties of nicotine. *Nature* 1998; **391**: 173–177.
- Klink R, de Kerchove d'Exaerde A, Zoli M, Changeux JP. Molecular and physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors in the midbrain dopaminergic nuclei. *J Neurosci* 2001; **21**: 1452–1463.
- Mansvelder HD, McGehee DS. Cellular and synaptic mechanisms of nicotine addiction. *J Neurobiol* 2002; **53**: 606–617.
- Laviolette SR, van der Kooy D. The neurobiology of nicotine addiction: bridging the gap from molecules to behaviour. *Nat Rev Neurosci* 2004; **5**: 55–65.
- Mansvelder HD, Keath JR, McGehee DS. Synaptic mechanisms underlie nicotine-induced excitability of brain reward areas. *Neuron* 2002; **33**: 905–919.
- Mansvelder HD, McGehee DS. Long-term potentiation of excitatory inputs to brain reward areas by nicotine. *Neuron* 2000; **27**: 349–357.
- Luscher C, Malenka RC. Drug-evoked synaptic plasticity in addiction: from molecular changes to circuit remodeling. *Neuron* 2011; **69**: 650–663.
- Sulzer D. How addictive drugs disrupt presynaptic dopamine neurotransmission. *Neuron* 2011; **69**: 628–649.
- Mameli-Engvall M, Evrard A, Pons S, Maskos U, Svensson TH, Changeux JP *et al*. Hierarchical control of dopamine neuron-firing patterns by nicotinic receptors. *Neuron* 2006; **50**: 911–921.
- Dani JA, Bertrand D. Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2007; **47**: 699–729.
- Olivo-Marin JC. Extraction of spots in biological images using multiscale products. *Pattern Recogn* 2002; **35**: 1989–1996.
- Tolu S, Avale ME, Nakatani H, Pons S, Parnaudeau S, Tronche F *et al*. A versatile system for the neuronal subtype specific expression of lentiviral vectors. *FASEB J* 2010; **24**: 723–730.
- Maskos U, Molles BE, Pons S, Besson M, Guiard BP, Guilloux JP *et al*. Nicotine reinforcement and cognition restored by targeted expression of nicotinic receptors. *Nature* 2005; **436**: 103–107.
- David V, Cazala P. A comparative study of self-administration of morphine into the amygdala and the ventral tegmental area in mice. *Behav Brain Res* 1994; **65**: 205–211.
- David V, Durkin TP, Cazala P. Differential effects of the dopamine D2/D3 receptor antagonist sulpiride on self-administration of morphine into the ventral tegmental area or the nucleus accumbens. *Psychopharmacology (Berl)* 2002; **160**: 307–317.
- David V, Segu L, Buhot MC, Ichaye M, Cazala P. Rewarding effects elicited by cocaine microinjections into the ventral tegmental area of C57BL/6 mice: involvement of dopamine D1 and serotonin1B receptors. *Psychopharmacology (Berl)* 2004; **174**: 367–375.
- David V, Gold LH, Koob GF, Cazala P. Anxiogenic-like effects limit rewarding effects of cocaine in balb/cbyj mice. *Neuropsychopharmacology* 2001; **24**: 300–318.
- David V, Besson M, Changeux JP, Granon S, Cazala P. Reinforcing effects of nicotine microinjections into the ventral tegmental area of mice: dependence on cholinergic nicotinic and dopaminergic D1 receptors. *Neuropharmacology* 2006; **50**: 1030–1040.
- Mason PA, Milner PM, Miousse R. Preference paradigm: provides better self-stimulation reward discrimination than a rate-dependent paradigm. *Behav Neural Biol* 1985; **44**: 521–529.
- David V, Matifas A, Gavello-Baudy S, Decorte L, Kieffer BL, Cazala P. Brain regional Fos expression elicited by the activation of mu- but not delta-opioid receptors of the ventral tegmental area: evidence for an implication of the ventral thalamus in opiate reward. *Neuropsychopharmacology* 2008; **33**: 1746–1759.
- Maskos U. Emerging concepts: novel integration of *in vivo* approaches to localise the function of nicotinic receptors. *J Neurochem* 2007; **100**: 596–602.
- Wise R. Brain reward circuitry: insights from unsensed incentives. *Neuron* 2002; **36**: 229–240.
- Maskos U. The cholinergic mesopontine tegmentum is a relatively neglected nicotinic master modulator of the dopaminergic system: relevance to drugs of abuse and pathology. *Br J Pharmacol* 2008; **153**(Suppl 1): S438–S445.
- Maskos U. Role of endogenous acetylcholine in the control of the dopaminergic system via nicotinic receptors. *J Neurochem* 2010; **114**: 641–646.
- Petersen DR, Norris KJ, Thompson JA. A comparative study of the disposition of nicotine and its metabolites in three inbred strains of mice. *Drug Metab Dispos* 1984; **12**: 725–731.
- Graupner M, Gutkin BS. Modeling nicotinic neuromodulation from global functional and network levels to nAChR based mechanisms. *Acta Pharmacol Sin* 2009; **30**: 681–693.
- Graupner M, Gutkin BS In: Gutkin BS, Ahmed SH (eds). *Computational Neuroscience of Drug Addiction, Computational Neuroscience Series*. Springer Verlag: Berlin, 2011, pp 111–144.
- Dobi A, Margolis EB, Wang H-L, Harvey BK, Morales M. Glutamatergic and nonglutamatergic neurons of the ventral tegmental area establish local synaptic contacts with dopaminergic and nondopaminergic neurons. *J Neurosci* 2010; **30**: 218–229.
- Graupner M, Gutkin BS. Tonic acetylcholine governs the phasic mesolimbic dopamine response to nicotine. *PLoS Comp Biol* 2012 (under consideration).
- Turiault M, Parnaudeau S, Milet A, Parlato R, Rouzeau JD, Lazar M *et al*. Analysis of dopamine transporter gene expression pattern—generation of DAT-iCre transgenic mice. *FEBS J* 2007; **274**: 3568–3577.
- Fuchs EC, Doheny H, Faulkner H, Caputi A, Traub RD, Bibbig A *et al*. Genetically altered AMPA-type glutamate receptor kinetics in interneurons disrupt long-range synchrony of gamma oscillation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 3571–3576.
- Fields HL, Hjelmstad GO, Margolis EB, Nicola SM. Ventral tegmental area neurons in learned appetitive behavior and positive reinforcement. *Annu Rev Neurosci* 2007; **30**: 289–316.
- Bromberg-Martin ES, Matsumoto M, Hikosaka O. Dopamine in motivational control: rewarding, aversive, and alerting. *Neuron* 2010; **68**: 815–834.
- Valjent E, Pages C, Herve D, Girault JA, Caboche J. Addictive and non-addictive drugs induce distinct and specific patterns of ERK activation in mouse brain. *Eur J Neurosci* 2004; **19**: 1826–1836.
- Girault JA, Valjent E, Herve D. ERK2: a logical AND gate critical for drug-induced plasticity? *Curr Opin Pharmacol* 2007; **7**: 77–85.
- Grace AA. Phasic versus tonic dopamine release and the modulation of dopamine system responsivity: a hypothesis for the etiology of schizophrenia. *Neuroscience* 1991; **41**: 1–24.
- Schultz W. Multiple dopamine functions at different time courses. *Annu Rev Neurosci* 2007; **30**: 259–288.
- Gonon FG. Nonlinear relationship between impulse flow and dopamine released by rat midbrain dopaminergic neurons as studied by *in vivo* electrochemistry. *Neuroscience* 1988; **24**: 19–28.
- Chergui K, Svenningsson P, Nomikos GG, Gonon F, Fredholm BB, Svensson TH. Increased expression of NGF-A mRNA in the rat striatum following burst stimulation of the medial forebrain bundle. *Eur J Neurosci* 1997; **9**: 2370–2382.
- Tsai HC, Zhang F, Adamantidis A, Stuber GD, Bonci A, de Lecea L *et al*. Phasic firing in dopaminergic neurons is sufficient for behavioral conditioning. *Science* 2009; **324**: 1080–1084.
- Corrigall WA. Nicotine self-administration in animals as a dependence model. *Nicotine Tob Res* 1999; **1**: 11–20.

- 48 Rose JE, Corrigall WA. Nicotine self-administration in animals and humans: similarities and differences. *Psychopharmacology (Berl)* 1997; **130**: 28–40.
- 49 Wessler I, Kirkpatrick CJ. Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *Br J Pharmacol* 2008; **154**: 1558–1571.
- 50 Nair-Roberts RG, Chatelain-Badie SD, Benson E, White-Cooper H, Bolam JP, Ungless MA. Stereological estimates of dopaminergic, GABAergic and glutamatergic neurons in the ventral tegmental area, substantia nigra and retrorubral field in the rat. *Neuroscience* 2008; **152**: 1024–1031.
- 51 Nashmi R, Xiao C, Deshpande P, McKinney S, Grady SR, Whiteaker P *et al*. Chronic nicotine cell specifically upregulates functional $\alpha 4^*$ nicotinic receptors: basis for both tolerance in midbrain and enhanced long-term potentiation in perforant path. *J Neurosci* 2007; **27**: 8202–8218.
- 52 Schultz W. Getting formal with dopamine and reward. *Neuron* 2002; **36**: 241–263.
- 53 Zweifel LS, Parker JG, Lobb CJ, Rainwater A, Wall VZ, Fadok JP *et al*. Disruption of NMDAR-dependent burst firing by dopamine neurons provides selective assessment of phasic dopamine-dependent behavior. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; **106**: 7281–7288.
- 54 Overton PG, Clark D. Burst firing in midbrain dopaminergic neurons. *Brain Res* 1997; **25**: 312–334.
- 55 Tepper JM, Lee CR In: Tepper JM, Abercrombie ED, Bolam JP (eds). *Progress in Brain Research* Vol. 160. Elsevier: Amsterdam, 2007, pp189–208.
- 56 Deister CA, Teagarden MA, Wilson CJ, Paladini CA. An intrinsic neuronal oscillator underlies dopaminergic neuron bursting. *J Neurosci* 2009; **29**: 15888–15897.
- 57 Canavier CC, Landry RS. An increase in AMPA and a decrease in SK conductance increase burst firing by different mechanisms in a model of a dopamine neuron *in vivo*. *J Neurophysiol* 2006; **96**: 2549–2563.
- 58 Kitai ST, Shepard PD, Callaway JC, Scroggs R. Afferent modulation of dopamine neuron firing patterns. *Curr Opin Neurobiol* 1999; **9**: 690–697.
- 59 Exley R, Maubourguet N, David V, Eddine R, Evrard A, Pons S *et al*. Distinct contributions of nicotinic acetylcholine receptor subunit $\{\alpha\}4$ and subunit $\{\alpha\}6$ to the reinforcing effects of nicotine. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; **108**: 7577–7582.
- 60 Floresco SB, West AR, Ash B, Moore H, Grace AA. Afferent modulation of dopamine neuron firing differentially regulates tonic and phasic dopamine transmission. *Nat Neurosci* 2003; **6**: 968–973.
- 61 Grace AA, Floresco SB, Goto Y, Lodge DJ. Regulation of firing of dopaminergic neurons and control of goal-directed behaviors. *Trends Neurosci* 2007; **30**: 220–227.
- 62 Lodge DJ, Grace AA. The laterodorsal tegmentum is essential for burst firing of ventral tegmental area dopamine neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 5167–5172.
- 63 Omelchenko N, Sesack SR. Ultrastructural analysis of local collaterals of rat ventral tegmental area neurons: GABA phenotype and synapses onto dopamine and GABA cells. *Synapse* 2009; **63**: 895–906.
- 64 Hong S, Hikosaka O. The globus pallidus sends reward-related signals to the lateral habenula. *Neuron* 2008; **60**: 720–729.
- 65 Lobb CJ, Wilson CJ, Paladini CA. A dynamic role for GABA receptors on the firing pattern of midbrain dopaminergic neurons. *J Neurophysiol* 2010; **104**: 403–413.
- 66 Grace AA, Bunney BS. Opposing effects of striatonigral feedback pathways on midbrain dopamine cell activity. *Brain Res* 1985; **333**: 271–284.
- 67 Oster MA, Faure P, Gutkin BS. *Society for Neuroscience Annual Meeting*. San Diego, CA, 2010.
- 68 Graupner M, Gutkin BS. *Society for Neuroscience Annual Meeting*. Chicago, IL, 2009.
- 69 Miwa JM, Freedman R, Lester HA. Neural systems governed by nicotinic acetylcholine receptors: emerging hypotheses. *Neuron* 2011; **70**: 20–33.
- 70 Dalley JW, Everitt BJ, Robbins TW. Impulsivity, compulsivity, and top-down cognitive control. *Neuron* 2011; **69**: 680–694.

Supplementary Information accompanies the paper on the Molecular Psychiatry website (<http://www.nature.com/mp>)

Article 2 : Eddine et al., N.P.

**Opposite effects of nicotine on ventral tegmental area
dopaminergic subregions**

R. Eddine, S. Valverde, S. Tolu, D. Dautan, Y.A. Hay, C. Morel, Y. Cui, B. Lambolez, L. Venance, F. Marti, P. Faure

Opposite effects of nicotine on ventral tegmental area dopaminergic subregions

Raphaël Eddine*¹, Sebastien Valverde*¹, Stefania Tolu¹, Daniel Dautan¹, Audrey Hay², Carole Morel¹, Yihui Cui³, Bertrand Lambolez², Laurent Venance³, Fabio Marti¹, Philippe Faure¹

¹Université Pierre et Marie Curie, CNRS UMR 7102, Neurobiologie des Processus Adaptatifs, Equipe Neurophysiologie et Comportement, 75005 Paris, France

²Université Pierre et Marie Curie, CNRS UMR 7102, Neurobiologie des Processus Adaptatifs, Cortical Networks and Neurovascular Coupling, 75005 Paris, France

³Dynamics and Pathophysiology of Neuronal Networks, Center for Interdisciplinary Research in Biology, CNRS UMR7241/INSERM U1050, College de France, 75005 Paris, France

* These two authors contributed equally to the work.

Summary

Midbrain dopamine (DA) neurons are key players in motivation and reward processing. Increased DA release is thought to be central in the initiation of drug addiction. Activation and inhibition of DA neurons has also been linked to the processing of aversive stimuli. Here, we report that nicotine not only activates Ventral Tegmental Area (VTA) DA cells but also inhibits a subset of VTA DA neurons that are anatomically segregated in the medial part of the VTA. This inhibition requires D2 receptor (D2-R) activation and is also elicited by ethanol, but does not correspond to the inhibition of DA neurons induced by pain. We show that the medial portion of the VTA is a particular sub-region under control of the lateral VTA via somato-dendritic release of DA and subsequent activation of D2-R. This promotes a novel role for DA release contrasting with the classical views of reinforcement and motivation.

Running Title

Nicotinic Inhibition of Medial VTA DA neurons

Highlights

- VTA DA neurons exhibit heterogeneous responses to rewarding or aversive stimuli
- Nicotine activates lateral and inhibits medial DA VTA neurons
- Similar effects are obtained with alcohol but not with aversive stimuli
- Nicotine-induced inhibition is mediated by D2 autoreceptors

Introduction

Midbrain dopamine (DA) neurons from the ventral tegmental area (VTA) are involved in several brain processes including reinforcement, associative learning, motivation, and are critically involved in the pathophysiology of addiction. Nicotine, the primary addictive component of tobacco, exerts a number of its effects by modifying VTA DA neurons activity (Grenhoff et al., 1986; Marti et al., 2011; Maskos et al., 2005) and the subsequent DA release in target areas (Di Chiara and Imperato, 1988)

Several studies report an excitation of VTA DA neurons and an increase in dopamine release in target areas following nicotine administration. However there is a heterogeneity in DA cells' nicotine response (Mameli-Engvall et al., 2006), and recent studies have shown that these cells can be segregated into different functional subpopulations, according to their spontaneous electrophysiological activity, protein expression, area of axonal projection (Lammel et al., 2008; 2011; Margolis et al., 2008), and responses to appetitive and aversive stimuli (Brischoux et al., 2009; Bromberg-Martin et al., 2010; Lammel et al., 2013). Therefore, characterization of the heterogeneous effects of nicotine at the level of VTA DA neurons appears to be a key point to understand the complex action of this drug and develop new therapeutic strategies for nicotine addiction.

Nicotine intake in humans and animals follows an inverted U-shaped dose-response curve (Fowler et al., 2011), suggesting that a balance between excitation and inhibition of DA cells could be implicated in the regulation of nicotine intake. Indeed, some cells show an inhibition of firing in response to nicotine, adding to the heterogeneity of VTA DA responses (Erhardt et al., 2002; Mameli-Engvall et al., 2006; Marti et al., 2011). However, this effect was neither characterized nor linked with physiological or anatomical data. It is thus of importance to understand the basis of VTA DA cells inhibition and its relation with nicotine in order to dissect the mechanisms of the control of nicotine consumption. Different mechanisms underlying such an inhibition could be suggested. A first hypothesis would rely on GABAergic inhibition. GABA neurons within the VTA are critical in the control of nicotine-elicited DAergic activity (Tolu et al., 2013). It follows that a predominant inhibitory GABAergic input onto DA cells could lead to aversive effects of nicotine (Laviolette and van der Kooy, 2004). This hypothesis is consistent with the recent demonstration that selective activation of VTA GABA neurons drives conditioned place aversion and disrupts rewarded behavior (Tan et al., 2012; van Zessen et al., 2012). But if the inhibition of DA neuron firing has been linked to processing of aversive stimuli via excitation of an afferent inhibitory GABAergic population, aversive stimuli can also activate subsets of DA neurons (Brischoux et al., 2009; Matsumoto and Hikosaka, 2009). Furthermore, inhibition of DA neurons following nicotine administration could also occur via activation of D2 autoreceptors (Beckstead et al., 2004; Lacey et al., 1987). This second hypothesis would suggest a role of somatodendritically released DA in the VTA during nicotine intake.

Here, using *in vivo* single cell recordings in mice, we show that VTA DA neurons are segregated in two subpopulations, displaying respectively an excitation and an inhibition following nicotine administration. We show that these subpopulations are electrophysiologically similar but anatomically distinct, inhibited and excited neurons being respectively located medially and laterally within the VTA. We found that such an anatomically segregated response also occurs during exposure to ethanol. We then show that

these subpopulations do not overlap with DA neurons inhibited and excited by painful stimuli. At last, we show that inhibition, but not excitation, requires functional D2 receptor (D2-R). These results provide insights into the study of nicotine effects and raise new questions concerning the instatement of nicotine addiction.

Results

A subpopulation of VTA DA neurons is inhibited by nicotine

We performed *in vivo* single cell electrophysiological recordings on anaesthetized mice, and recorded the response to a single intravenous nicotine injection (30 µg/kg), of a pool of putative DA neurons (n=157), of which 61 were identified (labelled and/or pharmacologically identified, see methods). We found a consistent amount of DA neurons that did not display the expected increase of firing frequency in response to nicotine, but instead displayed a drop in their firing activity following the injection (Figure 1). Of the 157 neurons that received nicotine, 87 (55%) were excited while 70 (45%) were inhibited (see methods).

Inhibited and excited cells both displayed an important modification of firing frequency upon nicotine injection (mean response for excited neurons: $+ 37.1 \pm 6.6 \%$, $p = 1.2e-15$; for inhibited neurons: $-31.0 \pm 3.0\%$, $p = 4.3e-13$, exact Wilcoxon signed rank test), and the peak of the effect occurred at the same time in both populations (92.2 ± 4.2 seconds for excited and 94.0 ± 4.8 seconds for inhibited neurons, $p > 0.05$, asymptotic Wilcoxon rank sum test). Analysis of the responses of DA neurons at various doses (see dose-response curves, Figure S1) demonstrates that the excitatory and inhibitory responses of DA neurons to nicotine are dose-dependent. Inhibition is thus a property of individual neurons (whatever the dose) and not a “global VTA DA cells” property that emerges at specific nicotine doses.

DA cell activity is influenced by the stage of sleep and deepness of anaesthesia (Brown et al., 2009). It could be argued that the type of response to nicotine and the spontaneous activity of DA cells depends on such side parameters. To rule out this potential issue, we have recorded pairs of DA neurons by descending one electrode in each side of the brain (Figure S2A). Among the 3 pairs of VTA DA neurons that we recorded, 1 consisted of two oppositely responding neurons (i.e. one excited and one simultaneously inhibited) (Figure S2B). Analogously, 1 out of the 3 pairs contained two neurons belonging to different classes of spontaneous activity (i.e. one regularly and one irregularly firing). This ensures that the heterogeneity of spontaneous DA activities and the opposite responses to nicotine coexist in the brain and do not rely on a side parameter.

Inhibited and excited neurons display similar firing pattern properties

Recently, subpopulations of DA neurons have been characterized according to their projection areas. These subpopulations lie in different parts of the VTA and display different electrophysiological, anatomical and molecular properties such as spontaneous firing frequency, action potential duration, anatomical localization, and D2-R expression (Lammel et al., 2008; 2011; Margolis et al., 2008). However, *in vivo* analysis of spontaneous firing properties did not reveal any difference between spontaneous activity of excited and inhibited cells (respectively: spontaneous firing rate: 2.9 ± 0.3 Hz and 2.6 ± 0.2 Hz, $p > 0.05$, asymptotic Wilcoxon rank sum test; spontaneous bursting: $13.7 \pm 2.7 \%$ and $15.7 \pm 3.1 \%$, $p > 0.05$,

asymptotic Wilcoxon rank sum test, see Figure 1). Action potential duration was also similar in the two populations (inhibited neurons: 2.4 ± 0.1 ms; excited neurons 2.5 ± 0.1 ms, $p > 0.05$, asymptotic Wilcoxon rank sum test).

Inhibited and excited neurons are anatomically segregated within the VTA

Among the 157 neurons, 51 cells ($n=35$ excited cells and $n=16$ inhibited cells) were labelled with the juxtacellular neurobiotin labelling technique (Pinault, 1996) within the VTA (Figure 2A). We positioned each cell on coronal diagrams (Figure 2B-C) and quantified the anatomical distributions along the three stereotaxic axes: antero-posterior, medio-lateral, dorso-ventral. We found that inhibited neurons were located medially while excited neurons were located laterally within the VTA (Figure 2C, from the midline, inhibited neurons located at 373 ± 25 μm and excited neurons at 563 ± 23 μm , $p < 0.001$, Wilcoxon test). There was no difference along dorso-ventral (from the bregma, inhibited neurons located at 4223 ± 35 μm and excited neurons at 4201 ± 18 μm , $p > 0.05$, Wilcoxon test) and antero-posterior axes (from the bregma, inhibited neurons located at 3412 ± 44 μm and excited neurons at 3443 ± 28 μm , $p > 0.05$, Wilcoxon test; see Figure S3). Given that we were actively probing the medial region of the VTA, the proportion of excited and inhibited DA cells reported here shouldn't be considered as a faithful representation of the VTA layout.

Responses to aversive events and to nicotine do not overlap

VTA DA neurons are excited or inhibited by aversive events depending on their anatomical location (Brischoux et al., 2009). To investigate a correlation between the responses to nicotine and those to aversive stimuli, we delivered pinches during the recording of some DA neurons ($n=48$) that had been exposed to a nicotine injection. We confirmed that dopaminergic neurons can either be excited ($n=14$) or inhibited ($n=32$) by pinches (Figure 3A). However, we did not observe a correlation between DA neuron response to nicotine and its response to a pinch. Neurons that were excited or inhibited by nicotine could either be excited or inhibited by a pinch (Figure 3C). Moreover, we labelled some DA neurons ($n=8$) that were inhibited by a pinch. They are located in the dorsal VTA (Figure 3D), a result that confirms previous studies (Brischoux et al., 2009), and supports the fact that neuronal populations inhibited/activated by aversive stimuli do not match the populations inhibited/activated by nicotine.

VTA regional differences can be explained by differential intra VTA DA release

We carried out *in vitro* analysis of electrophysiological characteristics of VTA DA cells in order to study the possibility that the observed regional differences in response to nicotine could in part be explained by differential expression of nicotinic receptors (Figure 4A). We measured currents in DA cells following nicotinic agonist DMPP (1,1-dimethyl-4-phenylpiperazinium iodide) application. We did not observe any differences in DA cells nicotinic currents based on their anatomical position along the mediolateral axis (medial and lateral amplitude respectively: $88,1 \pm 17,5$ pA; $85,4 \pm 17,3$ pA $p=0,8$; medial and lateral decay kinetics respectively: $0,59 \pm 0,18$ pA/sec; $0,93 \pm 0,19$ pA/sec $p=0,09$ Mann-Whitney test). These results suggest that, in contrast with nicotine induced increases in neuronal firing that are directly imputable to activation of nAChRs (Mameli-Engvall et al., 2006; Maskos et al., 2005),

inhibition requires an indirect explanation. Nicotine-induced DAergic inhibition could result from D2R activation following intra VTA DA release. We performed voltammetric measurements in slices and showed that under nicotine exposure, DA release in the VTA is significantly higher in the lateral region than in the medial region (medial and lateral DA peak amplitudes respectively: $2,37E-11$; $6,55E-10$ $p < 0.05$ Mann-Whitney test, Figure 4B). These data indicate that the underlying mechanisms involved in the regional differences of responses to nicotine are i) not dependent on the integrity of networks not conserved in the slices that are outside the VTA and ii) certainly linked to a balance between the nicotinic activation of DA neurons and the inhibition induced by a somatodendritic release of DA in the VTA, further emphasized by a mediolateral difference of DA reuptake *via* DAT expression (Lammel et al., 2008).

Inhibition in response to nicotine depends upon D2-R

Activation of VTA DA neurons triggers dopamine release within the VTA, exerting a negative feedback via the activation of D2 autoreceptors (D2-Rs) (Beckstead et al., 2004). The above results suggest that nicotine-induced inhibition could rely on D2-R activation following somatodendritic DA release from excited VTA DA neurons. To test this hypothesis, we measured the amplitude of the response in inhibited and excited cells after D2-R blockade. After a return to baseline activity from the first nicotine administration, we intravenously injected the D2-R family agonist quinpirole (1mg/kg), which elicited a strong inhibition and allowed to assess the presence of D2-Rs on the cell (Figure S4, mean response to quinpirole in firing frequency in inhibited cells: -70.3 ± 13.0 %, $p < 0.01$, exact Wilcoxon signed rank test; and excited cells: -90.3 ± 7.3 %, $p < 0.01$, exact Wilcoxon signed rank test). We then intravenously injected the D2-R antagonist eticlopride (1mg/kg), which reversed the quinpirole-induced inhibition but blocked further activation of D2-Rs, and subsequently performed a second nicotine injection (Figure 5A).

Blockade of D2-R abolished the inhibition following nicotine administration (Figure 5B-C, mean response before blockade: -44.8 ± 11.1 %, $p < 0.01$, exact Wilcoxon signed rank test; and after blockade: -2.4 ± 7.2 %, $p > 0.05$, exact Wilcoxon signed rank test; difference between the maximal amplitude of the two responses: 49.25 ± 16.5 %, $p < 0.01$, exact Wilcoxon rank sum test) but did not change the nicotine-induced excitation (Figure 5B-C, mean response before blockade: 20.5 ± 4.9 %, $p < 0.01$, exact Wilcoxon signed rank test; and after: 20.2 ± 6.4 %, $p > 0.05$, exact Wilcoxon signed rank test; difference between the maximal amplitude of the two responses: -1.3 ± 8.6 %, $p > 0.05$, exact Wilcoxon rank sum test). Thus the observed nicotine-induced inhibition, but not excitation, is mediated by D2-Rs.

Co-inhibition and co-excitation of DA cells by ethanol

If medial inhibition to nicotine is due to an intra-VTA DA release following excitation of the lateral VTA, then it should not be specific to nicotine but should also be observed with other paradigms that increase DA neuron activity. Like nicotine, ethanol's rewarding properties also involve an increase of dopamine release, thought to be mediated by its effects on ionotropic receptors (Lüscher and Ungless, 2006). We tested the response of DA VTA neurons to an intravenous injection of a reinforcing dose of ethanol (500mg/kg). We found that DA neurons were either excited or inhibited by ethanol (Figure 6). These results contrast with those from previous studies (Gessa et al., 1985; Mereu et al., 1984), which, similarly to nicotine, report a uniform activation of DA neurons by ethanol. We recorded DAergic activity during successive injections of ethanol and nicotine ($n=60$). Our results demonstrate that neurons excited ($n=38$) and inhibited ($n=22$) by ethanol were also respectively excited and inhibited by nicotine (Figure 6). They indicate that the balance of inhibition and excitation of VTA DA

neurons can be extended to other drugs, in particular drugs that act via ionotropic receptors at the level of the VTA, suggesting a common mechanism underlying initiation of addiction processes.

Discussion

The present work shows that a subpopulation of VTA DA neurons is inhibited by nicotine *in vivo*. This subpopulation cannot be distinguished from excited neurons by examination of spontaneous electrophysiological activity, including firing frequency, burst firing, distribution of ISI, coefficient of variation of the firing, and action potential shape. However, inhibited cells are anatomically segregated in the medial part of the VTA, without segregation over antero-posterior and dorso-ventral axes. We identify the mechanism of this inhibition as being due to an intra-VTA DA release and subsequent activation of D2-Rs. Finally, we show that this dichotomy of VTA DA neurons can be extended to other drugs of abuse such as ethanol.

In addition to DA neurons, the VTA contains about 40% of non-DAergic neurons(Nair-Roberts et al., 2008). These are mainly GABAergic but an additional subpopulation of purely glutamatergic neurons as well as mixed DA and glutamate co-releasing neurons have been identified in the medial part of the VTA(Hnasko et al., 2012; Kawano et al., 2006; Yamaguchi et al., 2011), which emphasizes the importance of precise identification of recorded neurons(Margolis et al., 2008; Ungless and Grace, 2012). We identified DA neurons based on their location as well as on the set of unique electrophysiological properties that characterize these cells *in vivo*. These criteria were further reinforced by a D2 pharmacology (see methods), but a series of papers suggest that this can lead to an important false identification of DA neurons(Margolis et al., 2010; Zhang et al., 2010). TH immunolabeling is a recognized gold-standard for identifying VTA DA neurons. We thus performed a series of juxtacellular labelling with neurobiotin and post-hoc TH immunocytochemistry (ICC), that allows us to identify our cells as dopaminergic and furthermore to localize them in the VTA. Overall, 51 cells with standard electrophysiological criteria have been labelled by neurobiotin. For 3 of them only (5.5%, 1 inhibited and 2 excited), TH ICC was negative. We nevertheless considered these cells as dopaminergic. Indeed ICC can be unreliable and false negative results seem to be common(Zhang et al., 2010) due to leakage of the cell's internal solution after its electroporation. The risk of a false identification of DA cells in our studies is thus certainly far less than 5%. In addition, our results are in contradiction with previous studies reporting that medially located VTA DA neurons do not respond to D2R pharmacology *in vitro*(Lammel et al., 2008). Indeed, out of 16 neurons inhibited by nicotine and labelled in the medial VTA, 5 of them have been exposed to quinpirole, all of which were inhibited.

Three mechanisms can be hypothesized to explain the inhibition of VTA DA cells: i) excitation of inhibitory GABAergic neurons; ii) D2-R activation following somatodendritic release of dopamine; iii) a network effect involving an inhibitory feedback loop coming from DA neuron projection areas. In previous studies, the cellular and behavioral effects of nicotine were shown to critically rely on the expression of the high affinity $\beta 2$ nAChR in the VTA(Mameli-Engvall et al., 2006; Maskos et al., 2005; Tolu et al., 2013). Indeed, in $\beta 2$ -/- KO mice, VTA DA responses to nicotine as well as sensitivity to nicotine-mediated reward are abolished. However, re-expressing the high affinity $\beta 2$ nAChR subunit specifically in VTA DA neurons partially restores these effects, but more compellingly inhibitory responses to nicotine are restored as well(Tolu et al., 2013). This strongly suggests that nicotinic activation of GABA neurons is not implicated in the nicotine-induced inhibition of DA neurons. In contrast, we have shown that this inhibition is mediated by D2Rs, which therefore implicates

either an intra-VTA somatodendritic release of dopamine by neurons activated by nicotine, or a network effect with inhibitory feedback. Several studies report D2R-mediated IPSCs in DA VTA cells following stimulation (Beckstead et al., 2004; Ford et al., 2010; 2009). The time scale of the inhibition described in these studies shows that the interval between excitation of the lateral DA cells and inhibition of the medial VTA cannot be distinguished with the temporal resolution allowed by juxtacellular electrophysiological methods, which explains why both responses seem to be simultaneous in our experiments.

Inhibition and excitation following nicotine exposure are not mediated by different membrane properties. Indeed, we could not find differences in currents elicited in medial and lateral VTA DA neurons by application of a nicotinic agonist in slice, suggesting that inhibition does not rely on differences in the expression of nicotinic receptors. To our knowledge there is no evidence of a specific inhibitory feedback to medial VTA cells. However, differences in D2-R and DAT expression have been suggested. We show that the firing of medial and lateral VTA neurons is similarly suppressed by D2-R agonists, suggesting that variations of D2-R expression do not explain our results. This could reflect the fact that dopamine reuptake by DATs varies along the mediolateral axis of the VTA (Fu et al., 2011; Lammel et al., 2008). Reduced DAT expression in the medial VTA could consequently result in reduced DA reuptake and in a prolonged rise of extracellular DA. Thus, nicotinic receptor mediated excitation is counterbalanced by a stronger D2R-mediated inhibition.

These data are consistent with previous studies suggesting that different subpopulations of the DA system have distinct functional roles. Such considerations often implicate the mesocortical versus the mesolimbic pathways. Lammel and colleagues showed that VTA DA neurons projecting to the prefrontal cortex (PFC) are located in the medial part of the VTA, while neurons projecting to the nucleus accumbens (NAc) are located throughout the VTA (Lammel et al., 2008). This would suggest that nicotine exerts its complex effects by sending opposing signals to different regions of the brain. Whereas the functional significance of the excitation of the mesolimbic circuit has thoroughly been investigated and clearly plays an important role in reinforcement, the significance of a reduction of DA release in the PFC has yet to be addressed. However, elevation of extracellular DA in the PFC has been linked to stimuli of negative motivational valence leading to aversion or anxiety (Bassareo et al., 1996). Therefore it could be presumed that a decrease in PFC dopamine release results in motivationally positive phenotypes such as reduced anxiety, or even that it promotes impulsive behavior by disrupting inhibitory control over limbic regions. Overall, the relative contributions of the different VTA dopaminergic pathways to the instatement of addiction still remain elusive, but our results show that in contrast to what has been previously expected, VTA DA neurons do not respond uniformly to drugs of abuse such as nicotine and ethanol. These results further emphasize the complexity and diversity of the VTA, and demonstrate that the response to these drugs is most certainly built onto this diversity. We suggest that the reported process of excitation/inhibition of VTA DA cells, and the resulting alteration of dopamine release in target areas, isn't limited to drug effects but could be generalized to other functions of the VTA. Thus, this new subpopulation of DA neurons should contribute to the reinforcing effects of drugs, and could also critically contribute to reward-related behaviors.

Experimental Procedures

Animals

Experiments were performed on adult C57BL/6 male mice aged 8–21 weeks and weighing 25–35 grams. Animal care and experiments were conducted in accordance with European Ethical Committee guidelines, and all efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

In vivo electrophysiological recordings of VTA DA neurons

Extracellular single-cell recordings were performed in adult C57BL/6 male mice. Mice were deeply anaesthetized with chloral hydrate (8%), 400 mg/kg i.p., supplemented as required to maintain optimal anesthesia throughout the experiment. Glass electrodes containing 1.5% neurobiotin in 0.5% sodium acetate were lowered in the VTA according to stereotaxic coordinates derived from mouse brain atlas, and corrected empirically (antero-posterior : -3 to -4 mm ; medio-lateral : 0.1 to 0.7 mm ; dorso-ventral : -4 to -4,8 mm from bregma). Putative DA cells were identified according to the following parameters: 1) firing rate comprised between 1 and 10 Hz; 2) action potential duration between the beginning and the negative trough superior to 1.1 ms. These electrophysiological properties distinguish DA from non-DA neurons (Ungless et al., 2004). After a baseline recording of 5 minutes, a 10µl saline solution (0.9% sodium chloride) was injected into the saphenous vein, and after another 5 minutes, injection of 0.5mM nicotine tartrate (Sigma, USA, 30µg/kg concentration of nicotine base in a final volume of 10µl) was administered via the same route. Previous studies showed that nicotine can be intravenously self-administered at this dose in mice (Picciotto et al., 1995). For ethanol injections, the solution was prepared as follows: Ethanol 96% (Millipore, France) was diluted to 20% (v/v) in physiological solution and then injected in a volume proportional to the dose (500mg/Kg). The group of identified DA neurons comprised immunocytochemically labelled TH positive DA neurons, and putative DA neurons inhibited by quinpirole (n=20). Neurons that were labelled out of the VTA, or unlabelled neurons that did not inhibit in response to quinpirole were excluded. Non-responding neurons were not taken into account in the analysis. Neurons analysed for responses to aversive stimuli were allowed a return to baseline activity before proceeding to 2 to 3 sec long pinches of the forepaw or the tail. Response to pinches was measured as the change in firing rate (Hz) from a 10 sec baseline before the pinch compared to 5 sec following the onset of the pinch.

Immunocytochemical identification of recorded neurons and anatomical positioning

At the end of the recording, the neuron was electroporated and neurobiotin was expelled from the electrode using positive current pulses (Pinault, 1996). The mouse was then killed and the brain post-fixed in 4% paraformaldehyde. 60µm slices were cut on a vibratome and immunolabeling allowed to assess the TH-positive phenotype of the recorded neuron. Photomicrographs were taken to allow precise anatomical positioning of the labelled neurons.

Examination of coronal slice shape and dopaminergic nuclei aspect, and comparison with serial coronal slices and Paxinos atlas schematics allowed to identify the antero-posterior level. The labelled neuron was then positioned as a dot on the schematic. Dorso-ventral and medio-lateral coordinates were precisely measured on the schematic according to the atlas benchmarks. Finally, all coronal diagrams were superimposed and all neurons were represented on the same coronal schematic.

Pharmacological experiments

Quinpirole hydrochloride, eticlopride hydrochloride, and gabazine (SR 95531 hydrobromide) were purchased from Tocris Bioscience. (-)-Nicotine hydrogen tartrate salt was purchased from Sigma-Aldrich.

15 minutes after the first nicotine injection, quinpirole 1 mg/kg was administered intravenously. Inhibition of the neuron occurred within seconds. 5 minutes later, eticlopride 1 mg/kg was administered intravenously. Disinhibition developed slowly during the following few minutes. 5 to 10 minutes after eticlopride injection, when the neuron activity was returned to baseline, a second nicotine injection was performed. Preliminary tests showed that eticlopride mediated D2-R blockade lasted for more than one hour after injection (data not shown).

Whole cell recordings

Male adult mice were deeply anesthetized by a mix of ketamine and xylazine. Coronal midbrain sections (250 μ m) were sliced using a vibratome (VT1000S; Leica) after intracardial perfusion of cold (4°C) artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing (in mM): 126 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 6 MgCl₂, 26 NaHCO₃, 25 sucrose, 2.5 Glucose, 1 Kynureate (pH 7.2, 325 mosM). After 1h at 37°C for recovery, individual slices were transferred to a recording chamber and continuously superfused at 2 ml/min with oxygenated ACSF containing (in mM) : 126 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 26 NaHCO₃, 15 sucrose, 10 Glucose (pH 7.2, 325 mosM) at room temperature. Patch pipettes (3–6 M Ω) were pulled from borosilicate glass (Harvard Apparatus LTD, Kent, UK) on a micropipette puller (Model PP-83, Narishige, Tokyo, Japan) and filled with 8 μ l of internal solution containing (in mM): 144 K-gluconate, 3 MgCl₂, 10 HEPES, 0.5 EGTA and 3 mg/mL biocytin.). Whole-cell recordings were performed using a patch-clamp amplifier (Multiclamp 700B, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) connected to a Digidata 1440A interface board (Molecular Devices). Signals were amplified and collected using the data-acquisition software pClamp 10.2 (Molecular Devices). DMPP (100 μ M, sigma) was applied through a local perfusion system in the presence of a cocktail of antagonists: 6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX, 10 μ M), 2-amino-5-phosphonovalerate (APV, 50 μ M), Gabazine (GBZ, 1 μ M), , haloperidol (2 μ M), atropine (8 μ M) from Sigma (Saint Louis, MO) and CGP55845 (4 μ M) from Tocris (Bristol, GB).

Fast-scan cyclic voltammetry

Changes in dopamine concentration were assessed by fast-scan cyclic voltammetry (Robinson et al., 2003). Phasic dopamine release triggered by nicotine was detected using carbon-fiber microelectrodes and voltammetric amplifier (EVA8, HEKA Elektronik, Germany). Recordings were performed sequentially from the medial and lateral regions of VTA within the same brain slice. The potential at the carbon fiber microelectrode was held at -0.4 V versus the reference electrode and then ramped to +1.0 V (oxidation) and back to -0.4 V (reduction) (311 V/s) every 100 ms (10 Hz). The cyclic voltammograms provided a chemical signature that enabled the identification of dopamine variation relative to standards. Wave form generation and data acquisition were carried out on a data acquisition system (LIH8+8 interface and Patchmaster software, HEKA Elektronik, Germany) coupled to a voltammetric amplifier (EVA8, HEKA Elektronik, Germany).

Statistical analyses

Measurement of neuronal activity.

The analyses were led using the R software (cite R). Activity was quantified on overlapping 60 second windows shifted every 15 seconds. Percentage of spikes within bursts (%SWB) corresponds to the percentage of spikes discharged within a burst in a given time interval. Firing frequency response was quantified as a percentage of variation from baseline and %SWB response was quantified as a difference of percentage from baseline.

Subpopulations in response to nicotine.

Subpopulations of nicotine response were automatically classified using variation of firing frequency and the following routine: considering the maximal variation from a short baseline (2 minutes just prior to injection), within 3 minutes after injection, neurons displaying a more prominent increase were defined as “excited”, neurons displaying a more prominent decrease were defined as “inhibited”, and neurons displaying no variation (maximal variation from baseline < 5%) were defined as “non-responding” and were not taken into account in this study. A subsequent individual verification was led to assess that this threshold allowed relevant segregation of responses.

Subpopulations of spontaneous activity.

Subpopulations of spontaneous activity were classified using auto-correlograms and return maps made from ISI extracted from the stable baseline period, as performed in (cite fabricius10, marti07). Neurons displaying 3 or more regularly occurring peaks in their autocorrelogram were classified as “regularly discharging”. Neurons displaying more than 10% of spontaneous SWB, a peak in the short intervals of the autocorrelogram, and a return map containing a cluster in the short ISI regions were classified as “bursting”. Other neurons were classified as “irregularly discharging”.

Quantification of responses to nicotine.

The mean of 3 minutes of activity just prior to injection was taken as the value of baseline activity, for each neuron. For excited (respectively inhibited) neurons, the maximal (respectively minimal) value of the activity was measured within the baseline period (3 minutes) and within the response period (3 minutes). These two sets of values did not display normal distributions, and were then compared with paired non-parametric Wilcoxon signed-rank test. The peak of response to nicotine occurred within 2 minutes, and was thus correctly assessed by the use of 3 minutes periods.

Quantification of responses to D2-R pharmacology.

Response to quinpirole was quantified in a manner analogous to nicotine response. Response to quinpirole occurred within tens of seconds. Effect of eticlopride developed slower, and was quantified as the mean activity during the 3 minutes preceding the second nicotine injection. This period was compared to a 3-minute baseline period preceding quinpirole injection. This allowed assessing the effects of eticlopride on the baseline activity of the neuron. The pre-quinpirole and post-eticlopride periods activities being normal, they were compared with a paired Student's t-test.

Anatomical segregation.

For both populations of neurons (excited and inhibited), normality of the distribution of positions was assessed with a Shapiro-Wilk normality test. Normal distributions were compared with a Student's t-test, and non-normal distributions with a Wilcoxon test.

Acknowledgements

We would like to thank Bruno Giros for helpful comments on the manuscript. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique CNRS UMR 7102 and ATIP programme, the Agence Nationale pour la Recherche (ANR Neuroscience, Neurologie et Psychiatrie 2009, and ANR BLANC 2009), the Neuropole de Recherche Francilien (NeRF) of Ile de France, the Bettencourt Schueller Foundation, Ecole des Neurosciences de Paris (ENP), The laboratories of Philippe Faure, Laurent Venance and Bertrand Lambollez are part of the École des Neurosciences de Paris Ile-de-France RTRA network. P.F. is member of the Laboratory of Excellence, LabEx Bio-Psy.

References

- Bassareo, V., Tanda, G., Petromilli, P., Giua, C., and Di Chiara, G. (1996). Non-psychostimulant drugs of abuse and anxiogenic drugs activate with differential selectivity dopamine transmission in the nucleus accumbens and in the medial prefrontal cortex of the rat. *Psychopharmacology* *124*, 293–299.
- Beckstead, M.J., Grandy, D.K., Wickman, K., and Williams, J.T. (2004). Vesicular Dopamine Release Elicits an Inhibitory Postsynaptic Current in Midbrain Dopamine Neurons. *Neuron* *42*, 939–946.
- Brischoux, F., Chakraborty, S., Brierley, D.I., and Ungless, M.A. (2009). Phasic excitation of dopamine neurons in ventral VTA by noxious stimuli. *Pnas* *106*, 4894–4899.
- Bromberg-Martin, E.S., Matsumoto, M., and Hikosaka, O. (2010). Dopamine in motivational control: rewarding, aversive, and alerting. *Neuron* *68*, 815–834.
- Brown, M.T.C., Henny, P., Bolam, J.P., and Magill, P.J. (2009). Activity of neurochemically heterogeneous dopaminergic neurons in the substantia nigra during spontaneous and driven changes in brain state. *Journal of Neuroscience* *29*, 2915–2925.
- Di Chiara, G., and Imperato, A. (1988). Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Pnas* *85*, 5274–5278.
- Erhardt, S., Schwieler, L., and Engberg, G.R. (2002). Excitatory and inhibitory responses of dopamine neurons in the ventral tegmental area to nicotine. *Synapse* *43*, 227–237.
- Ford, C.P., Gantz, S.C., Phillips, P.E.M., and Williams, J.T. (2010). Control of Extracellular Dopamine at Dendrite and Axon Terminals. *Journal of Neuroscience* *30*, 6975–6983.
- Ford, C.P., Phillips, P.E.M., and Williams, J.T. (2009). The Time Course of Dopamine Transmission in the Ventral Tegmental Area. *Journal of Neuroscience* *29*, 13344–13352.
- Fowler, C.D., Lu, Q., Johnson, P.M., Marks, M.J., and Kenny, P.J. (2011). Habenular α 5 nicotinic receptor subunit signalling controls nicotine intake. *Nature*.
- Fu, Y., Yuan, Y., Halliday, G., Rusznák, Z., Watson, C., and Paxinos, G. (2011). A cytoarchitectonic and chemoarchitectonic analysis of the dopamine cell groups in the substantia nigra, ventral tegmental area, and retrorubral field in the mouse. *Brain Struct Funct* *217*, 591–612.

- Gessa, G.L., Muntoni, F., Collu, M., Vargiu, L., and Mereu, G. (1985). Low doses of ethanol activate dopaminergic neurons in the ventral tegmental area. *Brain Research* 201–203.
- Grenhoff, J., Aston-Jones, G., and Svensson, T.H. (1986). Nicotinic effects on the firing pattern of midbrain dopamine neurons. *Acta Physiol Scand* 128, 351–358.
- Hnasko, T.S., Hjelmstad, G.O., Fields, H.L., and Edwards, R.H. (2012). Ventral Tegmental Area Glutamate Neurons: Electrophysiological Properties and Projections. *Journal of Neuroscience* 32, 15076–15085.
- Kawano, M., Kawasaki, A., Sakata-Haga, H., Fukui, Y., Kawano, H., Nogami, H., and Hisano, S. (2006). Particular subpopulations of midbrain and hypothalamic dopamine neurons express vesicular glutamate transporter 2 in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 498, 581–592.
- Lacey, M.G., Mercuri, N.B., and North, R.A. (1987). Dopamine acts on D2 receptors to increase potassium conductance in neurones of the rat substantia nigra zona compacta. *The Journal of Physiology*.
- Lammel, S., Hetzel, A., Häckel, O., Jones, I., Liss, B., and Roeper, J. (2008). Unique Properties of Mesoprefrontal Neurons within a Dual Mesocorticolimbic Dopamine System. *Neuron* 57, 760–773.
- Lammel, S., Ion, D.I., Roeper, J., and Malenka, R.C. (2011). Projection-Specific Modulation of Dopamine Neuron Synapses by Aversive and Rewarding Stimuli. *Neuron* 70, 855–862.
- Lammel, S., Lim, B.K., and Malenka, R.C. (2013). Reward and aversion in a heterogeneous midbrain dopamine system. *Neuropharmacology*.
- Laviolette, S.R., and van der Kooy, D. (2004). The neurobiology of nicotine addiction: bridging the gap from molecules to behaviour. *Nat Rev Neurosci* 5, 55–65.
- Lüscher, C., and Ungless, M.A. (2006). The Mechanistic Classification of Addictive Drugs. *Plos Med* 3, e437.
- Mameli-Engvall, M., Evrard, A., Pons, S., Maskos, U., Svensson, T.H., Changeux, J.-P., and Faure, P. (2006). Hierarchical Control of Dopamine Neuron-Firing Patterns by Nicotinic Receptors. *Neuron* 50, 911–921.
- Margolis, E.B., Mitchell, J.M., Ishikawa, J., Hjelmstad, G.O., and Fields, H.L. (2008). Midbrain Dopamine Neurons: Projection Target Determines Action Potential Duration and Dopamine D2 Receptor Inhibition. *Journal of Neuroscience* 28, 8908–8913.
- Margolis, E.B., Coker, A.R., Driscoll, J.R., Lemaître, A.-I., and Fields, H.L. (2010). Reliability in the Identification of Midbrain Dopamine Neurons. *PLoS ONE* 5, e15222.
- Marti, F., Arib, O., Morel, C., Dufresne, V., Maskos, U., Corringier, P.-J., de Beaurepaire, R., and Faure, P. (2011). Smoke Extracts and Nicotine, but not Tobacco Extracts, Potentiate Firing and Burst Activity of Ventral Tegmental Area Dopaminergic Neurons in Mice. *Neuropsychopharmacology* 36, 2244–2257.
- Maskos, U., Molles, B.E., Pons, S., Besson, M., Guiard, B.P., Guilloux, J.P., Evrard, A., Cazala, P., Cormier, A., Mameli-Engvall, M., et al. (2005). Nicotine reinforcement and cognition restored by targeted expression of nicotinic receptors. *Nature* 436, 103–107.

- Matsumoto, M., and Hikosaka, O. (2009). Two types of dopamine neuron distinctly convey positive and negative motivational signals. *Nature* 459, 837–841.
- Mereu, G., Fadda, F., and Gessa, G.L. (1984). Ethanol stimulates the firing rate of nigral dopaminergic neurons in unanesthetized rats. *Brain Research* 292, 63–69.
- Nair-Roberts, R.G., Chatelain-Badie, S.D., Benson, E., White-Cooper, H., Bolam, J.P., and Ungless, M.A. (2008). Stereological estimates of dopaminergic, GABAergic and glutamatergic neurons in the ventral tegmental area, substantia nigra and retrorubral field in the rat. *Neuroscience* 152, 1024–1031.
- Paxinos, G., and Franklin, K. (2004). The mouse brain in stereotaxic coordinates.
- Picciotto, M.R., Zoli, M., Léna, C., Bessis, A., Lallemand, Y., Le Novère, N., Vincent, P., Pich, E.M., Brûlet, P., and Changeux, J.-P. (1995). Abnormal avoidance learning in mice lacking functional high-affinity nicotine receptor in the brain. *Nature* 374, 65–67.
- Pinault, D. (1996). A novel single-cell staining procedure performed in vivo under electrophysiological control: morpho-functional features of juxtacellularly labeled thalamic cells and other central neurons with biocytin or Neurobiotin. *J. Neurosci. Methods* 65, 113–136.
- Tan, K.R., Yvon, C., Turiault, M., Mirzabekov, J.J., Doehner, J., Labouèbe, G., Deisseroth, K., Tye, K.M., and Lüscher, C. (2012). GABA Neurons of the VTA Drive Conditioned Place Aversion. *Neuron* 73, 1173–1183.
- Tolu, S., Eddine, R., Marti, F., David, V., Graupner, M., Pons, S., Baudonnat, M., Husson, M., Besson, M., Reperant, C., et al. (2013). Co-activation of VTA DA and GABA neurons mediates nicotine reinforcement. *Mol. Psychiatry* 18, 382–393.
- Ungless, M.A., and Grace, A.A. (2012). Are you or aren't you? Challenges associated with physiologically identifying dopamine neurons. *Trends in Neurosciences* 35, 422–430.
- Ungless, M.A., Magill, P.J., and Bolam, J.P. (2004). Uniform inhibition of dopamine neurons in the ventral tegmental area by aversive stimuli. *Science* 303, 2040–2042.
- van Zessen, R., Phillips, J.L., Budygin, E.A., and Stuber, G.D. (2012). Activation of VTA GABA Neurons Disrupts Reward Consumption. *Neuron* 73, 1184–1194.
- Yamaguchi, T., Wang, H.L., Li, X., Ng, T.H., and Morales, M. (2011). Mesocorticolimbic Glutamatergic Pathway. *Journal of Neuroscience* 31, 8476–8490.
- Zhang, T.A., Placzek, A.N., and Dani, J.A. (2010). In vitro identification and electrophysiological characterization of dopamine neurons in the ventral tegmental area. *Neuropharmacology* 59, 431–436.

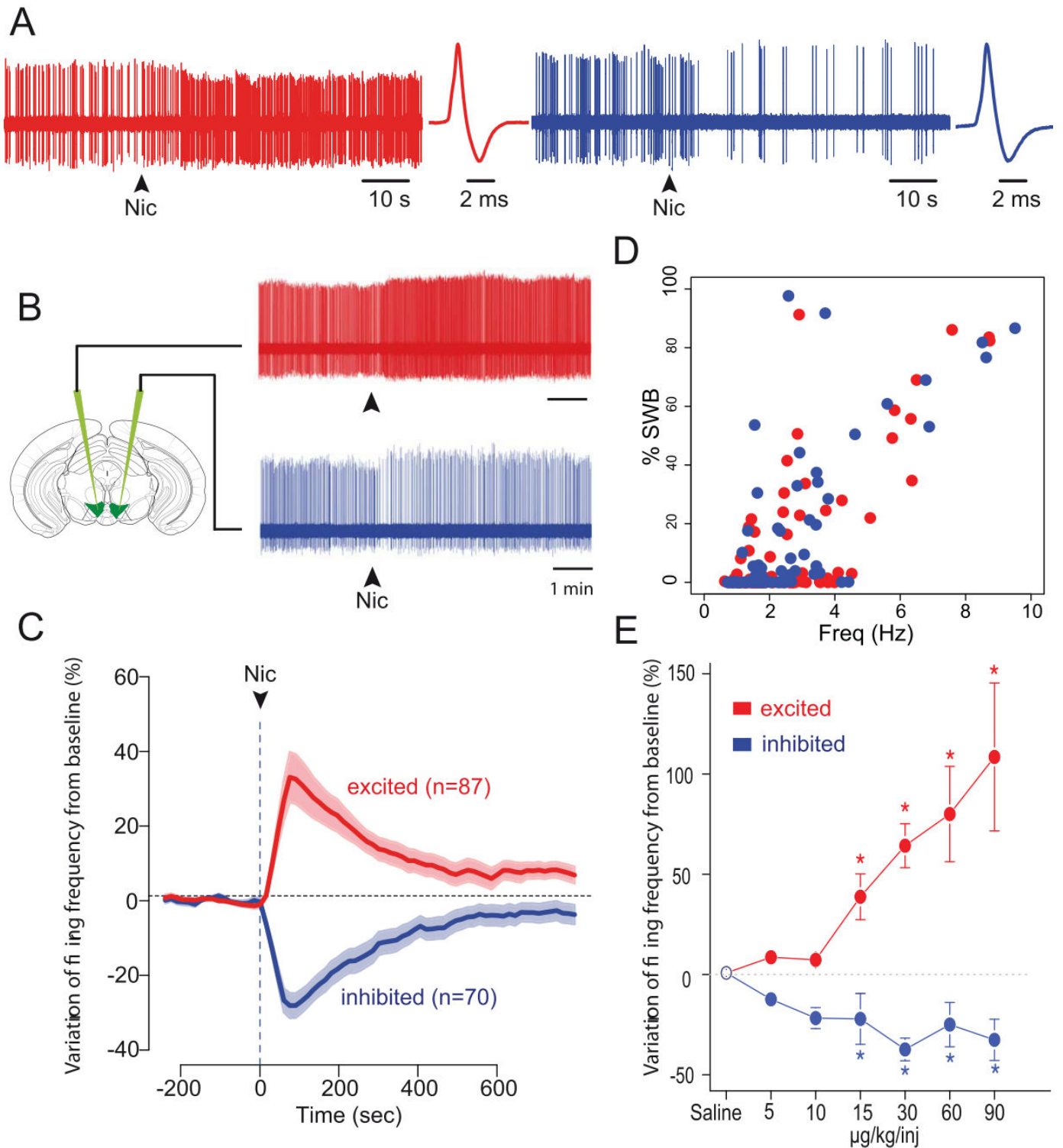


Figure 1 — A subpopulation of VTA DA neurons is inhibited by nicotine.

A. Raw single cell extracellular recordings of an excited (top) and an inhibited VTA DA neuron (bottom) at the time of nicotine (30 $\mu\text{g}/\text{kg}$) intravenous injection (indicated by arrowheads). Corresponding wide action potentials, typical of DA neurons, are displayed on the right. **B.** Mean responses of excited (red, $n = 87$) and inhibited (blue, $n = 70$) VTA DA neurons. Data, expressed as variation of firing frequency from baseline, are presented as mean (thick curves) \pm SEM (dotted curves). Arrowhead represents the time of nicotine injection. **C** — Spontaneous activity of excited and inhibited neurons, represented by their mean firing frequency (Hz) against the percentage of spikes within a burst (%SWB).

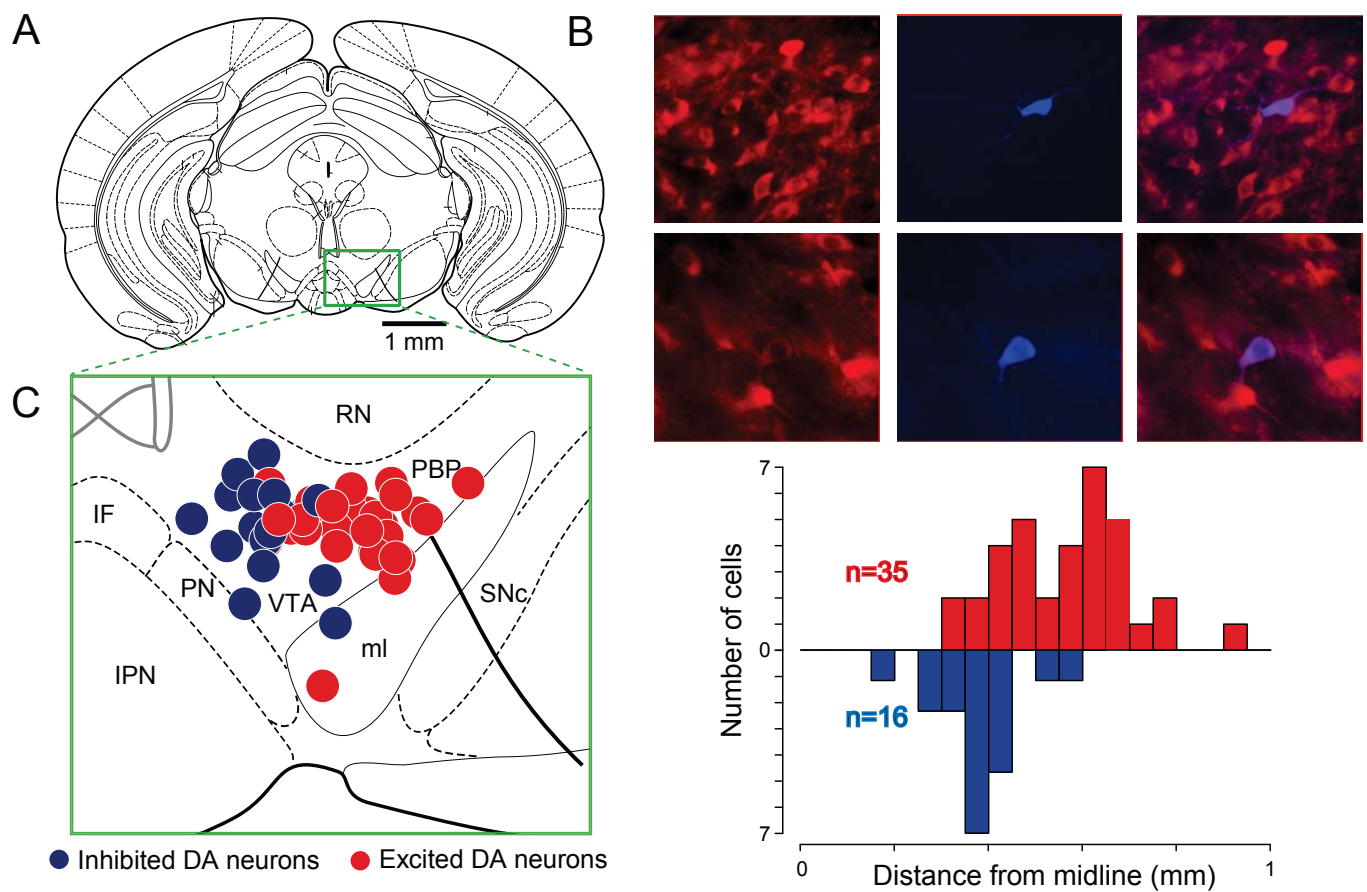


Figure 2 — Inhibited DA neurons are located in the medial part of the VTA.

A. Coronal diagram at - 3.52 mm from bregma onto which are positioned the labelled cells. The rectangular area is magnified in part C. The schematic is extracted from (Paxinos and Franklin, 2004). **B.** Photomicrographs of two representative TH-positive (left) and neurobiotin-stained (middle) VTA DA neurons, one excited by nicotine (top), and the other inhibited (bottom). A merge micrograph (right) validates the DA phenotype of the recorded neuron. **C.** (Left) Anatomical localization of TH-positively labelled cells. Red and blue dots respectively represent excited (n = 35) and inhibited (n = 19) cells. Abbreviations: IF, interfascicular nucleus; IPN, interpeduncular nucleus; ml, medial lemniscus; PBP, parabrachial pigmented nucleus; PN, paranigral nucleus; RN, red nucleus; SNc, substantia nigra compacta; VTA, ventral tegmental area. (Right) Histogram of the labelled cells' anatomical distribution along the medio-lateral axis.

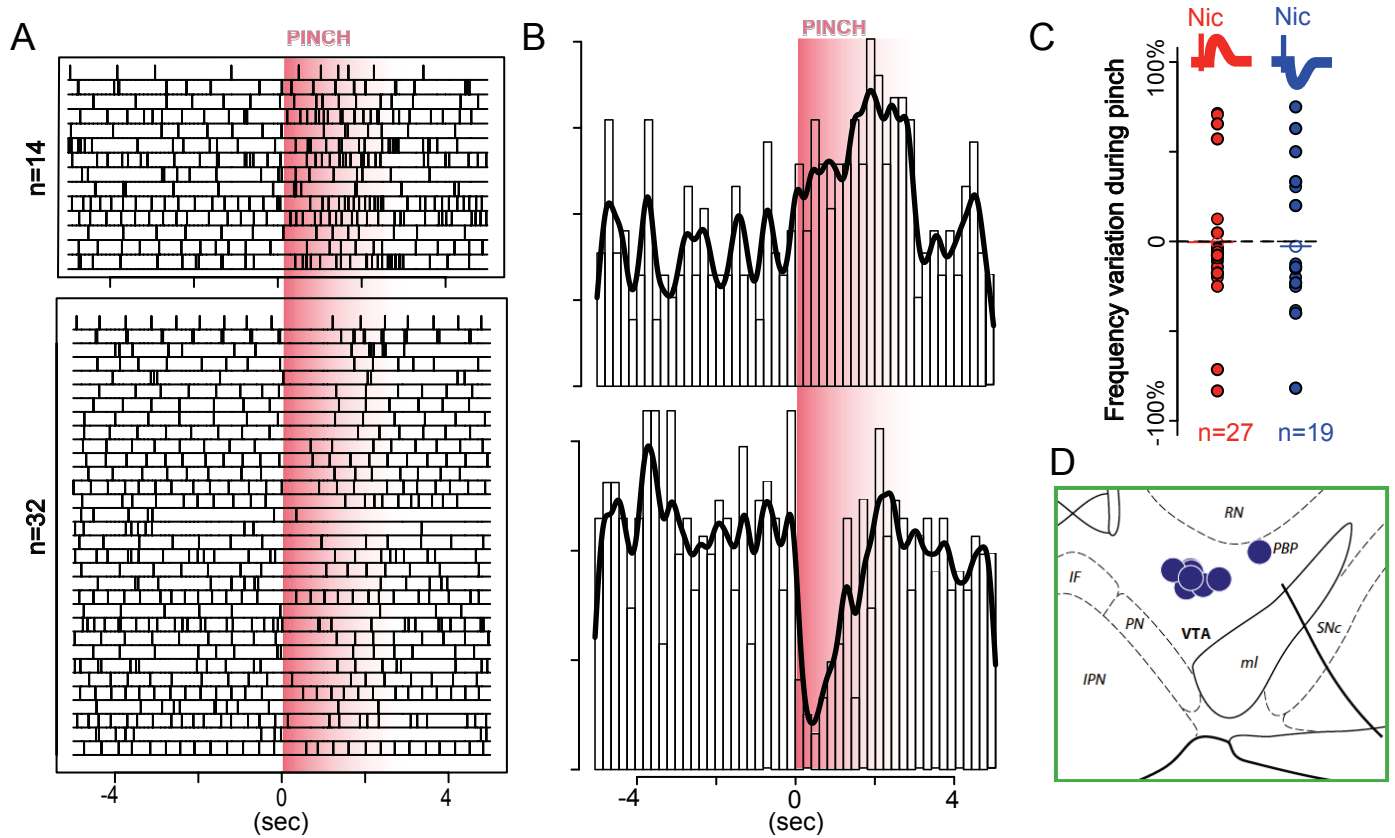


Figure 3. — **Inhibition and excitation of DA neurons in response to noxious stimuli**

A. Raster plots of neurons showing an activated response (top, n=14) and an inhibited response (bottom, n=35) in response to a pinch. **B.** Population peristimulus time histogram (200ms bins) of activated neurons (top) and inhibited neurons (bottom). **C.** Frequency variation of neurons excited by nicotine (red, n=27) and inhibited by nicotine (blue, n=19) in response to a pinch. **D.** Anatomical localizations of neurons inhibited by a pinch (n=8).

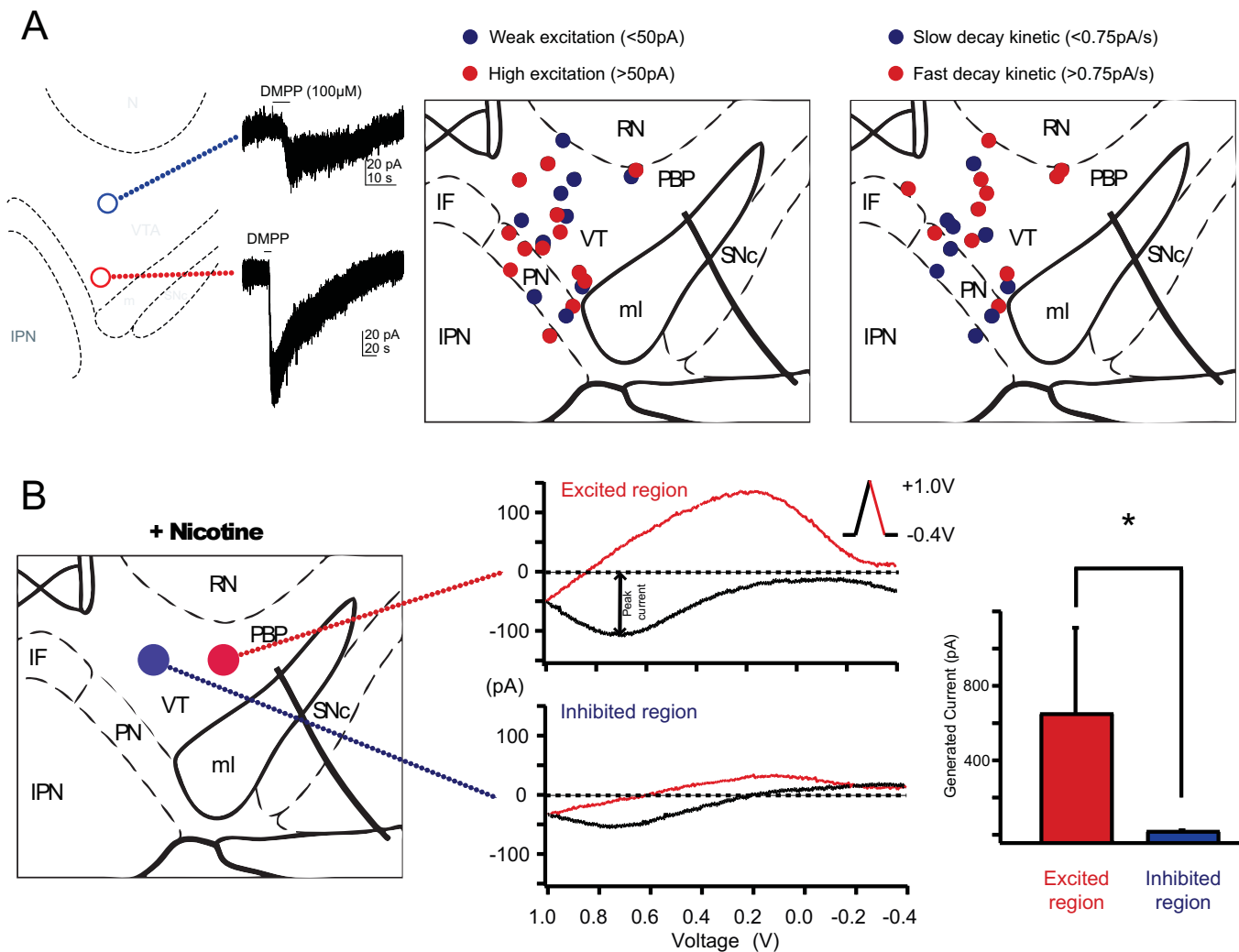


Figure 4. — *in vitro* analysis of intrinsic nicotinic responses of VTA DA and of intra-VTA DA release

A. Electrophysiological recordings of nicotinic currents induced by local application of DMPP (100 μ M) in DA neurons throughout the VTA. Post-hoc labelling of recorded neurons show that nicotinic current amplitude does not depend on the localisation of the neuron in the VTA. **B.** Dopamine release measured by fast-scan cyclic voltammetry technique in medial and lateral regions of the VTA. Peak value of oxidation current is generated as the evaluation parameter of the dopamine release (D). Experiments have been performed in 6 brain slices in both medial and lateral VTA regions.

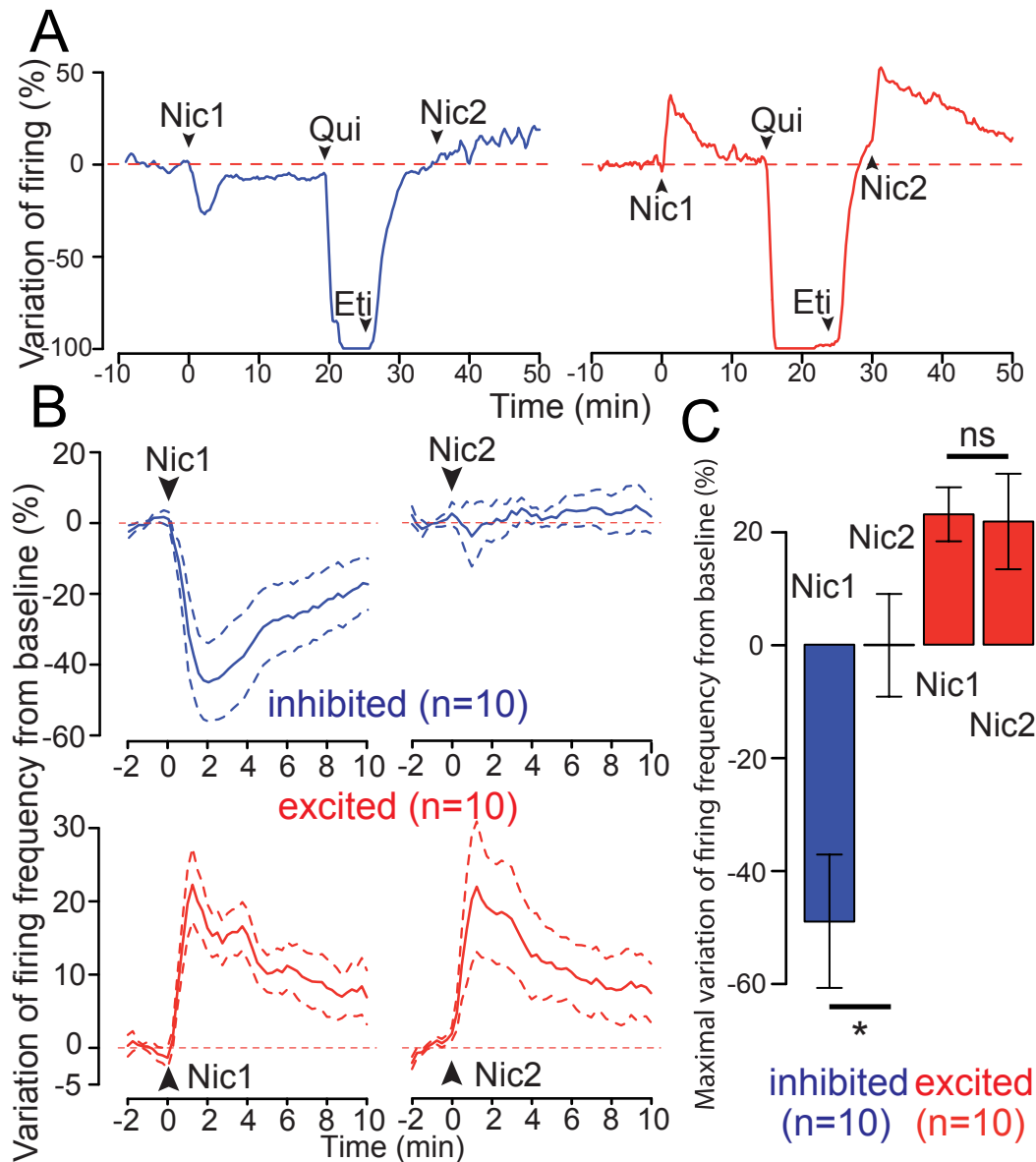


Figure 5. — **Abolition of nicotine inhibition but not excitation following D2-R blockade.**

A. Example responses of an inhibited (top) and an excited (bottom) VTA DA neuron. Nic1, Nic2, Qui and Eti labelled arrowheads respectively represent the times of the first nicotine, second nicotine (both at $30\mu\text{g/kg}$), quinpirole (1mg/kg), and eticlopride (1mg/kg) intravenous injections. Red dotted lines represent baseline activity levels. **B.** Mean responses to nicotine injection before (Nic1, left) and after (Nic2, right) D2 receptor (D2-R) blockade, in inhibited (top, $n=10$) and excited (bottom, $n=10$) DA neurons. Data are presented as mean (thick curves) \pm SEM (dotted curves). Red dotted lines represent baseline activity levels. **C.** Comparison of the maximal variation of firing frequency after nicotine injection before (Nic1) and after (Nic2) D2-R blockade, in inhibited (left, blue, $n=10$) and excited (right, red, $n=10$) DA neurons. Bars represent mean \pm SEM ; ** : $p < 0.01$; ns : $p > 0.05$.

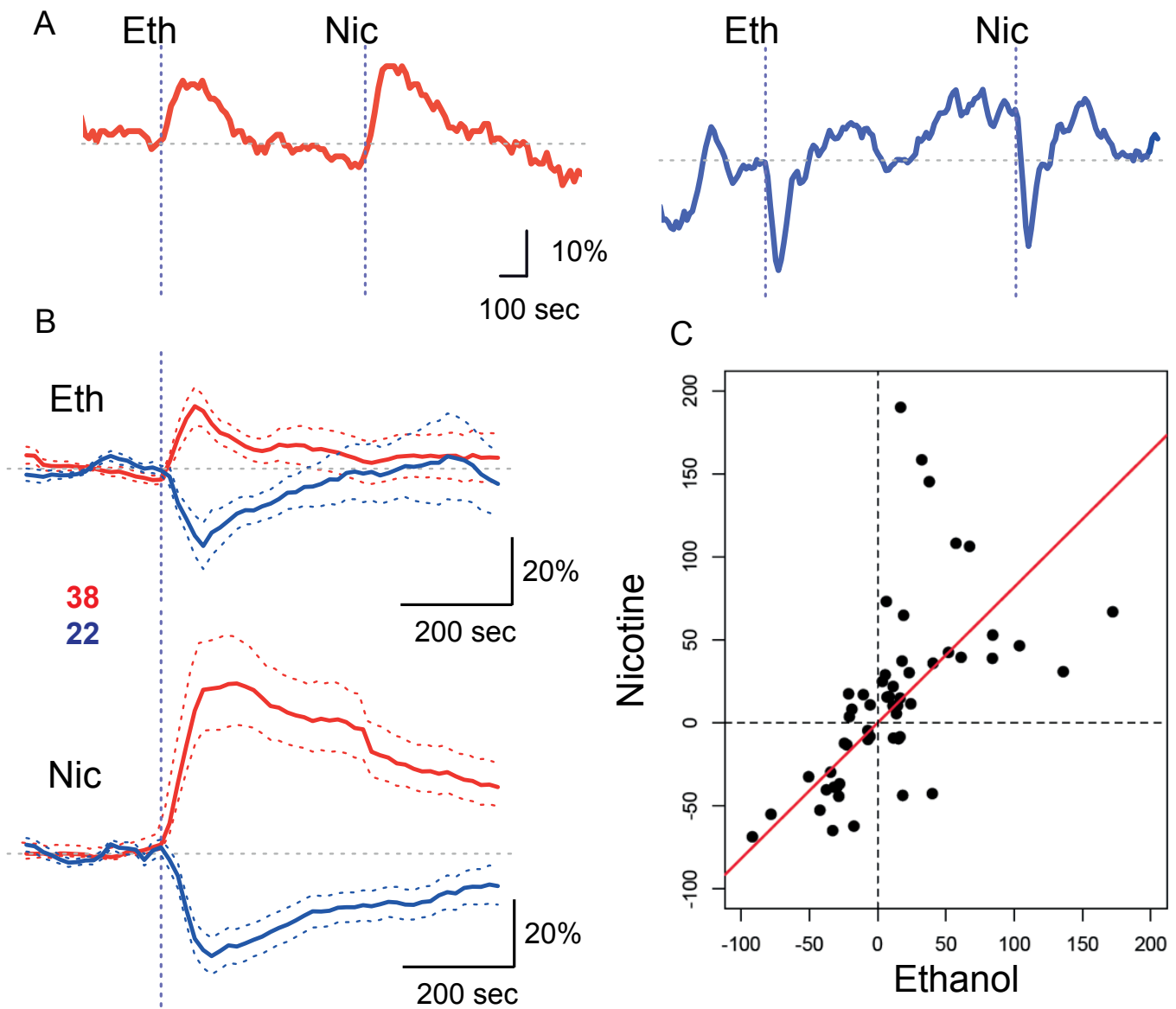


Figure 6. — **Ethanol demonstrates similar inhibitory and excitatory responses**

A. Frequency variations from baseline of an excited (red) and inhibited (blue) neuron during ethanol (500mg/kg) and nicotine (30 μ g/kg) intravenous injections. Neurons are either co-excited or co-inhibited. **B.** Mean responses of co-activated (red, n=38) and co-inhibited (blue, n=22) DA neurons. **C.** Covariance of nicotine and ethanol induced activation and inhibition.

Article 3 : Morel et al., 2013

Nicotine consumption is regulated by a human polymorphism expressed in the dopaminergic system

C. Morel, L. Fattore, S. Pons, Y.A. Hay, F. Marti, B. Lambolez, M. De Biasi, M. Lathrop, W. Fratta, U. Maskos and P. Faure

ORIGINAL ARTICLE

Nicotine consumption is regulated by a human polymorphism in dopamine neurons

C Morel^{1,9}, L Fattore^{2,9}, S Pons³, YA Hay⁴, F Marti¹, B Lamboloz⁴, M De Biasi⁵, M Lathrop^{6,7}, W Fratta⁸, U Maskos^{3,9} and P Faure^{1,9}

Smoking is the most important preventable cause of morbidity and mortality worldwide. Recent genome-wide association studies highlighted a human haplotype on chromosome 15 underlying the risk for tobacco dependence and lung cancer. Several polymorphisms in the *CHRNA3-CHRNA5-CHRNA4* cluster coding for the nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) $\alpha 3$, $\alpha 5$ and $\beta 4$ subunits were implicated. In mouse models, we define a key role in the control of sensitivity to nicotine for the $\alpha 5$ subunit in dopaminergic (DAergic) neurons of the ventral tegmental area (VTA). We first investigated the reinforcing effects of nicotine in drug-naïve $\alpha 5^{-/-}$ mice using an acute intravenous nicotine self-administration task and *ex vivo* and *in vivo* electrophysiological recordings of nicotine-elicited DA cell activation. We designed lentiviral re-expression vectors to achieve targeted re-expression of wild-type or mutant $\alpha 5$ in the VTA, in general, or in DA neurons exclusively. Our results establish a crucial role for $\alpha 5^*$ -nAChRs in DAergic neurons. These receptors are key regulators that determine the minimum nicotine dose necessary for DA cell activation and thus nicotine reinforcement. Finally, we demonstrate that a single-nucleotide polymorphism, the non-synonymous $\alpha 5$ variant rs16969968, frequent in many human populations, exhibits a partial loss of function of the protein *in vivo*. This leads to increased nicotine consumption in the self-administration paradigm. We thus define a critical link between a human predisposition marker, its expression in DA neurons and nicotine intake.

Molecular Psychiatry advance online publication, 3 December 2013; doi:10.1038/mp.2013.158

Keywords: dopamine system; human polymorphisms; *in vivo* electrophysiology; lentiviral vectors; mouse models; nicotinic receptor; nicotine self-administration; smoking

INTRODUCTION

Nicotine addiction is the single most important preventable cause of morbidity and mortality worldwide (World Health Organization, http://www.who.int/tobacco/statistics/tobacco_atlas/en/). Current smoking cessation medications are only moderately successful and novel drug targets need to be defined.^{1,2} Genome-wide association studies have recently identified a strong link between increased vulnerability to tobacco addiction and risk of lung cancer in humans, and a haplotype on chromosome 15 encompassing the *CHRNA3/A5/B4* gene cluster coding for subunits of the nicotinic acetylcholine receptor (nAChR).^{1–5}

These subunits are expressed in discrete regions of the mammalian central nervous system, including the cerebral cortex, cerebellum, thalamus, striatum, hippocampus, substantia nigra, interpeduncular nucleus, ventral tegmental area (VTA) and medial habenula (mHb).^{6–9} Among these structures, VTA, mHb and interpeduncular nucleus are of particular interest.¹⁰ Recent evidence indicates a critical involvement of the $\alpha 5^*$ -nAChR subunit in neurons connecting the mHb to the interpeduncular nucleus (habenulo-interpeduncular pathway) in two rodent models of nicotine addiction. This pathway is thought to be implicated in signaling the aversive properties of nicotine.^{8,11} It is

well established that nicotine shares with other addictive drugs the ability to activate the dopaminergic (DAergic) neurons of the VTA. Those neurons project to, and release DA in the nucleus accumbens (mesolimbic DA neurons), an effect underlying their rewarding and addictive properties of drugs of abuse.^{1,12–14} Although the $\alpha 5$ subunit is expressed in 80% of DAergic neurons,^{7,9} there are no data so far implicating $\alpha 5$ in VTA DA neuron function or reinforcement.

MATERIALS AND METHODS

Full Methods and any associated references are available in the Supplementary Information.

Subjects

Male C57BL/6 J (Charles River, L'Arbresle, France), $\alpha 5$ nAChR knockout¹⁵ ($\alpha 5^{-/-}$) mice and their corresponding wild-type (WT) controls were used, weighing 24–28 g.

Drugs

For all experiments, (–)-nicotine bitartrate (Sigma, Milan, Italy) was freshly dissolved in 0.9% saline, pH adjusted to 7.4 ± 0.1 (nicotine concentration,

¹Neurobiologie des Processus Adaptatifs, CNRS UMR 7102, Equipe Neurophysiologie et comportement (NPC), Université P. et M. Curie, Paris, France; ²CNR Neuroscience Institute, Cagliari, National Research Council, Italy, Cittadella Universitaria, Monserrato, Italy; ³Institut Pasteur, Unité Neurobiologie intégrative des systèmes cholinergiques, CNRS UMR 3571, Paris, France; ⁴Université P. et M. Curie, CNRS UMR 7102, Neurobiologie des Processus Adaptatifs, Equipe Réseau cortical et couplage neurovasculaire, Paris, France; ⁵Department of Psychiatry, Perelman School of Medicine at the University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA; ⁶McGill University and Genome Quebec Innovation Centre, Montréal, QC, Canada; ⁷Fondation Jean Dausset, CEPH, Paris, France and ⁸Department of Biomedical Sciences, University of Cagliari Cittadella Universitaria, Monserrato, Italy. Correspondence: Dr P Faure, Neurobiologie des Processus Adaptatifs, CNRS UMR 7102, Equipe Neurophysiologie et Comportement (NPC), Boite 14, Université P. et M. Curie, 9 quai St Bernard, Paris, 75005, France or Dr U Maskos, Institut Pasteur, Unité Neurobiologie intégrative des systèmes cholinergiques, CNRS UMR 3571, F-75724 Paris cedex 15, France. E-mail: philippe.faure@snv.jussieu.fr or umaskos@pasteur.fr

⁹These authors contributed equally to this work.

Received 2 May 2013; revised 20 September 2013; accepted 11 October 2013

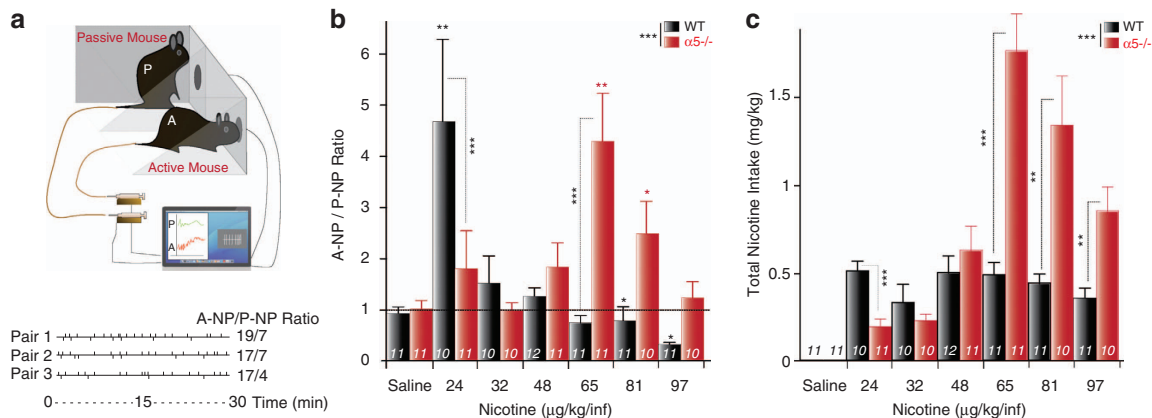


Figure 1. Critical role of the $\alpha 5$ subunit in intravenous self-administration task (IVSA). **(a)** IVSA set-up. Top: Scheme of the set-up for the intravenous self-administration task (IVSA). Mice are tested in pairs. The active mouse (A) is tested for nicotine reinforcement, the passive mouse (P) is used as a control mouse. Each nose poke (NP) of the A mouse activates a computer-operated syringe pump that delivers a nicotine injection into the tail vein of both the A and the yoked P mouse. Bottom: Event records from three representative paired mice during nicotine IVSA sessions. The vertical deflections above the horizontal line mark the time of each individual NP of the active mouse (A-NP), whereas each deflection below the line represents NP of the passive mouse (P-NP), over the 30-min experimental session. **(b, c)** $\alpha 5^{-/-}$ mice shift to higher doses in IVSA. **(b)** Mean \pm s.e.m. A-NP/P-NP ratio for wild-type (WT; black) and $\alpha 5^{-/-}$ (red) mice self-administering different nicotine concentrations ($\mu\text{g kg}^{-1}$ per infusion). **(c)** Mean \pm s.e.m. of total nicotine intake (mg kg^{-1}) by A mice. *** $P < 0.001$ WT vs $\alpha 5^{-/-}$, analysis of variance (ANOVA). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs yoked P mice, Student *t*-test. Number of mice tested is indicated for each group.

$\mu\text{g kg}^{-1}$ per infusion free base). Dimethylphenylpiperazinium (DMPP, Sigma) was used at a concentration of $100 \mu\text{M}$.

Nicotine self-administration task (intravenous self-administration task)
Nicotine-naïve mice were tested in pairs as previously described.^{16,17}

In vivo electrophysiological recordings of VTA DA neurons

Single-unit extracellular recordings and nicotine tartrate injection into the saphenous vein were performed as described.^{14,18,19}

Ex vivo electrophysiological recordings of VTA DA neurons

Slice recordings were performed as detailed in Supplementary Information.

Lentiviral expression vectors

Mice aged 10–12 weeks were injected bilaterally into the VTA as detailed in Supplementary Information. The lentiviral expression vectors are derived from the pHR's expression vectors first described by Naldini *et al.*,²⁰ with several subsequent modifications.^{19,21,22} To create the conditional lentivectors, a previously described sub-cloning strategy was used.^{14,19,21,22}

Data analysis

Behavioral data. The number of nose pokes (NPs) for both A and P mice in each treatment group was analyzed, first with a Shapiro test, then with two-way analysis of variance to evaluate effects of the drug delivery mode, unit dose and interactions between group and drug dose. Student's *t*-tests were used for *post hoc* comparisons. The whole study was designed as a between-subjects (independent groups) experiment, because each treatment was performed on a single set of animals. Differences between the self-administration profiles of the $\alpha 5^{-/-}$ -Lv- $\alpha 5$ WT and $\alpha 5^{-/-}$ -Lv- $\alpha 5$ SNP (single-nucleotide polymorphism) mice were evaluated using the Student's *t*-test with repeated Bonferroni corrections.

Electrophysiological data. DA cell firing was analyzed with respect to the average firing rate and the percentage of spikes within a burst.^{14,18,19,23,24} To quantify nicotine effects, we determined the maximum of fluctuation on a 3-min period before and after injection. To study differences between WT and $\alpha 5^{-/-}$ mouse dose-response curves, we used the Kruskal–Wallis non-parametric test. For $\alpha 5^{-/-}$ -Lv- $\alpha 5$ WT and $\alpha 5^{-/-}$ -Lv- $\alpha 5$ SNP analyses, we used a Wilcoxon non-paired test with Bonferroni corrections. For all analyses, statistical significance was set at $P < 0.05$.

RESULTS

Nicotine is the principal psychoactive component in tobacco smoke that drives continued addiction.^{18,25} It exerts its reinforcing effects through its action on neuronal nAChRs, a family of pentameric ligand-gated ion channels.^{1,17,21,26} Recent genome-wide association studies identified a series of polymorphisms composing a human haplotype. Among them, the rs16969968 SNP leads to a substitution of aspartic acid 398 by asparagine (D398N) in the human $\alpha 5$ subunit.⁵ It represents the only non-synonymous variant. In heterologous expression systems, the resulting protein exhibits diminished calcium permeability in high-affinity $\alpha 4\alpha 5\beta 2^*$ -nAChRs.^{5,27} Experimental evidence supports the potential role of $\alpha 5^*$ -nAChRs in smoking behavior, as mice lacking functional $\alpha 5^*$ -nAChRs ($\alpha 5^{-/-}$) are less sensitive to nicotine-elicited behaviors.^{15,28,29} They also exhibit increased self-administration of high nicotine doses in a chronic procedure that assesses the maintenance of drug taking.⁸ We have used an acute intravenous self-administration task (IVSA), schematically presented in Figure 1a, to address the initiation of drug-taking behavior.¹⁷ In this paradigm, both the 'active' (A) and the 'passive' (P) drug-naïve mice are exposed at the same time to the same amount of nicotine that is injected contingently on each NP of the A mouse. Thus, the A mouse is able to associate its NP activity with nicotine delivery, whereas the P mouse is not.

Under these conditions, a nicotine concentration of $24 \mu\text{g kg}^{-1}$ per infusion significantly increased nicotine self-administration in the WT A mice. In contrast, the same behavior required $65 \mu\text{g kg}^{-1}$ per infusion nicotine for A $\alpha 5^{-/-}$ mice (Figure 1b). When we considered the cumulative amount of nicotine self-administered during the 30-min IVSA session, WT mice adjusted their NP activity rate according to the different nicotine concentrations tested. Although WT mice self-administered fairly constant amounts of the drug, $\alpha 5^{-/-}$ mice did not (Figure 1c). We previously showed that systemic nicotine reinforcement in drug-naïve mice is under the control of high-affinity nicotinic receptors in the VTA.^{17,21} The $\alpha 5$ subunit is strongly expressed in this DAergic nucleus underlying nicotine reinforcement.^{7,9,14,30}

In order to address the role of the $\alpha 5$ subunit specifically in the VTA, we used a lentiviral re-expression vector to transduce the WT or polymorphic $\alpha 5$ subunit in the VTA of $\alpha 5^{-/-}$ mice (Figures 2a

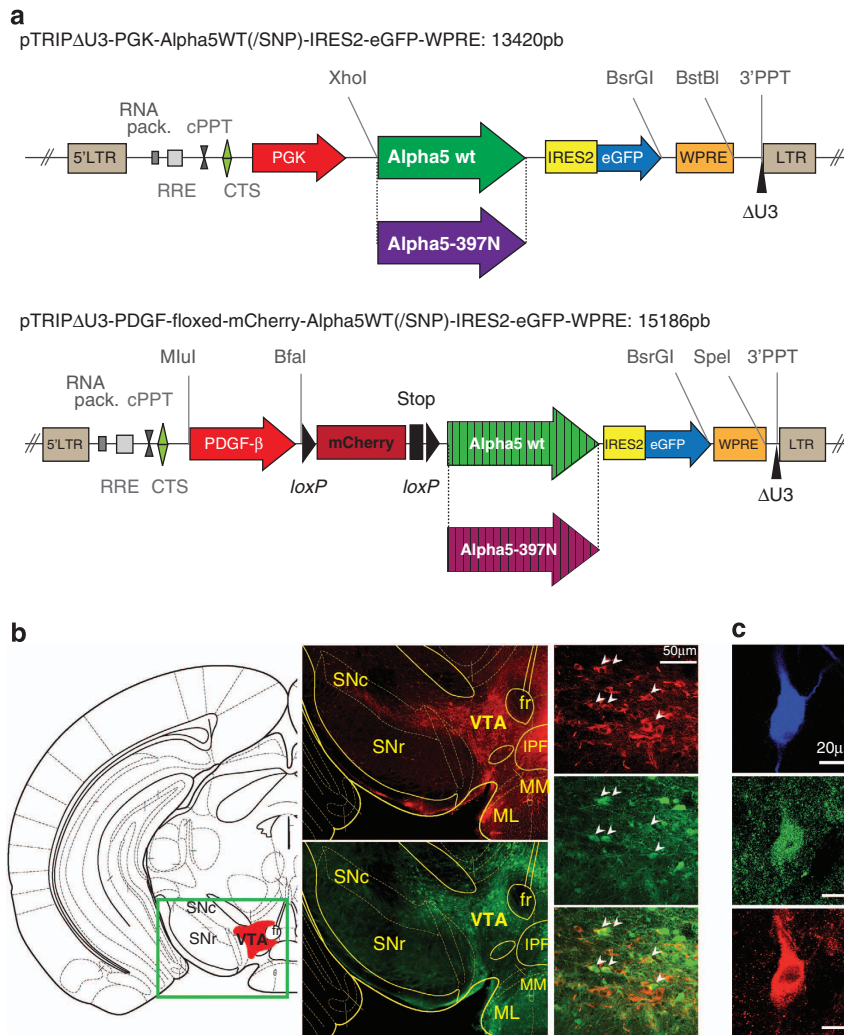


Figure 2. Re-expression of wild-type (WT; $\alpha 5^{-/-}$ -Lv- $\alpha 5$ WT) and polymorphic ($\alpha 5^{-/-}$ -Lv- $\alpha 5$ SNP) $\alpha 5$ in the ventral tegmental area (VTA) of $\alpha 5^{-/-}$ mice. **(a)** Scheme of lentiviral vectors, see Supplementary Information for details. **(b)** Localization of lentivirus reporter gene eGFP expression in VTA. Arrowheads indicate tyrosine hydroxylase (red) and eGFP (green) co-expression by DA cells. **(c)** Example of a recorded neuron (single plane): tyrosine hydroxylase, eGFP and biocytine identify, respectively, DA cells (red), the neuron re-expressing the $\alpha 5$ subunit (green), and a recorded cell (blue). eGFP, enhanced green fluorescent protein.

(top), b, c), designated respectively $\alpha 5^{-/-}$ -Lv- $\alpha 5$ WT and $\alpha 5^{-/-}$ -Lv- $\alpha 5$ SNP mice. As in WT mice, a nicotine concentration of $24 \mu\text{g kg}^{-1}$ per infusion significantly increased nicotine IVSA in $\alpha 5^{-/-}$ -Lv- $\alpha 5$ WT A mice (Figure 3a, Supplementary Figures S1a and b). We observed a rightward shift of the IVSA dose-response curve between the $\alpha 5^{-/-}$ -Lv- $\alpha 5$ WT and the $\alpha 5^{-/-}$ -Lv- $\alpha 5$ SNP mice, as $\alpha 5^{-/-}$ -Lv- $\alpha 5$ SNP animals started to self-administer nicotine at the $32 \mu\text{g kg}^{-1}$ per infusion dose, which is intermediate between the $\alpha 5^{-/-}$ -Lv- $\alpha 5$ WT ($24 \mu\text{g kg}^{-1}$ per infusion) and the $\alpha 5^{-/-}$ mice ($65 \mu\text{g kg}^{-1}$ per infusion) (Figure 3a). We calculated the total nicotine intake that remained once again fairly constant in $\alpha 5^{-/-}$ -Lv- $\alpha 5$ WT mice, but not in $\alpha 5^{-/-}$ -Lv- $\alpha 5$ SNP mice, with a peak at $65 \mu\text{g kg}^{-1}$ per infusion as for knockout mice. As expected, re-expressing enhanced green fluorescent protein (eGFP) in the VTA of $\alpha 5^{-/-}$ mice did not result in any modification of behaviour (Supplementary Figure S1c).

Thereafter, to address and ascertain the specific role of $\alpha 5^*$ -nAChRs in VTA DA cells, a DA cell-specific expression system was generated similar to Tolu *et al.*^{14,22} $\alpha 5^{-/-}$ -DAT^{Cre} mice were generated by crossing $\alpha 5^{-/-}$ with DAT-Cre expressing transgenic mice. These mice were injected with a Cre recombinase-dependent conditional lentiviral expression vector to drive $\alpha 5$ WT or $\alpha 5$ SNP exclusively in VTA DA neurons (Figure 2a, bottom).

Selective re-expression of WT $\alpha 5$ subunit in VTA DA neurons was sufficient to induce nicotine reinforcement for a low nicotine dose. We also observed a rightward shift of the IVSA dose-response curve between $\alpha 5^{-/-}$ -DATCre-Lv- $\alpha 5$ WT and $\alpha 5^{-/-}$ -DATCre-Lv- $\alpha 5$ SNP mice (Figure 3b). The first line self-administered nicotine at the $24 \mu\text{g kg}^{-1}$ per infusion dose, but not the second. Conversely, the $\alpha 5^{-/-}$ -DATCre-Lv- $\alpha 5$ SNP mice self-administered nicotine at the $65 \mu\text{g kg}^{-1}$ per infusion dose, whereas $\alpha 5^{-/-}$ -DATCre-Lv- $\alpha 5$ WT did not, similar to the results obtained with the generalized re-expression in the VTA (see above). When total nicotine intake was examined, mice expressing WT $\alpha 5$ in DA cells self-administered constant amount of nicotine, whereas mice expressing the $\alpha 5$ SNP did not. The amounts self-administered at the 24 and $65 \mu\text{g kg}^{-1}$ per infusion doses were identical between mice with either generalized or DA-specific expression.

These clear-cut behavioral data made us aware that the $\alpha 5$ would have a major role specifically in DA neurons, and that the human polymorphism alters this function. Therefore, DA cell responses to nicotine were assessed by *in vivo* electrophysiological recordings. We first analyzed the spontaneous activity of VTA DA cells in WT and mutant mice, and found no differences in the spontaneous firing rate or percentage of spike within bursts

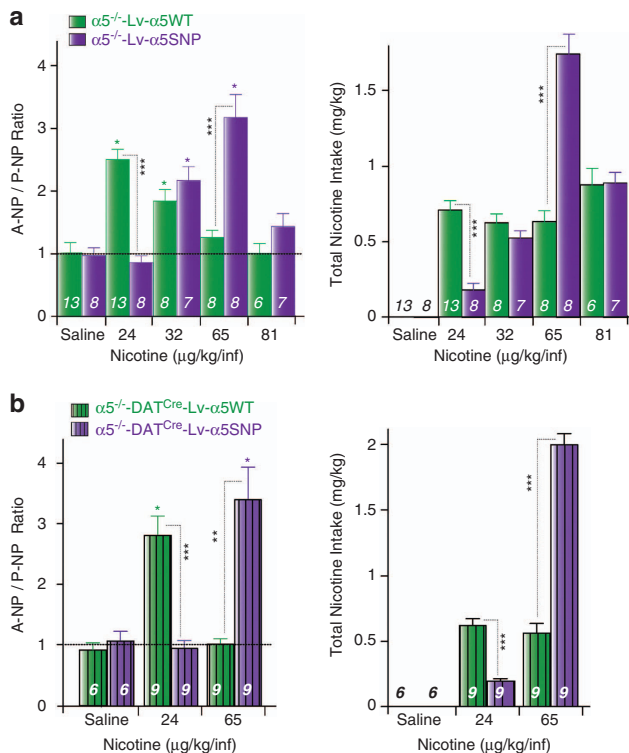


Figure 3. Intravenous self-administration task (IVSA) is restored by $\alpha 5^{\text{WT}}$, but not $\alpha 5^{\text{SNP}}$ re-expression in DA neurons. **(a)** (Left) Mean \pm s.e.m. A-NP/P-NP ratio for $\alpha 5^{\text{-/-}}$ -Lv- $\alpha 5^{\text{WT}}$ (green) and $\alpha 5^{\text{-/-}}$ -Lv- $\alpha 5^{\text{SNP}}$ (purple) mice acutely self-administering nicotine ($\mu\text{g kg}^{-1}$ per infusion). (Right) Mean \pm s.e.m. of total nicotine intake (mg kg^{-1}) by A mice. **(b)** (Left) Mean \pm s.e.m. A-NP/P-NP ratio for $\alpha 5^{\text{-/-}}$ -DAT^{Cre}-Lv- $\alpha 5^{\text{WT}}$ (green) and $\alpha 5^{\text{-/-}}$ -Lv- $\alpha 5^{\text{-/-}}$ -DAT^{Cre}-Lv- $\alpha 5^{\text{SNP}}$ (purple) mice acutely self-administering nicotine ($\mu\text{g kg}^{-1}$ per infusion). (Right) Mean \pm s.e.m. of total nicotine intake (mg kg^{-1}) by A mice. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, Student's *t*-test. *n*, number of recorded of mice tested.

(Supplementary Figures S2a and b). Systemic administration of nicotine resulted in a rapid and pronounced increase in firing rate in both WT and $\alpha 5^{\text{-/-}}$ mice (Figure 4a). In both cases, the nicotine-elicited mean firing rate increased with nicotine concentration (Figure 4b). However, while $15 \mu\text{g kg}^{-1}$ nicotine was sufficient to trigger an increase of WT DA neuron firing frequency, $120 \mu\text{g kg}^{-1}$ nicotine was necessary to activate $\alpha 5^{\text{-/-}}$ DA cells (Figure 4c). This result correlates with the shift observed in the nicotine IVSA task. Similar results were obtained when analyzing nicotine-elicited modification of bursting activities (Supplementary Figures S2c and d). Thus, $\alpha 5^{\text{*}}$ -nAChRs are key in defining the minimal nicotine dose initiating a DA response and thus reinforcement.

We then analyzed the mice with targeted re-expression of WT and SNP $\alpha 5$ subunit. First, to exclude any potential effect of the SNP in the translation, trafficking, surface expression or affinity to nicotine of the 'mutant' subunit, we carried out slice electrophysiology on vectorized mice. As expected, $\alpha 5^{\text{-/-}}$ -Lv- $\alpha 5^{\text{WT}}$ mice displayed a WT profile in response to a saturating dose of DMPP ($100 \mu\text{M}$) (Figure 5a). At a saturating dose of DMPP ($100 \mu\text{M}$), no differences in amplitude of current were observed between WT, $\alpha 5^{\text{-/-}}$ -Lv- $\alpha 5^{\text{WT}}$ and $\alpha 5^{\text{-/-}}$ -Lv- $\alpha 5^{\text{SNP}}$ (Figure 5a) mice. This serves as a control to confirm comparable amounts of $\alpha 5$ protein expression between each lentivector used.

We then analyzed the mice with generalized VTA expression. First of all, re-expressing eGFP in the VTA of $\alpha 5^{\text{-/-}}$ mice did not result in any modification of the nicotine-evoked response (Supplementary Figure S3a). Similar to WT mice, $\alpha 5^{\text{-/-}}$ -Lv- $\alpha 5^{\text{WT}}$ mice exhibited an increase in firing (Figure 5b) and bursting

(Supplementary Figure S3b) in response to a $15 \mu\text{g kg}^{-1}$ nicotine dose. Confirming this phenotype, $\alpha 5^{\text{-/-}}$ -Lv- $\alpha 5^{\text{SNP}}$ DA cells required twice the nicotine dose to exhibit activation in response to an injection compared with cells from $\alpha 5^{\text{-/-}}$ -Lv- $\alpha 5^{\text{WT}}$ mice (Figure 5b and Supplementary Figure S3b for bursting analysis). Thus, the D398N SNP, a risk factor for nicotine dependence and lung cancer, induces a partial loss of function in the DA system. We then confirmed that DA neuron-specific expression of WT and mutant $\alpha 5$ is sufficient to confer the same response profiles. *In vivo* recordings of DA cells showed that twice the dose of nicotine is required to elicit DA cell activation for $\alpha 5^{\text{-/-}}$ -DAT^{Cre}-Lv- $\alpha 5^{\text{SNP}}$ as compared with $\alpha 5^{\text{-/-}}$ -DAT^{Cre}-Lv- $\alpha 5^{\text{WT}}$ mice, similar to the results obtained using ubiquitous expression in the VTA (Figure 5c and Supplementary Figure S3c for burst analysis).

These observations support our general conclusion that $\alpha 5^{\text{*}}$ -nAChRs specifically in VTA DA cells drive sensitivity to nicotine reward. In addition, $\alpha 5$ SNP expression leads to a partial loss of function, thereby increasing the dose of nicotine that animals perceive as rewarding. Our data establish that $\alpha 5^{\text{*}}$ -nAChRs located in the VTA are crucial determinant of the minimal dose for nicotine reinforcement, and hence nicotine intake.

DISCUSSION

We have comprehensively analyzed the role of the $\alpha 5$ nAChR subunit in the DA system. Using *ex vivo* and *in vivo* models for electrophysiological recordings and nicotine self-administration behavior, we demonstrate that the $\alpha 5$ subunit has a critical role in defining the sensitivity of the VTA DA system to nicotine. This has a direct and immediate consequence for nicotine reinforcement. Furthermore, we demonstrate a direct link between the $\alpha 5^{\text{SNP}}$, which induces a partial loss of function and increased nicotine intake.

An unexpected role for the $\alpha 5$ subunit

We have defined novel major, largely unexpected roles for $\alpha 5$ nAChR subunit. Although it does not contribute to the nicotine binding site,^{26,31,32} as it can function only as an accessory subunit, its deletion leads to a dramatic shift in several nicotine-elicited functions in the brain. This loss of function can be demonstrated by changes in slice and *in vivo* electrophysiological responses to nicotine or nicotinic agonist exposure. A dramatic shift to high nicotine doses in an IVSA paradigm is also observed. These outcomes are entirely dependent on the presence of $\alpha 5$ in VTA DA cells. Normal responses are restored by targeted, generalized lentiviral re-expression in all VTA cells, but also in VTA DA cells, specifically. These data are in accordance with the finding that in the VTA, $\alpha 5$ mRNA is significantly more prevalent in DA cells than in GABA cells.⁷ They also clearly demonstrate that, surprisingly, $\alpha 4\beta 2$ nAChRs that do not comprise $\alpha 5$ have a minor role in the nicotine-evoked response of VTA DA cells, and that the functional contribution of $\alpha 5$ is critical. This is a novel, specific role for a nicotinic receptor subunit. Previous analyses of nAChR genes, for example $\beta 2$, $\alpha 4$ or $\alpha 6$, indicated an all-or-none phenotype associated with a receptor subunit, that is, the function was entirely lost.^{14,17,19,33} Alpha5 is different in the sense that, while not essential for receptor function, it can powerfully 'modulate' the nicotine sensitivity of the DAergic system.

Relation to previous work

Our work complements and considerably extends previous studies that begun to dissect the frequent human haplotype on chromosome 15. Fowler *et al.*,^{8,34} observed that $\alpha 5^{\text{-/-}}$ mice exhibit an increase in IVSA for high nicotine doses, but no modifications at low doses, and found no strong evidence for a role in reward. They proposed that $\alpha 5^{\text{*}}$ -nAChRs in the mHb trigger an inhibitory motivational signal limiting nicotine intake of high nicotine doses. Together with our previous work,³⁵ those results

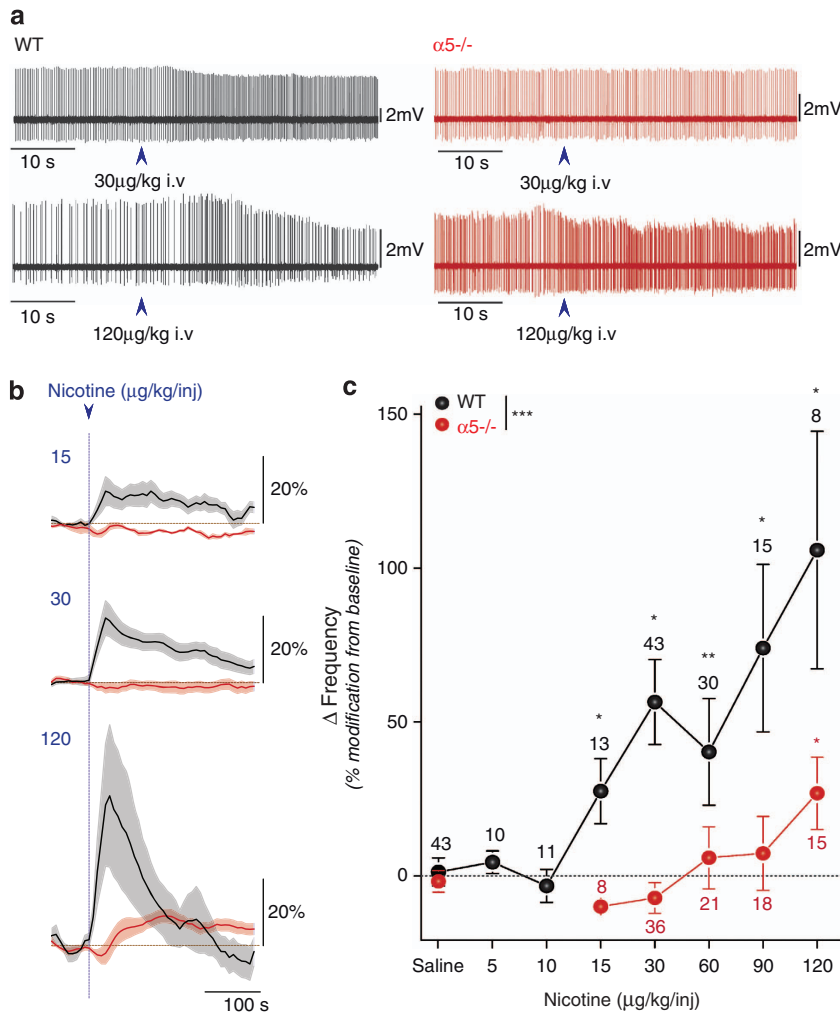


Figure 4. Nicotine-elicited increase in ventral tegmental area (VTA) DA cell firing is shifted to higher doses in $\alpha 5^{-/-}$ mice. **(a)** Typical electrophysiological recording depicting the changes in firing pattern elicited by $30 \mu\text{g kg}^{-1}$ or $120 \mu\text{g kg}^{-1}$ intravenous (i.v.) nicotine injection (arrow) in wild-type (WT) and $\alpha 5^{-/-}$ mice. **(b)** Mean \pm s.e.m DA cell firing frequency increase after injection of the indicated nicotine concentration, in WT and $\alpha 5^{-/-}$ mice. **(c)** Rightward shift in the dose-response curve of nicotine-elicited DA cell activation in $\alpha 5^{-/-}$ mice. Mean \pm s.e.m of increased variation from baseline in firing frequency for WT and $\alpha 5^{-/-}$ mice injected with the indicated nicotine concentrations. WT: black; $\alpha 5^{-/-}$: red. *** $P < 0.001$, Kruskal–Wallis test; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ Wilcoxon test. n , number of recorded neurons.

potentially identify the habenular receptors as $\alpha 3\alpha 5\beta 4^*$ -nAChRs, although careful immunoprecipitation studies only found low amounts of $\alpha 5$ in this nucleus.³⁶ Here, we analyzed a different receptor combination in VTA. We demonstrate, using different approaches, that $\alpha 5^{-/-}$ mice exhibit a decreased sensitivity of the DAergic system to acute nicotine injection. Therefore, $\alpha 5^*$ -nAChRs expressed in VTA DA neurons are crucial for the control of the minimum nicotine dose necessary for DAergic activation, and thus nicotine reinforcement in nicotine-naïve mice. This implies that the $\alpha 5$ subunit has convergent roles in two different brain structures. It defines high-affinity responses to nicotine in both the mHb and the VTA DAergic system. The human SNP 'linked' to nicotine intake thus has a dual role. First, its presence in the DA system increases the minimum nicotine concentration necessary for the activation of DA neurons that underlies the reinforcing effects associated with smoking. At the same time, the partial loss of function in mHb neurons reduces the aversive properties of high nicotine doses and promotes continued use once dependence is established.

Deletion of the $\alpha 5$ subunit resulted in a 'loss of control' of nicotine consumption at high doses, a behavior restored by selective re-expression of $\alpha 5$ in VTA DA cells. Our recordings of

VTA DA cell activity evoked by nicotine do not reveal a population responding with an inverted U-shaped curve, that is, an excitation by low doses and an inhibition by high doses of the drug. Specific populations that drive or specifically code for high doses of nicotine have thus not been identified. This is, however, not the only possible mechanism. Indeed, DA neuron firing is not the sole determinant of reinforcing or aversive effects of a drug. One quintessential feature is the actual amount of DA that is released. For nicotine, this is not alone determined by DA neuron firing but also by presynaptic nicotinic receptors in DA terminals,¹⁹ and in particular $\alpha 5^*$ nAChRs in DA terminals of the dorsal striatum.³⁷ Finally, the effects of DA are also determined by its action on the postsynaptic cell, the medium spiny neurons of the striatum or other cells in different target regions. Low or high release of DA would differentially recruit D1- and D2-type postsynaptic receptors, thus eliciting different behaviors.³⁸

Dissecting the role of a human non-synonymous variant Beirut *et al.*⁵ provided the initial analysis of the functional consequences potentially associated with the $\alpha 5$ SNP on $\alpha 4\alpha 5\beta 2^*$ -nAChRs. The incorporation of $\alpha 5$ SNP into HEK293T cells

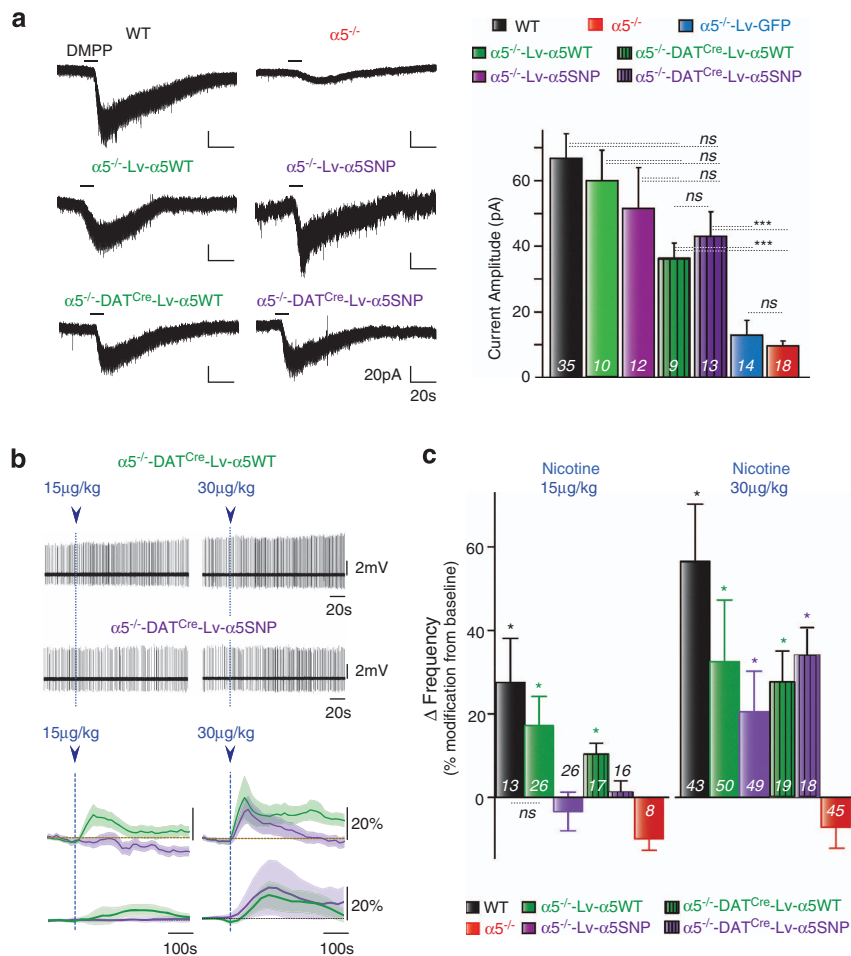


Figure 5. Specific re-expression of $\alpha 5^*$ -nAChRs in ventral tegmental area (VTA) cells. **(a)** (Left) DMPP-evoked currents in DA cells. **(Right)** DA cell mean \pm s.e.m of current amplitude in response to dimethylphenylpiperazinium (DMPP; 100 μ M) in wild-type (WT), $\alpha 5^{-/-}$ -Lv- $\alpha 5$ WT, $\alpha 5^{-/-}$ -Lv- $\alpha 5$ SNP, $\alpha 5^{-/-}$ -Lv- $\alpha 5$ GFP, $\alpha 5^{-/-}$ -DAT^{Cre}-Lv- $\alpha 5$ WT, $\alpha 5^{-/-}$ -DAT^{Cre}-Lv- $\alpha 5$ SNP and $\alpha 5^{-/-}$ mice. **(b)** (Top) Electrophysiological recording depicting the changes in firing pattern elicited by 15 and 30 μ g kg⁻¹ intravenous (i.v.) nicotine injection (arrow) in $\alpha 5^{-/-}$ -DAT^{Cre}-Lv- $\alpha 5$ WT and $\alpha 5^{-/-}$ -DAT^{Cre}-Lv- $\alpha 5$ SNP mice. (Middle) Mean \pm s.e.m DA cell firing frequency increase after injection of the indicated nicotine concentration in $\alpha 5^{-/-}$ -Lv- $\alpha 5$ SNP, $\alpha 5^{-/-}$ -DAT^{Cre}-Lv- $\alpha 5$ WT and (bottom) $\alpha 5^{-/-}$ -DAT^{Cre}-Lv- $\alpha 5$ WT and $\alpha 5^{-/-}$ -DAT^{Cre}-Lv- $\alpha 5$ SNP mice. **(c)** Mean \pm s.e.m of maximum DA cell firing rate elicited by the indicated nicotine concentration in WT, $\alpha 5^{-/-}$ -Lv- $\alpha 5$ WT, $\alpha 5^{-/-}$ -Lv- $\alpha 5$ SNP, $\alpha 5^{-/-}$ -DAT^{Cre}-Lv- $\alpha 5$ WT, $\alpha 5^{-/-}$ -DAT^{Cre}-Lv- $\alpha 5$ SNP and $\alpha 5^{-/-}$ mice. WT: black; $\alpha 5^{-/-}$ -Lv- $\alpha 5$ WT: green; $\alpha 5^{-/-}$ -Lv- $\alpha 5$ SNP: purple; $\alpha 5^{-/-}$ -Lv- $\alpha 5$ GFP: blue; $\alpha 5^{-/-}$ -DAT^{Cre}-Lv- $\alpha 5$ WT: striped-green; $\alpha 5^{-/-}$ -DAT^{Cre}-Lv- $\alpha 5$ SNP: striped-purple; $\alpha 5^{-/-}$: red. * P < 0.05, Wilcoxon test, *** P < 0.001, Wilcoxon test with Bonferroni corrections. *n*, number of recorded neurons.

transfected with $\alpha 4\beta 2$ cDNA reduces the maximal response to a nicotinic agonist without altered $\alpha 4\beta 2^*$ -nAChRs surface expression.⁵ Also, Kuryatov *et al.*²⁷ reported that the $\alpha 5$ SNP lowers Ca²⁺ permeability and increases acute desensitization in ($\alpha 4\beta 2$)₂ $\alpha 5$ nAChRs expressed in *Xenopus* oocytes. We have previously elucidated the roles of $\alpha 4$ and $\beta 2$ nAChRs, the main partners of $\alpha 5$ within the VTA, in nicotine reinforcement.^{14,19,21} Numerous studies in slices from the DAergic system, such as Tsuneki *et al.*,³¹ describe how nicotinic receptors, particularly $\alpha 4\beta 2^*$ -nAChRs and thus $\alpha 4\alpha 5\beta 2$ nAChRs, mobilize extracellular and intracellular calcium in DA cells in response to nicotine exposure. Kitai and collaborators³⁹ have long demonstrated a crucial role for calcium and sodium in the slow oscillation potential and firing excitability of DA neurons. In accordance with all these evidences, our expression of the SNP in the VTA results in a partial loss of $\alpha 4\beta 2\alpha 5^*$ nicotine-evoked function, and yields intermediate behavioral and electrophysiological phenotypes compared with those of the $\alpha 5^{-/-}$ mice.

Extending our findings to humans, it is known that smokers manipulate their dose of nicotine on a puff-by-puff basis to reach an optimal blood concentration that produces the desired

reinforcing effect and satisfactory experience.²⁵ Our results reveal that, despite a similar response at saturating doses in slices, we could observe a partial loss of function generated by expression of polymorphic $\alpha 5^*$ -nAChRs in $\alpha 5^{-/-}$ mice rather than a complete inactivation. Overall, it suggests that humans expressing the D398N risk allele may smoke more because the optimal nicotine concentration required to activate the DAergic system is higher.

Implications for drug design

When analyzing nicotine dependence, experimental research has been extensively dedicated to $\beta 2^*$ -nAChRs and its main partners, $\alpha 6$ and $\alpha 4$, and the homopentameric $\alpha 7^*$ -nAChRs in the DAergic system.^{9,14,17,19,30,33,40} Here the $\alpha 5$ subunit emerges as a key determinant for sensitivity to nicotine in DA neurons. This means that the crucial pentamer responsible for nicotine effects in the cell bodies of the VTA does contain the $\alpha 5$ subunit in addition to previously described partners. Our work shows for the first time that a nicotinic subunit is clearly associated with a shift in the sensibility to nicotine-evoked activity. This underlies the mechanism for the critical impact of SNPs on this functional modulatory

subunit. This finding should pave the way for 'personalized' smoking cessation medication targeting the polymorphic $\alpha 5$ subunit, for example, with a positive allosteric modulator. This strategy could restore the partial loss of function of $\alpha 5$ in the reward system in heterozygous or homozygous carriers.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Stefania Tolu for helpful comments on the manuscript. This work was supported by the Institut Pasteur, Centre National de la Recherche Scientifique CNRS UMR 3571, UMR 7102 and ATIP programme, the Agence Nationale pour la Recherche (ANR Neuroscience, Neurologie et Psychiatrie 2009, and ANR BLANC 2012), la Fondation pour la Recherche Médicale (FRM, équipe 2013 PF), fondation pour la the Neuropole de Recherche Francilien (NeRF) of Ile de France, the Bettencourt Schueller Foundation, National Cancer Institute INCa BIO-SILC programme, Ecole des Neurosciences de Paris (ENP), FP7 ERANET Neuron NICO-GENE network, LabEx GENMED funded by ANR, and NIH grants DA029157 and U19CA148127. This work was supported by the Department of Biomedical Sciences, Division of Neuroscience and Clinical Pharmacology, University of Cagliari, Italy. The laboratories of Philippe Faure, Uwe Maskos and Bertrand Lamboloz are part of the École des Neurosciences de Paris Ile-de-France RTRA network. PF and UM are members of the Laboratory of Excellence, LabEx Bio-Psy.

REFERENCES

- Changeux J-P. Nicotine addiction and nicotinic receptors: lessons from genetically modified mice. *Nat Rev Neurosci* 2010; **11**: 389–401.
- De Biasi M, Dani JA. Reward, addiction, withdrawal to nicotine. *Annu Rev Neurosci* 2011; **34**: 105–130.
- Salas R, Pieri F, De Biasi M. Decreased signs of nicotine withdrawal in mice null for the beta4 nicotinic acetylcholine receptor subunit. *J Neurosci* 2004; **24**: 10035–10039.
- Wang JC, Cruchaga C, Saccone NL, Bertelsen S, Liu P, Budde JP et al. Risk for nicotine dependence and lung cancer is conferred by mRNA expression levels and amino acid change in CHRNA5. *Hum Mol Genet* 2009; **18**: 3125–3135.
- Bierut LJ, Stitzel JA, Wang JC, Hinrichs AL, Gruzca RA, Xuei X et al. Variants in nicotinic receptors and risk for nicotine dependence. *Am J Psychiatry* 2008; **165**: 1163–1171.
- Gotti C, Clementi F, Fornari A, Gaimarri A, Guiducci S, Manfredi I et al. Structural and functional diversity of native brain neuronal nicotinic receptors. *Biochem Pharmacol* 2009; **78**: 703–711.
- Klink R, de Kerchove d'Exaerde A, Zoli M, Changeux JP. Molecular and physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors in the midbrain dopaminergic nuclei. *J Neurosci* 2001; **21**: 1452–1463.
- Fowler CD, Lu Q, Johnson PM, Marks MJ, Kenny PJ. Habenular $\alpha 5$ nicotinic receptor subunit signalling controls nicotine intake. *Nature* 2011; **471**: 597–601.
- Chatterjee S, Santos N, Holgate J, Haass-Koffler CL, Hopf FW, Kharazia V et al. The $\alpha 5$ subunit regulates the expression and function of $\alpha 4^*$ -containing neuronal nicotinic acetylcholine receptors in the ventral-tegmental area. *PLoS ONE* 2013; **8**: e68300.
- Tuesta LM, Fowler CD, Kenny PJ. Recent advances in understanding nicotinic receptor signaling mechanisms that regulate drug self-administration behavior. *Biochem Pharmacol* 2011; **82**: 984–995.
- Salas R, Sturm R, Boulter J, De Biasi M. Nicotinic receptors in the habenulo-interpeduncular system are necessary for nicotine withdrawal in mice. *J Neurosci* 2009; **29**: 3014–3018.
- Di Ciano P, Everitt BJ. Contribution of the ventral tegmental area to cocaine-seeking maintained by a drug-paired conditioned stimulus in rats. *Eur J Neurosci* 2004; **19**: 1661–1667.
- Pontieri FE, Tanda G, Orzi F, Di Chiara G. Effects of nicotine on the nucleus accumbens and similarity to those of addictive drugs. *Nature* 1996; **382**: 255–257.
- Tolu S, Eddine R, Marti F, David V, Graupner M, Pons S et al. Co-activation of VTA DA and GABA neurons mediates nicotine reinforcement. *Mol Psychiatry* 2012; **18**: 382–393.
- Salas R, Orr-Urtreger A, Broide RS, Beaudet A, Paylor R, De Biasi M. The nicotinic acetylcholine receptor subunit alpha 5 mediates short-term effects of nicotine *in vivo*. *Mol Pharmacol* 2003; **63**: 1059–1066.
- Martellotta MC, Kuzmin A, Zvartau E, Cossu G, Gessa GL, Fratta W. Isradipine inhibits nicotine intravenous self-administration in drug-naive mice. *Pharmacol Biochem Behav* 1995; **52**: 271–274.
- Pons S, Fattore L, Cossu G, Tolu S, Porcu E, McIntosh JM et al. Crucial role of alpha4 and alpha6 nicotinic acetylcholine receptor subunits from ventral tegmental area in systemic nicotine self-administration. *J Neurosci* 2008; **28**: 12318–12327.
- Marti F, Arib O, Morel C, Dufresne V, Maskos U, Corringier P-J et al. Smoke extracts and nicotine, but not tobacco extracts, potentiate firing and burst activity of ventral tegmental area dopaminergic neurons in mice. *Neuropsychopharmacology* 2011; **36**: 2244–2257.
- Exley R, Maubourguet N, David V, Eddine R, Evrard A, Pons S et al. Distinct contributions of nicotinic acetylcholine receptor subunit alpha4 and subunit alpha6 to the reinforcing effects of nicotine. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; **108**: 7577–7582.
- Naldini L, Blömer U, Gally P, Ory D, Mulligan R, Gage FH et al. *In vivo* gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 1996; **272**: 263–267.
- Maskos U, Molles BE, Pons S, Besson M, Guiard BP, Guilloux J-P et al. Nicotine reinforcement and cognition restored by targeted expression of nicotinic receptors. *Nature* 2005; **436**: 103–107.
- Tolu S, Avale ME, Nakatani H, Pons S, Parnaudeau S, Tronche F et al. A versatile system for the neuronal subtype specific expression of lentiviral vectors. *FASEB J* 2010; **24**: 723–730.
- Grace AA, Bunney BS. The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: burst firing. *J Neurosci* 1984; **4**: 2877–2890.
- Grace AA, Bunney BS. The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: single spike firing. *J Neurosci* 1984; **4**: 2866–2876.
- Benowitz NL. Pharmacology of nicotine: addiction, smoking-induced disease, and therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2008; **49**: 57–71.
- Albuquerque EX, Pereira EFR, Alkondon M, Rogers SW. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 2009; **89**: 73–120.
- Kuryatov A, Berrettini W, Lindstrom J. Acetylcholine receptor (AChR)Alpha5 subunit variant associated with risk for nicotine dependence and lung cancer reduces (alpha4beta2)2alpha5 AChR function. *Mol Pharmacol* 2010; **79**: 119–125.
- Jackson KJ, Martin BR, Changeux JP, Damaj MI. Differential role of nicotinic acetylcholine receptor subunits in psychomotor and affective nicotine withdrawal signs. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; **325**: 302–312.
- Jackson KJ, Marks MJ, Vann RE, Chen X, Gamage TF, Warner JA et al. The role of alpha5 nicotinic acetylcholine receptors in the pharmacological and behavioral effects of nicotine in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2010; **334**: 137–146.
- Mameli-Engvall M, Evrard A, Pons S, Maskos U, Svensson TH, Changeux J-P et al. Hierarchical control of dopamine neuron-firing patterns by nicotinic receptors. *Neuron* 2006; **50**: 911–921.
- Tsuneki H, Klink R, Léna C, Korn H, Changeux JP. Calcium mobilization elicited by two types of nicotinic acetylcholine receptors in mouse substantia nigra pars compacta. *Eur J Neurosci* 2000; **12**: 2475–2485.
- Ramirez-Latorre J, Yu CR, Qu X, Perin F, Karlin A, Role L. Functional contributions of alpha5 subunit to neuronal acetylcholine receptor channels. *Nature* 1996; **380**: 347–351.
- Picciozzo MR, Zoli M, Rimondini R, Léna C, Marubio LM, Pich EM et al. Acetylcholine receptors containing the beta2 subunit are involved in the reinforcing properties of nicotine. *Nature* 1998; **391**: 173–177.
- Fowler CD, Tuesta L, Kenny PJ. Role of $\alpha 5^*$ nicotinic acetylcholine receptors in the effects of acute and chronic nicotine treatment on brain reward function in mice. *Psychopharmacology* 2013; **229**: 503–513.
- Frahm S, Slimak MA, Ferrarese L, Santos-Torres J, Antolin-Fontes B, Auer S et al. Aversion to Nicotine Is Regulated by the Balanced Activity of beta4 and alpha5 Nicotinic Receptor Subunits in the Medial Habenula. *Neuron* 2011; **70**: 522–535.
- Scholze P, Koth G, Orr-Urtreger A, Huck S. Subunit composition of $\alpha 5$ -containing nicotinic receptors in the rodent habenula. *J Neurochem* 2012; **121**: 551–560.
- Exley R, McIntosh JM, Marks MJ, Maskos U, Cragg SJ. Striatal $\alpha 5$ nicotinic receptor subunit regulates dopamine transmission in dorsal striatum. *J Neurosci* 2012; **32**: 2352–2356.
- Kravitz AV, Tye LD, Kreitzer AC. Distinct roles for direct and indirect pathway striatal neurons in reinforcement. *Nat Neurosci* 2012; **15**: 816–818.
- Kitai S, Shepard P, Callaway J, Scroggs R. Afferent modulation of dopamine neuron firing patterns. *Curr Opin Neurobiol* 1999; **9**: 1–8.
- Mansvelder HD, McGehee DS. Long-term potentiation of excitatory inputs to brain reward areas by nicotine. *Neuron* 2000; **27**: 349–357.

Supplementary Information accompanies the paper on the Molecular Psychiatry website (<http://www.nature.com/mp>)

Sixième partie

Annexe II : rôle des courants médiés
par les récepteurs orphelins GluR δ 1
et GluR δ 2 dans la physiologie des
neurones corticaux et de la
substance noire compacte

1 | Introduction

La famille des récepteurs ionotropiques au glutamate

Les récepteurs GluR δ 1 et GluR δ 2 appartiennent à la famille des récepteurs ionotropiques du glutamate dont les principaux représentants sont les récepteurs NMDA, AMPA et kainate (Lomeli et al., 1993). Ils forment une famille homogène, avec plus de 50% d'homologie de séquence entre les différents parents et comportent plusieurs domaines très conservés (Figure VI.1). Ainsi GluR δ 1 et GluR δ 2 présentent à l'instar des autres récepteurs ionotropiques mieux caractérisés le domaine de liaison au ligand (LBP), les segments transmembranaires (TM1-4), le site de dimérisation (LIVBP), le domaine de contrôle de la sélectivité du pore (P-loop) et plusieurs sites d'ancrage aux protéines d'échaffaudages (sites PDZ en particulier, voir Figure VI.1 et Yamazaki et al., 1992, Lomeli et al., 1993, Uemura et al., 2004). Ces deux protéines possèdent donc a priori les domaines nécessaires à la fonctionnalité du canal ionique, mais contrairement à leurs parents, aucun agoniste permettant l'ouverture du pore n'a encore été identifié (Schmid and Hollmann, 2008).

Expression de GluR δ 1 et GluR δ 2

La caractérisation de l'expression spécifique de GluR δ 1 est rendue difficile par la forte homologie de séquence entre GluR δ 1 et GluR δ 2. Par hybridation *in situ*, *northern blot* et immunohistochimie, une très forte expression de GluR δ 2 dans le cervelet dès les stades embryonnaires a été mise en évidence (Araki et al., 1993, Takayama et al., 1995, 1996). L'expression de GluR δ 2 est particulièrement abondante dans les cellules de Purkinje et on retrouve GluR δ 2 dans les épines dendritiques qui forment des synapses avec les fibres parallèles. Quant à GluR δ 1, on a longtemps pensé que son expression était très marginale et seulement transitoire dans le télencéphale au cours du développement (Lomeli et al., 1993). Néanmoins, la

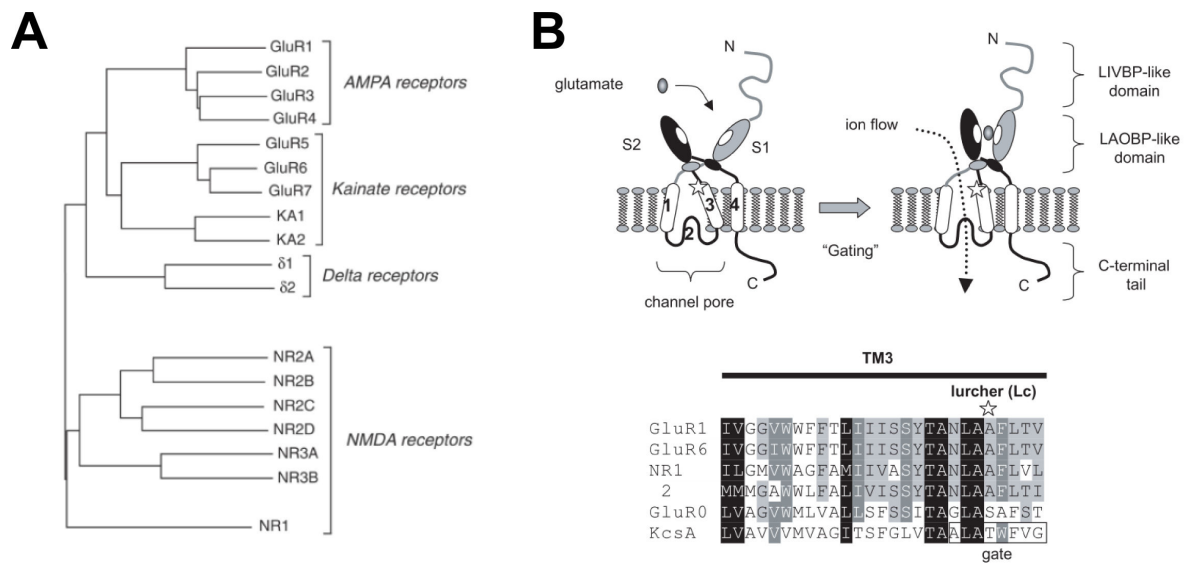


FIGURE VI.1 – **A** Arbre phylogénétique des récepteurs au glutamate. **B** Représentation schématique d'un récepteur glutamatergique et conservation du motif de pore YTNLAAF. *D'après Yuzaki, 2003*

génération d'une lignée GluR $\delta 1$ KO a permis de montrer une forte expression de la protéine au niveau de l'oreille interne ainsi que dans l'hippocampe (Figure VI.2, Safieddine and Wenthold, 1997, Gao et al., 2007). Plus récemment, notre équipe a montré une expression ubiquitaire de GluR $\delta 1$ dans l'ensemble du cerveau de la souris.

Phénotype des mutants de GluR $\delta 2$

Les données fonctionnelles sur les sous-unités GluR δ ont été obtenues principalement sur GluR $\delta 2$. En effet, il existe un mutant murin naturel de GluR $\delta 2$ présentant une forte ataxie cérébelleuse. Ce mutant, nommé *hotfoot*, présente une délétion des segments transmembranaires M2 à M4 sur le gène de GRID2 (Lalouette et al., 1998, 2001). Une vingtaine de variants *hotfoot* ont depuis été caractérisés qui présentent tous des délétions plus ou moins étendues sur le gène de GRID2 (Wang et al., 2003). Néanmoins, tous les mutants *hotfoot* présentent un pore de canal non fonctionnel mais conservent les résidus C et N-terminaux intacts maintenant les sites d'interaction protéine-protéine fonctionnels. Il faut toutefois souligner que chez certains mutants, la protéine est retenue dans la réticulum endoplasmique ou dans le soma (Matsuda and Yuzaki, 2002, Motohashi et al., 2007). Tous ces mutants souffrent de problèmes moteurs : ataxie et marche sur la pointe

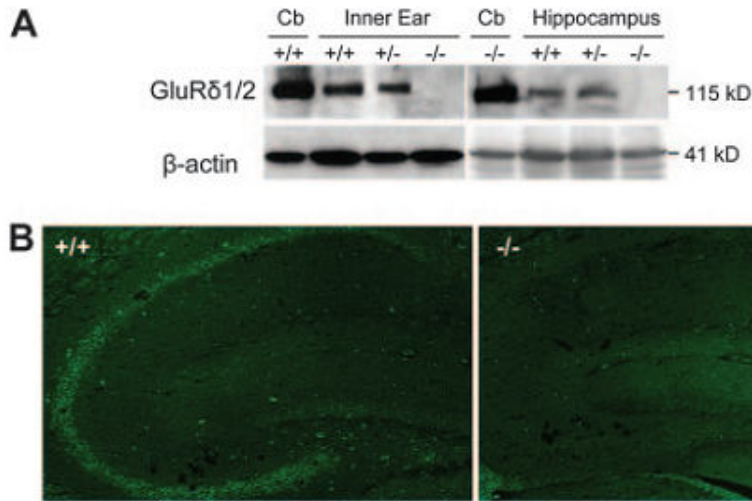


FIGURE VI.2 – Génération du mutant *GluRδ1* $-/-$. **A**. Western blot montrant l'expression de *GluRδ1* et *GluRδ2* dans le cervelet, l'oreille interne et l'hippocampe chez le WT et *GluRδ1* $-/-$. **B**. Immunofluorescence sur tranche d'hippocampe. D'après Gao et al., 2007

des pattes.

Un autre mutant, dit Lurcher, a été également très utile à la compréhension du fonctionnement de *GluRδ2*. Ce mutant présente une mutation dans une séquence d'acides aminés (YTANLAAF) hautement conservée dans l'ensemble de la famille des récepteurs ionotropiques au glutamate (Zuo et al., 1997). Cette mutation entraîne l'ouverture constitutive du pore du canal. Physiologiquement, le Lurcher est ataxique et présente une dégénérescence des cellules de Purkinje. Cette mutation est si sévère que seuls les hétérozygotes survivent, les homozygotes meurent peu après la naissance.

Enfin le mutant non-naturel KO pour *GluRδ2* présente également des troubles de coordination motrice (Kashiwabuchi et al., 1995).

Rôle de *GluRδ2* dans la stabilisation d'une synapse cérébelleuse

D'un point de vue cellulaire, Araki et ses collaborateurs ont montré que *GluRδ2* était principalement exprimé par les cellules de Purkinje et s'intègre au sein de la synapse entre les fibres parallèles et les cellules de Purkinje (Araki et al., 1993). D'après les travaux de l'équipe de M. Yuzaki, *GluRδ2* serait impliqué dans un grand nombre d'étapes de la vie de la cellule de Purkinje. L'absence de *GluRδ2*

se traduit par une réduction drastique du nombre de synapses entre les fibres parallèles et les cellules de Purkinje et une atrophie des dendrites de ces cellules (Kashiwabuchi et al., 1995). Au cours du développement, GluR δ 2, en association avec mGluR1, participerait à l'élimination des synapses des fibres grimpantes (Hashimoto et al., 2001), jouerait également un rôle dans le *trafficking* des récepteurs AMPA (Hirai et al., 2003) et pourrait même être impliqué dans la morphogenèse des mitochondries (Liu and Shio, 2008).

Le canal de GluR δ 2 ne s'ouvrant pas lors de l'application de glutamate ou d'un neurotransmetteur classique, les études se sont principalement concentrées sur les propriétés de liaison protéine-protéine du récepteur plutôt que sur sa capacité à transduire un signal électrique (Hironaka et al., 2000, Kakegawa et al., 2008). Ainsi, le domaine N-terminal serait impliqué dans le recrutement des terminaisons pré-synaptiques et régulerait la synaptogenèse (Kakegawa et al., 2008). Quant au domaine C-terminal, il a originellement été impliqué dans la dépression à long terme (LTD) de la synapse entre la fibre parallèle et la cellule de Purkinje (Hirano et al., 1994, Kashiwabuchi et al., 1995, Kohda et al., 2007, Uemura et al., 2007, Mandolesi et al., 2009). Le domaine C-terminal présenterait aussi une région de 13 acides aminés nécessaires à la sortie de la protéine du réticulum endoplasmique (Matsuda et al., 2004), un site d'envoi à la membrane (Matsuda and Mishina, 2000), un site de stabilisation à la synapse (Matsuda et al., 2006) et un site de liaison avec une protéine exprimée de façon préférentielle dans les cellules de Purkinje : la delphinine (Matsuda et al., 2006).

Récemment, il a été montré que GluR δ 2 est impliqué de façon plus générale dans la formation et le maintien des synapses. En effet, GluR δ 2 en position post-synaptique interagit par l'intermédiaire de Cbln1 avec la Neurexine pré-synaptique (Kakegawa et al., 2009, Matsuda et al., 2010, Uemura et al., 2010). Cbln1 appartient à la super famille des *tumor necrosis factor* et joue un rôle fondamental dans le maintien et l'intégrité des synapses, il est particulièrement exprimé dans les cellules de Purkinje et avait déjà été impliqué dans la dépression à long terme (Hirai et al., 2005, Miura et al., 2006).

GluR δ 1 et GluR δ 2 possèdent un canal fonctionnel

L'intégrité du canal de GluR δ 1 et GluR δ 2 a été initialement testée sur le mutant Lurcher qui est ouvert de façon constitutive grâce à une mutation dans TM3 (dans le motif YTANLAAF). La caractérisation électrophysiologique du récepteur Lurcher en milieu hétérologue montre qu'il possède des caractéristiques similaires aux autres iGluRs, en particulier aux AMPARs (Kohda et al., 2000, Wollmuth et al., 2000). Comme les récepteurs AMPA, il possède un site Q/R, qui modifie les propriétés de rectification sortante. Néanmoins, toutes les tentatives pharma-

cologiques pour ouvrir le canal se sont soldées par un échec (Lomeli et al., 1993, Williams et al., 2003, Naur et al., 2007, Schmid and Hollmann, 2008). La génération de récepteurs chimères comprenant le site de liaison à l'agoniste provenant d'un AMPAR et le pore de GluR δ 2 permet de contrôler l'ouverture du canal avec les ligands habituels des iGluRs prouvant ainsi la fonctionnalité du canal (Kohda et al., 2003, Kakegawa et al., 2007, Schmid and Hollmann, 2008, Schmid et al., 2009). On a ainsi pu montrer que, à l'instar des récepteurs du glutamate non-NMDA, le canal de GluR δ 2 laisse passer un courant cationique non-spécifique (potassique, sodique et calcique), sensible aux polyamines (Koike et al., 1997, Kohda et al., 2000) et présentant une double rectification de la courbe I-V (Kohda et al., 2000, 2003). Une étude aux résultats similaire a été récemment menée sur GluR δ 1 (Yadav et al., 2011).

L'étude cristallographique de GluR δ 2 a également permis de montrer que le récepteur possède un site de liaison à la D-sérine ou à la glycine, dont l'application entraîne des changements conformationnels de GluR δ 2 comparables à ceux observés dans les autres iGluRs (Naur et al., 2007, MacLean, 2009). Mais si la D-sérine inhibe partiellement le courant chez le Lurcher, elle n'ouvre pas le canal (Hansen et al., 2009, Yadav et al., 2011).

Des résultats récemment publiés et obtenus en collaboration par les équipes de Carole Levenes et Laurent Fagni montrent une interaction fonctionnelle entre le récepteur métabotrope au glutamate mGluR1 et GluR δ 2 (Ady et al., 2014). Cette interaction dont la nature n'est pas encore connue permet l'ouverture d'une conductance cationique en système hétérologue (Figure VI.3.A). Les courbes I-V obtenues lors de ces expériences montrent une rectification typique des récepteurs au glutamate non-NMDA. L'application de DHPG, un agoniste mGluR1 sur des cellules de Purkinje induit également un courant cationique lent similaire à celui observé en système hétérologue qui est fortement réduit chez le mutant hotfoot (Figure VI.3.B).

Le slow EPSC : TRPC ou GluR δ ?

Les canaux TRPC et leur implication dans les courants métabotropiques

Le potentiel transitoire de récepteurs (TRP) a été découvert en 1975 chez un mutant naturel de la drosophile (*Drosophila magalonaster*) par le groupe de Minke (Minke et al., 1975). La super-famille des TRPs compte aujourd'hui plus de 25 membres chez les mammifères. Elle se divise en 7 sous-familles qui sont impliquées dans l'ensemble des fonctions sensorielles (ouïe, odorat, mécano-sensibilité, thermo-sensibilité, nociception, photo-sensibilité, etc.), c'est pourquoi ils sont sou-

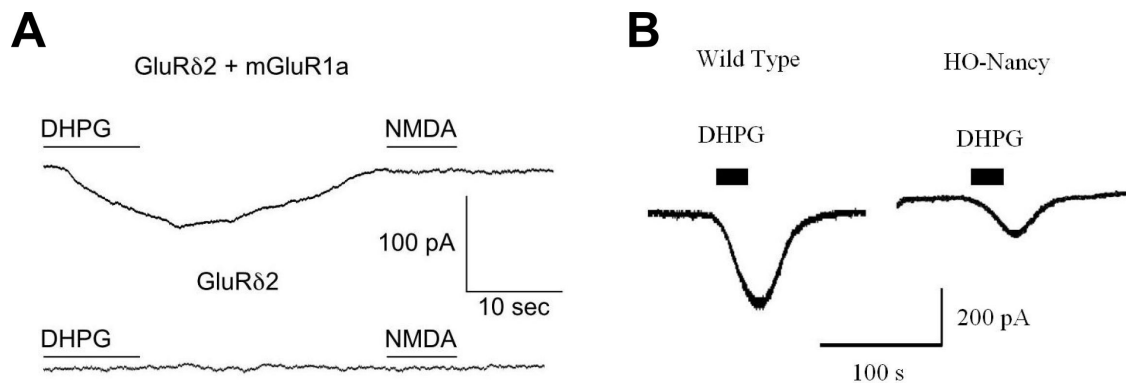


FIGURE VI.3 – **A.** Enregistrement en système hétérologue du courant GluR δ 2 en présence de DHPG. **B.** Enregistrement d’une cellule de Purkinje en tranche lors de l’application de DHPG.

vent considérés comme des senseurs cellulaires.

Parmi les TRPs, les TRPCs sont connus pour être activés via les protéines G (Hofmann et al., 1999). De nombreuses études se sont donc penchées sur le rôle des TRPCs dans les courants générés par l’activation des mGluRs. Dans la substance noire compacte (SNc), TRPC3 médierait le courant mGluR1/5 (Shen and Johnson, 1997, Bengtson et al., 2004), alors que dans les cellules de Purkinje ce serait plutôt TRPC1 et TRPC3 (Kim et al., 2003, Canepari et al., 2004, Hartmann et al., 2008).

Cependant, un courant résiduel persiste chez les différents TRPCs KO et les différentes équipes citées précédemment s’accordent pour dire que le courant mGluR n’est pas intégralement médié par les TRPCs.

Le slow EPSC des cellules de Purkinje

Dans les cellules de Purkinje, un courant lent excitateur (slowEPSC) peut être induit par stimulation électrique des fibres parallèles. De nombreuses controverses existent à son sujet, mais l’avis le plus largement diffusé et le plus consensuel suggère que ce courant est médié par mGluR1 qui active les TRPC1 et 3 (figure VI.4 et Kim et al., 2003, Canepari et al., 2004, Hartmann et al., 2008).

Cependant, les travaux de Ady ses collaborateurs ont récemment mis en évidence une réduction importante de l’amplitude du slowEPSC chez le mutant hot-foot (Figure VI.4). Ce mutant possédant des domaines C et N-terminaux intacts, on ne peut imputer cette réduction d’amplitude à une déstabilisation de la synapse entre les fibres parallèles et les cellules de Purkinje. De plus, l’analyse pharmacologique du courant montre qu’il est bloqué en présence de polyamines (ajoutées en extracellulaire sous forme de NASPM), qui sont connues pour affecter les canaux

de types AMPA et les GluR δ mais pas les TRPCs. Enfin, les antagonistes, non spécifiques, des TRPCs ne bloquent pas tout le courant.

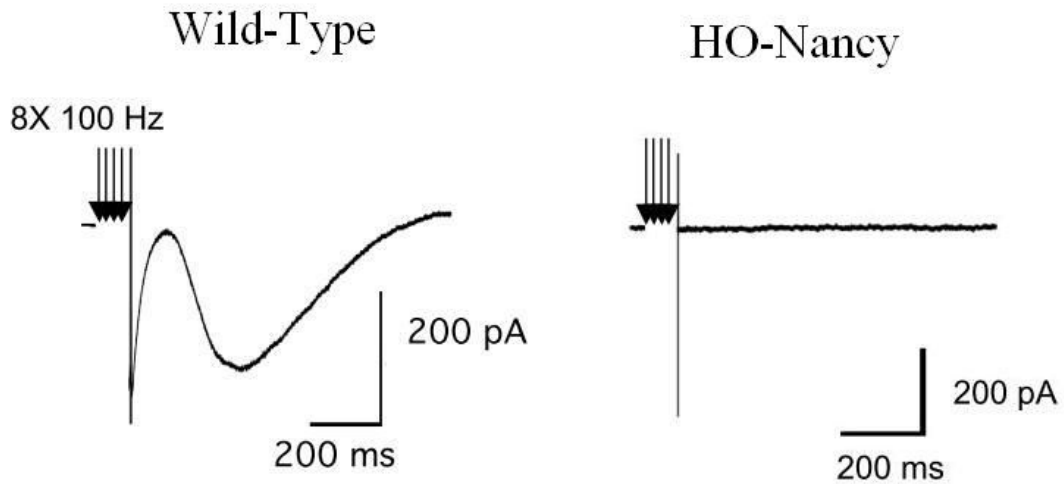


FIGURE VI.4 – slowEPSC dans les cellules de Purkinje chez le WT et aboli chez le Hotfoot. *D'après Ady et al., 2014.*

Diversité des courants mGluR

De part la lenteur relative des courants induits par l'activation des récepteurs métabotropiques, les mGluRs seraient impliqués dans un certain nombre de processus requérant des activités persistantes. Il pourraient par exemple avoir un rôle dans certaines formes de plasticité synaptique à long terme ou homéostatique, et auraient donc un rôle dans la mise en place de traces mnémoniques. En particulier, dans le néocortex, l'application d'agonistes mGluR permet l'induction dans les cellules pyramidales de plateaux dépolarisants qui sont impliqués dans le maintien des activités persistantes (Egorov et al., 2002). Dans les neurones dopaminergiques, les courants mGluRs pourraient être impliqués dans la génération des bouffées de potentiels d'action permettant la libération massive de dopamine dans les structures cibles (striatum et mPFC). Par conséquent, les courants mGluRs ont une très grande importance physiologique qui reste encore à mieux comprendre.

2 | Résultats

Les récepteurs glutamatergiques de la famille delta sont exprimés dans l'ensemble du cerveau

Les premières études de caractérisation de l'expression de GluR δ 1 et GluR δ 2 avaient montré que GluR δ 1 n'est exprimé que de façon très transitoire pendant le développement puis ne persiste que dans l'oreille interne. Dans le cas de GluR δ 2, l'expression dans le cervelet est si importante que les études ont négligé son rôle dans les autres structures cérébrales.

Cette première étude vise à réévaluer l'expression de GluR δ 1 et GluR δ 2 dans l'ensemble du cerveau. Pour cela, différentes techniques de biologie moléculaire et cellulaire ont été utilisées : scRT-PCR, hybridation *in situ*, qPCR quantitative, *western blotting*, immunofluorescence et microscopie électronique. De plus, les anti-corps commerciaux disponibles présentant une mauvaise spécificité en immunohistochimie, un anti-corps spécifique pour GluR δ 1 a été développé et produit. L'ensemble des expériences a permis de montrer que, contrairement à ce qui a été publié précédemment, GluR δ 1 et GluR δ 2 sont fortement exprimés dans l'ensemble du SNC. Au cours du développement post-natal, l'expression de GluR δ 1 augmente, contrairement à ce qu'il avait été précédemment montré, jusqu'à atteindre un plateau à partir de la 3^{ème} semaine post-natal. Chez l'adulte, GluR δ 1 et GluR δ 2 sont largement exprimés dans le néocortex avec néanmoins une prééminence de GluR δ 1. Dans l'hippocampe, la scPCR quantitative a permis de montrer une expression bien supérieure de GluR δ 1 que de GluR δ 2. De plus, les données de microscopie électronique suggèrent que dans l'hippocampe GluR δ 1 est présent au niveau des synapses symétriques et asymétriques. Dans le cervelet, GluR δ 2 est principalement exprimé mais on trouve GluR δ 1 en petite quantité. Enfin, dans le cortex, il semblerait qu'il y ait une expression de GluR δ 1 qui dépende de la couche corticale mais cela n'a pas été quantifié.

Glutamate receptors of the delta family are widely expressed in the adult brain

Régine Hepp · Y. Audrey Hay · Carolina Aguado · Rafael Lujan ·
Luce Dauphinot · Marie Claude Potier · Shinobu Nomura · Odile Poirel ·
Salah El Mestikawy · Bertrand Lambolez · Ludovic Tricoire

Received: 29 January 2014 / Accepted: 17 June 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract Recent reports point to critical roles of glutamate receptor subunit delta2 (GluD2) at excitatory synapses and link GluD1 gene alteration to schizophrenia but the expression patterns of these subunits in the brain remain almost uncharacterized. We examined the distribution of GluD1–2 mRNAs and proteins in the adult rodent brain, focusing mainly on GluD1. In situ hybridization revealed widespread neuronal expression of the GluD1 mRNA, with higher levels occurring in several forebrain regions and lower levels in cerebellum. Quantitative RT-PCR assessed differential GluD1 expression in cortex and cerebellum, and revealed GluD2 expression in cortex, albeit at markedly lower level than in cerebellum. Likewise, a high GluD1/GluD2 mRNA ratio was observed in cortex and a low ratio in cerebellum. GluD1 and GluD2 mRNAs were co-expressed in single cortical and hippocampal neurons, with a large predominance of GluD1. Western blots using GluD1- and GluD2-specific antibodies showed expression of both subunits in various brain

structures, but not in non-nervous tissues examined. Both delta subunits were upregulated during postnatal development. Widespread neuronal expression of the GluD1 protein was confirmed using immunohistochemistry. Examination at the electron microscopic level in the hippocampus revealed that GluD1 was mainly localized at postsynaptic density of excitatory synapses on pyramidal cells. Control experiments performed using mice carrying deletion of the GluD1- or the GluD2-encoding gene confirmed the specificity of the present mRNA and protein analyses. Our results support a role for the delta family of glutamate receptors at excitatory synapses in neuronal networks throughout the adult brain.

Keywords Delta glutamate receptors · Cortex · Cerebellum · GRID1 · GRID2

Introduction

Glutamate is the main excitatory neurotransmitter in the vertebrate central nervous system. During the quest for

B. Lambolez and L. Tricoire contributed equally.

R. Hepp · Y. Audrey Hay · S. Nomura · O. Poirel ·
S. El Mestikawy · B. Lambolez · L. Tricoire (✉)
Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR CR 18,
Neuroscience Paris Seine, 75005 Paris, France
e-mail: ludovic.tricoire@snv.jussieu.fr

R. Hepp · Y. Audrey Hay · S. Nomura · O. Poirel ·
S. El Mestikawy · B. Lambolez · L. Tricoire
Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS),
UMR 8246, Paris, France

R. Hepp · Y. Audrey Hay · S. Nomura · O. Poirel ·
S. El Mestikawy · B. Lambolez · L. Tricoire
Institut national de la Santé et de la Recherche Médicale
(INSERM), UMR-S 1130, Paris, France

C. Aguado · R. Lujan
Departamento de Ciencias Médicas, Facultad de Medicina,
Instituto de Investigación en Discapacidades Neurológicas
(IDINE), Universidad Castilla-La Mancha, Campus Biosanitario,
C/Almansa 14, 02008 Albacete, Spain

L. Dauphinot · M. C. Potier
Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, Inserm, CNRS,
UM 75, U1127, UMR 7225, ICM, 75013 Paris, France

S. El Mestikawy
Department of Psychiatry, Douglas Hospital Research Center,
McGill University, Montreal, Quebec H4H 1R3, Canada

ionotropic glutamate receptors (iGluRs) two peculiar candidates, GluRdelta1 (GluD1) and GluRdelta2 (GluD2), were cloned by sequence homology with iGluRs subunits of the AMPA, Kainate, and NMDA subtypes (Araki et al. 1993; Lomeli et al. 1993; Yamazaki et al. 1992). However, delta subunits are unresponsive to glutamate and progress in identifying their functions has been slower than for other iGluRs (Schmid and Hollmann 2008).

Much of what is known on GluD2 derives from studies of GluD2, which is prominently expressed in cerebellar Purkinje cells (Araki et al. 1993; Lomeli et al. 1993) and is required for proper development and function of the cerebellum (Kakegawa et al. 2008; Kashiwabuchi et al. 1995). GluD2 acts as a synapse organizer via interactions with postsynaptic scaffold and signaling proteins, and with presynaptic parallel fiber terminals (Kakegawa et al. 2008; Matsuda et al. 2010; Uemura et al. 2010). Moreover, the metabotropic glutamate receptor mGlu1 associates with GluD2 (Kato et al. 2012) and triggers the opening of the GluD2 channel, which is critically involved in the slow glutamatergic current at the parallel fiber-to-Purkinje cell synapse (Ady et al. 2014; Kato et al. 2012).

Recombinant GluD1 is also endowed with a functional channel pore domain and promotes synapse formation *in vitro* (Kuroyanagi et al. 2009; Orth et al. 2013; Ryu et al. 2012; Yadav et al. 2011). Several reports implicate the GRID1 gene in schizophrenia (Fallin et al. 2005; Guo et al. 2007; Treutlein et al. 2009). Likewise, GRID1 knockout (KO) mice exhibit behavioral correlates of schizophrenia symptoms, such as hyperaggressiveness and deficits in social interaction (Gao et al. 2007; Yadav et al. 2012, 2013), thereby establishing the requirement of GluD1 for normal brain functions. However, little is known on the explicit functions of GluD1 in neuronal networks, for its expression pattern in the postnatal brain remains almost uncharacterized.

Original studies of delta subunits mRNA distribution in the rodent brain report selective GluD2 expression in Purkinje cells and rapid postnatal decrease of GluD1 expression down to low levels in the adult (Araki et al. 1993; Lomeli et al. 1993). However, subsequent reports indicate that adult expression of both subunits is more widespread than originally described (Gao et al. 2007; Mayat et al. 1995; Yadav et al. 2012; Yamasaki et al. 2011). This prompted us to re-examine their expression patterns across the brain with a primary focus on GluD1.

We used a combination of *in situ* hybridization, RT-PCR, western blot and immunohistochemistry to characterize the expression patterns of GluD1 and GluD2 in the rodent brain. We found that both delta subunits are widely expressed in the adult brain and co-localize at the single cell level. The expression of both subunits increases after birth, and we provide evidence for postsynaptic localization of GluD1. Our results support a role for the delta

family of glutamate receptors in neuronal networks throughout the adult brain.

Materials and methods

Animals

All animal handling procedures were performed in accordance with European Commission guidelines (2010/63/UE). Genotyping of GluD1 KO mice (generous gift from Jian Zuo, Memphis, TE) mice was performed by end-point PCR as described previously [Table 1; Fig. 1, (Gao et al. 2007)]. GluD2 hotfoot (HO) mice (HO-Nancy line, a generous gift from Carole Levenes, Paris, France) exhibit a deletion of the exons 9–12 (Lalouette et al. 2001). Genotyping of the GluD2 HO allele was performed by copy number quantitative PCR. Genomic DNA was extracted using the Agencourt DNAdvance kit (Beckman coulter, Villepinte, France). Exons 7, 10 and 11 were amplified separately from 10 ng of genomic DNA using specific primers (Table 1; Fig. 1) in a total reaction volume of 10 μ l using the LC480 Sybr Green I Master mix on a Lightcycler[®] 480 System (Roche). One step at 95 °C for 5 min followed by 45 cycles (95 °C, 15 s; 60 °C, 60 s) were performed. Each PCR reaction was performed in duplicate according to manufacturer instructions. Relative abundance of exon 10 compared to wild-type (WT) animals was calculated using the formula $2^{-(\text{Ct}(\text{exon}7) - \text{Ct}(\text{exon}10)) - (\text{Ct}(\text{exon}7\text{WT}) - \text{Ct}(\text{exon}10\text{WT}))}$ where mean Ct values were normalized to the mean Ct value of exon 7 and to those values obtained from WT animals. Similar formula was used for quantification of exon 11 abundance. Typical Ct values were in the range 20–23. In heterozygous mice, exons 10 and 11 were twice less abundant than in WT mice. Homozygous mice were identified by the absence of amplification of both exons 10 and 11 (typically Ct >32).

In situ hybridization

Mouse brains of WT mice were frozen in isopentane at -30 °C. Sections were prepared with a cryostat at -20 °C, thaw-mounted on glass slides and stored at -80 °C until use. Regional mRNA hybridization *in situ* was performed as described (Gras et al. 2008). Antisense oligonucleotides (see Table 1; Fig. 1) were designed using Helios oligo design software (Helios Biosciences, France). Negative controls were performed using sense oligonucleotides complementary to antisense probes. Oligonucleotides were labeled with [S^{35}]dATP (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK) using terminal transferase to a specific activity of 5×10^8 dpm/ μ g. The day of the experiment, slides were

Table 1 PCR primers

Application	GenBank accession number	Sequence	Size (bp)
scRT-PCR	vGluT1 NM_053859.1	1st PCR: Sense, 361 GGCTCCTTTTTCTGGGGGTAC ^a	259
		Antisense, 600: CCAGCCGACTCCGTTCTAAG	
		2nd PCR: sense, 373: TGGGGGTACATTGTCACTCAGA ^a	201
		Antisense, 553: ATGGCAAGCAGGGTATGTGAC	
	GAD65 NM_012563.1	1st PCR: sense, 99: CCAAAAGTTCACGGGCGG ^a	375
		Antisense, 454: TCCTCCAGATTTTGC GGTTG	
		2nd PCR: sense, 156: TGAGAAGCCAGCAGAGAGCG ^a	260
		Antisense, 392: TGGGGTAATGGAAATCAATCACTT	
	GAD67 NM_017007.1	1st PCR: sense, 83: ATGATACTGGTGTGGCGTAGC ^a	253
		Antisense, 314: GTTTGCTCCTCCCCGTCTTAG	
		2nd PCR: Sense, 159: CAATAGCCTGGAAGAGAAGAGTCCG ^a	177
		Antisense, 314: GTTTGCTCCTCCCCGTCTTAG	
GluD1 NM_024378.1	1st PCR: sense, 582: ACAAAGGTGGACAAGAACATCAG	329	
	Antisense, 910: GGGAAAGAGATGCGGTGGTTAT		
	2nd PCR: sense, 614: TACCAGCCTCTCACCACC	291	
	Antisense, 9034: AGATGCGGTGGTTATTCCTCA		
GluD2 NM_024379.1	1st PCR: sense, 1985: AGAGCTCCATCCAGTCTCTTCAGG	337	
	Antisense, 2321: AGTGCGATGCCATACCCCG		
	2nd PCR: sense, 2037: TGGCACAGTCTTGATTCCGCA	235	
	Antisense, 2271: GGAACAGTCGGGGTCATTGATGGC		
ISH	GluD1 NM_008166.2	Antisense 1, 1286: GGGCCTCTCTGTAGACTGCCATTCAAGCCCTTC	–
		Antisense 2, 398: GCTAGGGTTCAGGTGGCAGGCAGTACGTGGTGAAC	
		Antisense 3, 257: TCCCTGGGTCATGAGGTCACAGGCTTCTTGC	
		Antisense 4, 2241: CTCCACCACGGCCACATCCCATAGAAAGGCGTAG	
		Antisense 5, 2719: CCCCCATCTCTAGGGCAGAAAGCTCAATGGACGC	
RT-qPCR	GluD1 NM_008166.2	Sense, 2582: ACCAGGAGACCCCCAAAG	77
		Antisense, 2658: TTCATCCATGAGGCTGTTGA	
	GluD2 NM_008167.2	Sense, 1958: CCGCTTTCCTCACTATCACC	65
		Antisense, 2022: TTGCTTGGACAGATCCTGAA	
	TBP NM_013684.3	Sense, –160: GGCGGTTTGGCTAGGTTT	83
		Antisense, –78: GGGTATCTTCACACACCATGA	
	Ppib NM_011149.2	Sense, 454: TTCTTCATAACCACAGTCAAGACC	92
		Antisense, 545: ACCTTCCGTACCACATCCAT	
	HRPT NM_013556.2	Sense, 267: TGATAGATCCATTCCTATGACTGTAGA	126
		Antisense, 392: AAGACATTCTTCCAGTTAAAGTTGAG	
Actb NM_007393.3	Sense, 337: AAGGCCAACCGTGAAAAGAT	110	
	Antisense, 446: GTGGTACGACCAGAGGCATAC		
RT-cPCR	GluD1/ GluD2	Sense, 1171/ 1184 : ATGTCCA(G/C)TTTGAAATCCTTGG	453/ 452
Genotyping	GluD1-KO	Antisense, 1623/ 1635 : Cy5.5-CACTGAGTAGTCCATGTAGCG	
		Wild-type: sense: GCAAGCGCTACATGGACTAC ^b	220
		Antisense: GGCACTGTGCAGGGTGGCAG	
		Mutant: sense: CCTGAATGAACTGCAGGACG ^b	500
		Antisense: CGCTATGTCCTGATAGCGATC	
	GluD2-HO	Exon 7: sense: AGCTGGAGGACCGTAAGTGGCA	96
		Antisense: TGGTCTCCAGCATGGACCGC	
		Exon 10: sense: CCGAAGAAATACCAGGGCTTCTCCA	121
		Antisense: TCCCATCCTCTTGTGGGCTTCCA	
		Exon 11: sense: CCATCACTCCAGACCGGGAGAA	150
Antisense: CAGCAATGCAGGCCACAGA			

Position 1, first base of the start codon. Bold characters refer to GluD2

^a Karagiannis et al. (2009)

^b Gao et al. (2007)

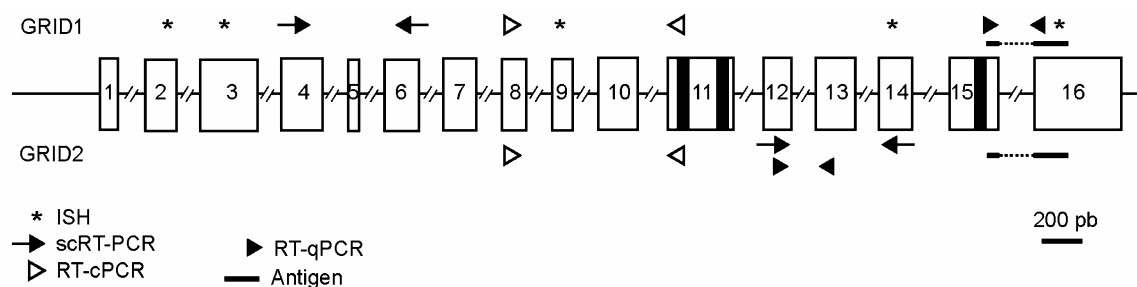


Fig. 1 Location of the probes used in this study on the GRID1 and GRID2 genes. Intron–exon structure of GRID1 and GRID2 genes, in which *open boxes* refer to exon sequences and *black boxes* to transmembrane domains of the GluD1 and GluD2 proteins. The *horizontal bars* indicate the coding sequence of the antigen used for the generation of the anti-GluD1 and anti-GluD2 antibodies. *Asterisk*,

arrows, and *arrowheads* indicate the positions of the oligonucleotide probes used to analyze GluD1 and GluD2 mRNA expression in the present study. *ISH* in situ hybridization, *scRT-PCR*, *RT-cPCR*, and *RT-qPCR* single cell, co-amplification and quantitative RT-PCR, respectively. RT-cPCR quantifies GluD1 and GluD2 mRNA ratios by co-amplification of their cDNAs using a single primer pair

fixed in 4 % formaldehyde in PBS, washed with PBS, rinsed with water, dehydrated in 70 % ethanol, and air-dried. Sections were then covered with 140 μ L of hybridization medium (Helios Biosciences, France) containing $3\text{--}5 \times 10^5$ dpm of the labeled oligonucleotide mix. Slides were incubated overnight at 42 $^{\circ}$ C, washed, dried, and exposed to BAS-SR Fujifilm Imaging Plate for 3 weeks. The plates were scanned with a Fujifilm BioImaging Analyzer BAS-5000.

Quantitative RT-PCR

Total RNAs were extracted from frozen individual neocortex and cerebellum and treated with DNase using Nucleospin RNA II kit (Macherey–Nagel, France) in accordance with the manufacturer's protocol. One microgram of each RNA sample was individually reverse transcribed into cDNAs for 2 h at 42 $^{\circ}$ C using the Verso cDNA kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) according to the manufacturer's instructions. qPCR assays were performed in a Lightcycler[®] 480 System (Roche), in the presence of 200 nM of each primer (Table 1; Fig. 1), 100 nM of specific hydrolysis probe (designed with Universal Probe Library, Roche Applied Science) and 1X Solaris qPCR Master mix (Thermo Scientific). Each amplification reaction was performed in triplicate. For the quantification of GluD1 and 2 transcripts in WT versus mutant animals, amplification data were obtained from four 1-month old animals of each genotype and normalized to those obtained with the reference genes TATA box binding protein (TBP) and peptidylprolyl isomerase B (Ppib, also known as cyclophilin B). For the developmental analysis of GluD1 and 2, 2–6 animals were used for each time point and TBP, Ppib, hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HRPT) and beta-actin (Actb) genes were used for normalization. Validation of these genes for use as reference was performed by Vandesompele et al. (2002)

and Pachot et al. (2004) and normalization was performed using the formula given in Hellemans et al. (2007).

Relative abundance of GluD1 and GluD2 mRNAs

The procedure was performed essentially as described by (Lambolez et al. 1996), except that quantification was based on fluorescence instead of radioactivity (Angulo et al. 1997; Szabo et al. 2012). The quantification of transcripts for GluD1 and 2 was performed from four 4-months old mice via co-amplification using a Cy5.5 fluorescently labeled antisense primer and repeated three times for each animal. Fifty nanogram of cDNA prepared from individual mouse cortex and cerebellum (see above) were amplified using 20 pmol of each primer (Table 1; Fig. 1) in a total reaction volume of 100 μ l according to manufacturer instruction. Half of the antisense primer was 5' labeled with Cy5.5. Five cycles (94 $^{\circ}$ C, 30 s; 45 $^{\circ}$ C, 30 s; ramp to 72 $^{\circ}$ C, 1 min 10 s; 72 $^{\circ}$ C, 30 s) followed by 35 cycles (94 $^{\circ}$ C, 30 s; 49 $^{\circ}$ C, 30 s; 72 $^{\circ}$ C, 30 s) were performed. The PCR products were digested by BfaI and HpaII, which selectively cut GluD1 and GluD2 PCR fragments, respectively. The restriction reactions were performed overnight at 37 $^{\circ}$ C on 2 μ l aliquots of the PCR product in a 5 μ l volume, and then run in parallel on a 2 % agarose gel. Fluorescence was acquired using the Odyssey infrared imaging system (LI-COR Biosciences) using the excitation at 700 nm. Quantification of fluorescence integrals was performed on raw images using the gel analyzer plugin of ImageJ software. Because only the antisense primer was labeled, each restriction cut generated only one labeled restriction fragment. For each run, corresponding to a subunit-specific cut, the integral of the fluorescence present in both the cut and the uncut peaks was normalized to 100 %. The percentage of fluorescence present in the cut peak thus represented the percentage of the corresponding subunit in the GluD1-2 amplified products. For establishing

the calibration curves, PCR co-amplification of cloned GluD1 and 2 cDNA was performed similarly. Plasmids containing the full length open reading frame of GluD1 and 2 were mixed at different ratio to a final DNA concentration of 100 fg/ μ l. One microlitre (100 fg = 10^4 molecules of GluD1 and 2 cDNA) of this mix was then processed as above in quadruplicate.

Single cell RT-PCR

Experiments were done on acute slices prepared from 2- to 3-week-old wistar rats or C57BL/6 J mice (Janvier Labs). Electrophysiological characterization of rat neocortical or mouse hippocampal interneurons and pyramidal cells was performed by whole-cell patch-clamp recording using a potassium gluconate-based intracellular solution containing biocytin for post hoc morphological processing of recorded cells, as described (Karagiannis et al. 2009). At the end of the whole-cell recording, the cell cytoplasm was aspirated into the recording pipette while maintaining a tight seal. The pipette was removed delicately to allow outside-out patch formation. The content of the pipette was expelled into a test tube and reverse transcription (RT) was performed in a final volume of 10 μ l as described previously (Lambolez et al. 1992). Next, two steps of polymerase chain reaction (PCR) were performed essentially as described (Cauli et al. 1997). The cDNAs present in the RT reaction were first amplified simultaneously using the primer pairs described in Table 1 (for each primer pair the sense and antisense primers were positioned on two different exons, see Fig. 1 for GluD1-2). Taq polymerase (2.5 U; Qiagen, Hilden, Germany) and 20 pmol of each primer were added to the buffer supplied by the manufacturer (final volume, 100 μ l), and 21 cycles (94 °C for 30 s, 60 °C for 30 s, and 72 °C for 35 s) of PCR were run. Second rounds of PCR were performed using 2 μ l of the first PCR product as template. In this second round, each cDNA was amplified individually with a second set of primer pairs internal to the first PCR primer pair (nested primers) and positioned on two different exons. Thirty-five PCR cycles were performed (as described above). Then 10 μ l of each individual PCR were run on a 2 % agarose gel, in parallel with molecular weight markers and stained with ethidium bromide. The RT-PCR protocol was tested on 1 ng of total RNA purified from rat whole brain, and all the transcripts were detected. Sizes of the PCR-generated fragments were as predicted by the mRNA sequences. A control for mRNA contamination from surrounding tissue was performed by placing a patch pipette into the slice without establishing a seal. Positive pressure was then interrupted and, following the removal of the pipette, its content was processed as described. No PCR product was obtained using this protocol ($n = 5$).

The determination of the GluD1/GluD2 ratio at the single cell level was performed as described previously (Angulo et al. 1997; Lambolez et al. 1996). The GluD cDNAs present in the RT reaction were co-amplified with the primer pair described in Table 1 and Fig. 1 using 20 pmol of each primer in a total reaction volume of 100 μ l. Five cycles (94 °C, 30 s; 45 °C, 30 s; ramp to 72 °C, 1 min 10 s; 72 °C, 30 s) followed by 35 cycles (94 °C, 30 s; 49 °C, 30 s; 72 °C, 30 s) were performed. The product of this first PCR was purified on a 2 % low-melting-point agarose gel. Aliquots of the purified product from the first PCR were reamplified with the same primer pair, half of the antisense primer being Cy5.5 fluorescently labeled at the 5' end. Thirty-five cycles (94 °C, 30 s; 49 °C, 30 s; 72 °C, 45 s) were performed. The PCR products were then digested by the GluD1-selective enzyme BfaI, run on agarose gel and fluorescence was acquired and analyzed as described above. A control digest by both GluD1- and GluD2-selective (HpaII) enzymes was performed for each cell to verify the absence of uncut PCR product.

Production of GluD1-specific antibody

The portion of the mouse cDNA sequence encoding the C-terminal domain E⁸⁵²-S⁹²⁸ of GluD1 (UniprotKB accession number: Q61627, Fig. 1) was subcloned into the pGEX-2T vector and the GST-GluD1Ct fusion protein produced using IPTG induced BL21 bacteria. The GST-GluD1Ct protein was purified from the bacterial lysate on glutathione-Sepharose beads and dialyzed against PBS. Antisera recognizing GluD1 were generated by immunizing three rabbits with the purified GST-GluD1Ct protein (Agro-Bio, La Ferté Saint Aubin, France). For immunohistochemistry and electron microscopy, the antibodies were affinity purified on GST-GluD1Ct linked Affigel 15 (Biorad, France) and concentrated using Amicon filters with a 50 K cutoff (Millipore, France).

Western blot

Tissue, brain or transfected HEK cells lysates were obtained by sonication in ice-cold PBS supplemented with protease inhibitors (Roche Diagnostics, France). Protein concentration was quantified using the Bradford's method using BSA as standard. Equal protein amounts (15 μ g/lane for non-nervous tissues, 5 μ g/lane for brain and HEK cells lysates) were separated by SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose sheets. Protein loading was controlled by reversible Ponceau Red staining. Non-specific sites on nitrocellulose membranes were blocked for 1 h at room temperature with PBS containing Tween-20 (0.1 %) and 5 % non-fat dry milk. Membranes were incubated overnight with primary antibodies at 4 °C in PBS containing

Tween 20 (0.1 %), and 1 % non-fat dry milk. The primary antibodies used were mouse monoclonal against β -actin (1/10,000, Sigma; clones AC40 or AC15) or GAPDH (1/10,000; Millipore-Calbiochem; clone 6C5) and rabbit polyclonal against GluD1 (crude serum 1/10,000) and GluD2 (1/2,000; Frontier institute, Japan). Bound antibodies were detected with secondary anti-IgG antibodies coupled to either IRDye 700DX or IRDye 800CW (diluted 1/5,000, Tebu-bio, France) and analyzed with the LI-COR Odyssey detection system. For the quantification of GluD1 and 2 transcripts in different organs and brain structures, data were obtained from three 1-month old WT mice and normalized to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). For the developmental analysis of GluD1 and 2, 3 animals were used for each time point and Actb was used for normalization. Both GAPDH and Actb have been shown to provide reliable reference for quantification in our experimental conditions (Weldon et al. 2008).

Immunocytochemistry

Twenty-four hours after transfection with plasmids encoding GluD1 or GluD2 or with an empty vector, HEK cells were fixed with 4 % paraformaldehyde for 20 min and permeabilized with 0.25 % Triton X-100. Non-specific sites were blocked using 2 g/L fish skin gelatin (Sigma-Aldrich, France). Cells were incubated 2 h at room temperature with the affinity-purified rabbit anti-GST-GluD1Ct antibody (1/2,000). After washing, cells were incubated for 1 h at room temperature with Alexa Fluor 555-coupled F(ab')₂ fragments of goat anti-rabbit IgGs (1/2,000; Invitrogen, France). Cells were mounted in fluoromount (Clinisciences, France).

Tissue preparation for histoblotting and immunohistochemistry

For histoblotting, animals were deeply anaesthetized by intraperitoneal injection of ketamine/xylazine 1:1 (0.1 mL/kg b.w.) and the brains were quickly frozen in liquid nitrogen. For immunohistochemistry, animals were anaesthetized and transcardially perfused with ice-cold fixative containing 4 % paraformaldehyde, with or without 0.05 % glutaraldehyde and 15 % (v/v) saturated picric acid made up in 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.4). After perfusion, brains were removed and immersed in the same fixative for 2 h or overnight at 4 °C. Tissue blocks were washed thoroughly in 0.1 M PB. Coronal 60 μ m thick sections were cut on a Vibratome (Leica VT1000).

Histoblotting

The regional distribution of GluD1 was analyzed in mouse brain, using an in situ blotting technique (histoblot)

(Tonnes et al. 1999). Briefly, horizontal cryostat sections (10 μ m) from mouse brain were apposed to nitrocellulose membranes moistened with 48 mM Tris-base, 39 mM glycine, 2 % (w/v) sodium dodecyl sulfate, and 20 % (v/v) methanol for 15 min at room temperature (\sim 20 °C). After blocking in 5 % (w/v) non-fat dry milk in phosphate-buffered saline, nitrocellulose membranes were treated with DNase I (5 U/mL), washed and incubated in 2 % (w/v) sodium dodecyl sulfate and 100 mM β -mercaptoethanol in 100 mM Tris-HCl (pH 7.0) for 60 min at 45 °C to remove adhering tissue residues. After extensive washing, the blots were reacted with affinity-purified anti-GluD1 antibodies (0.5 μ g/mL) in blocking solution overnight at 4 °C. The bound primary antibodies were detected with alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit or anti-rabbit IgG secondary antibodies.

Immunohistochemistry for light microscopy

Immunohistochemical reactions at the light microscopic level were carried out using the immunoperoxidase method as described earlier (Lujan et al. 1996). Briefly, sections were incubated in 10 % normal goat serum (NGS) diluted in 50 mM Tris buffer (pH 7.4) containing 0.9 % NaCl (TBS), with 0.2 % Triton X-100, for 1 h. Sections were incubated in anti-GluD1 antibody (1–2 μ g/ml diluted in TBS containing 1 % NGS), followed by incubation in biotinylated goat anti-rabbit IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) in TBS containing 1 % NGS. Sections were then transferred into avidin-biotin-peroxidase complex (ABC kit, Vector Laboratories). Bound peroxidase enzyme activity was revealed using 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB; 0.05 % in TB, pH 7.4) as the chromogen and 0.01 % H₂O₂ as the substrate. Finally, sections were air-dried and coverslipped prior to observation in a Nikon photomicroscope (Nikon, Eclipse 80i) equipped with differential interference contrast optics and a digital imaging camera.

Immunohistochemistry for electron microscopy

Immunohistochemical reactions at the electron microscopic level were carried out using the pre- and post-embedding immunogold methods as described earlier (Lujan et al. 1996). These two methods provide complementary information about the subcellular and subsynaptic location of proteins and are best used in combination to achieve conclusive results. The pre-embedding immunogold is the most reliable method for the localization of proteins at extrasynaptic and perisynaptic sites, and the post-embedding for synaptic proteins at putative glutamatergic synapses (Lujan et al. 1996). Ultrastructural analyses were performed in a Jeol-1010 electron microscope.

Pre-embedding immunogold method

Briefly, free-floating sections were incubated in 10 % NGS diluted in TBS. Sections were then incubated in anti-GluD1 antibodies (4–5 µg/ml diluted in TBS containing 1 % NGS), followed by incubation in goat anti-rabbit IgG coupled to 1.4 nm gold (Nanoprobes Inc., Stony Brook, NY, USA). Sections were postfixed in 1 % glutaraldehyde and washed in double distilled water, followed by silver enhancement of the gold particles with a HQ Silver kit (Nanoprobes Inc.). Sections were then treated with osmium tetroxide (1 % in 0.1 M PB), block-stained with uranyl acetate, dehydrated in graded series of ethanol and flat-embedded on glass slides in Durcupan (Fluka) resin. Regions of interest were cut at 70–90 nm on an ultramicrotome (Reichert Ultracut E, Leica, Austria) and collected on 200-mesh copper grids. Staining was performed on drops of 1 % aqueous uranyl acetate followed by Reynolds's lead citrate.

Post-embedding immunogold method

Briefly, ultrathin sections 80-nm thick from Lowicryl-embedded blocks of hippocampus were picked up on coated nickel grids and incubated on drops of a blocking solution consisting of 2 % Human Serum Albumin (HSA) in 0.05 M TBS and 0.03 % Triton X-100 (TBST). The grids were incubated with anti-GluD1 antibodies (10 µg/ml in TBST with 2 % HSA) at 28 °C overnight. The grids were incubated on drops of goat anti-rabbit IgG conjugated to 10 nm colloidal gold particles (Nanoprobes) in 2 % HSA and 0.5 % polyethylene glycol in TBST. The grids were then washed in TBS and counterstained for electron microscopy with saturated aqueous uranyl acetate followed by lead citrate. Data were obtained from three young adult animals, three samples of tissue per animal for preparation of embedding blocks, totaling $n = 9$ blocks.

Quantification of immunogold labeling

To establish the relative frequency of GluD1 immunoreactivity in CA1 pyramidal cells, we used 60-µm coronal slices processed for pre-embedding immunogold immunohistochemistry. The procedures were similar to those used previously (Lujan et al. 1996). Briefly, for each of three young adult animals, three samples of tissue were obtained for preparation of embedding blocks, totaling $n = 9$ blocks. To minimize false negatives, electron microscopic serial ultrathin sections were cut close to the surface of each block, as immunoreactivity decreased with depth. We estimated the quality of immunolabeling by always selecting areas with optimal gold labeling at approximately the same distance from the cutting surface,

which was defined within 5–10 µm from the surface. Randomly selected areas were then photographed from the selected ultrathin sections and printed with a final magnification of 50,000×. Immunoparticles identified in each reference area and present in different subcellular compartments (dendritic spines, dendritic shafts, and axon terminals) were counted. Data were expressed as percentage of immunoparticles in each subcellular compartment.

Controls for electron microscopy

As controls for method specificity, sections were incubated with the omission of the primary antibodies, and other sections were incubated with 5 % normal rabbit serum replacing the rabbit primary antibodies. Under these conditions, immunoreactivity resembling that obtained using the specific antibodies could not be detected. Using polyclonal rabbit antibodies to calretinin, no plasma membrane labeling was observed with our post-embedding method, showing that the labeling of the plasma membrane is due to the antibodies raised to the peptide sequence present in GluD1.

Statistical analyses

All values presented in this study are mean \pm S.E.M. Statistical significance was assessed with Student's paired t test. p value <0.05 was considered statistically significant.

Results

Expression pattern of the GluD1 mRNA in the adult brain

Antisense oligonucleotide probes complementary to the GluD1 mRNA were chosen in regions of weak homology with the GluD2 mRNA and tested individually by in situ hybridization on parasagittal sections of adult mouse brain (see "Materials and methods"). Each of the five selected probes yielded a specific signal as judged from the weak signal observed with corresponding control sense probes in the same experimental conditions (Fig. 2a). An equimolar mix of the five antisense probes was used in all subsequent in situ hybridization experiments to determine the expression pattern of the GluD1 mRNA in the adult mouse brain. Labeling of the gray matter was observed throughout the antero-posterior and dorso-ventral axes of parasagittal sections, with strongest labeling in most forebrain regions, and weakest labeling in the cerebellum (Fig. 2a). Examination of coronal sections revealed intense labeling of the granular layer of the main olfactory bulb, piriform cortex, basal ganglia (dorsal striatum and nucleus accumbens) and

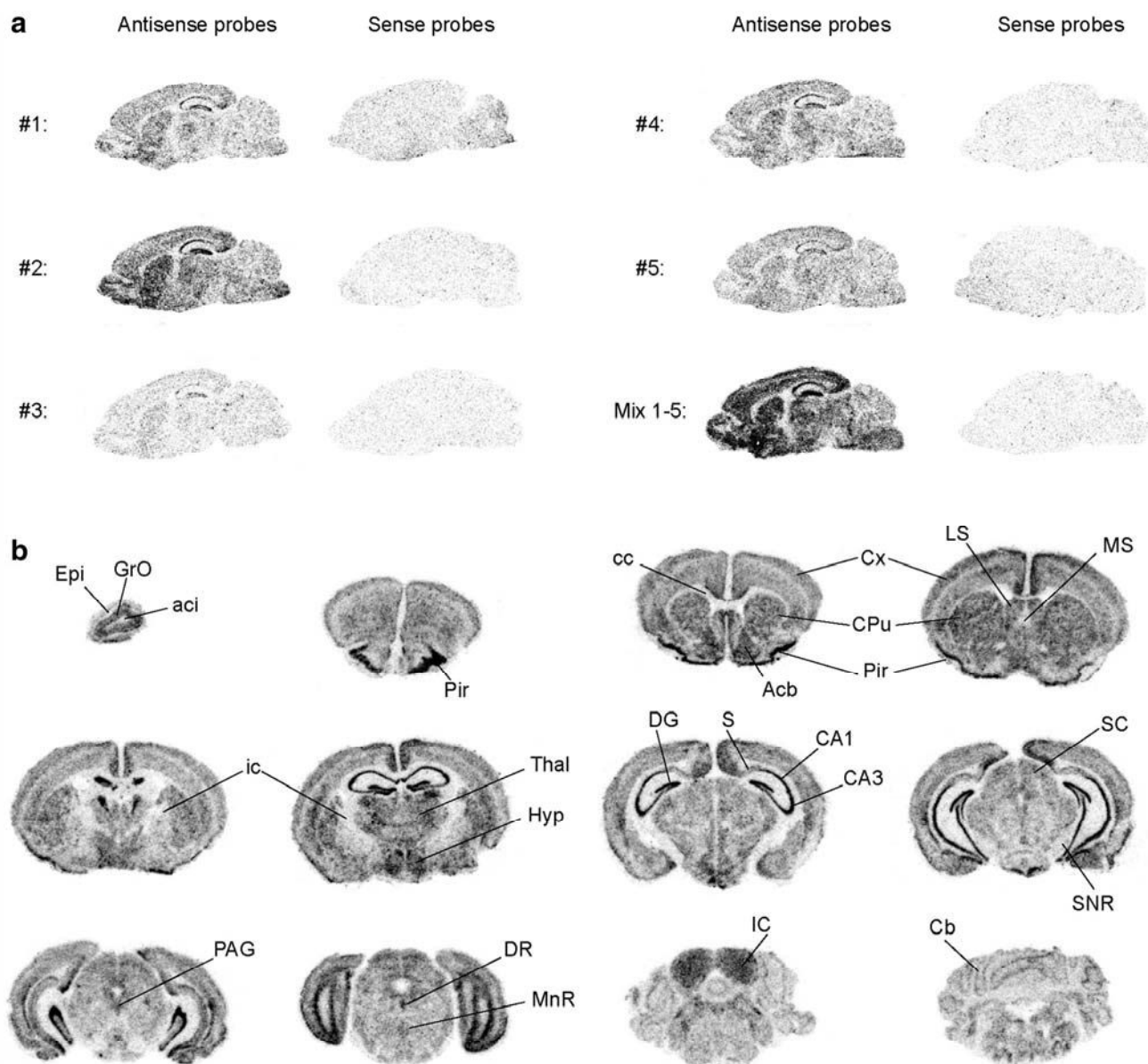


Fig. 2 Regional distribution of the GluD1 transcript. **a** Autoradiograms obtained by in situ hybridization performed with [S^{35}]labeled antisense oligonucleotides specific of GluD1 nucleic sequence on sagittal sections of adult mouse brain. #1 to #5 hybridization with individual probes, mix 1–5 hybridization with an equimolar mix of the five probes. Note the low signal obtained with corresponding sense oligonucleotides. **b** Autoradiograms obtained with the mix of the five antisense probes on coronal sections of adult mouse brain. Labeling of the gray matter is visible throughout the antero-posterior and dorso-ventral axes of brain sections, with overall stronger signal in the forebrain and comparatively weaker signal in the cerebellum, consistent with a widespread neuronal expression of the GluD1 mRNA in the brain. In contrast, a low signal is detected in white

matter areas such as the corpus callosum (cc) and internal capsule (ic). Marked regional differences are also observed with intense labeling in some structures, e.g. piriform cortex (Pir) and hippocampus, and faint labeling in others such as the substantia nigra pars reticulata (SNR). *Acb* nucleus accumbens, *Cb* cerebellum, *cc* corpus callosum, *CPu* caudate putamen, *Cx* cortex, *DR* dorsal raphe; hippocampal formation (*S* subiculum, *CA1-3* hippocampal fields, *DG* dentate gyrus), *Hyp* hypothalamus, *ic* internal capsule, *IC* inferior colliculus, *LS* lateral septum, *MnR* median raphe nucleus, *MS* medial septum; olfactory bulb (*Acl* anterior commissure, *Epl* external plexiform layer), *PAG* periaqueductal gray, *Pir* piriform cortex, *SC* superior colliculus, *SNR* substantia nigra pars reticulata, *Thal* thalamus

hippocampal formation (Fig. 2b). In the hippocampal formation, the GluD1 transcript was primarily detected in principal neurons (pyramidal and granular cells). The entire cortex abundantly expressed the GluD1 transcript with the

exception of layer IV. Labeling was particularly intense in the retrosplenial cortex. Other areas where GluD1 was highly expressed notably include some thalamic and hypothalamic nuclei, periaqueductal gray, dorsal raphe, and

inferior colliculi. Conversely, GluD1 appeared less expressed in few regions, such as the pars reticulata of the substantia nigra and the cerebellum. The low signal in white matter areas (such as the corpus callosum and internal capsule) suggests that the GluD1 mRNA is scarce or absent in glial cells. These results indicate that the GluD1 mRNA is widely expressed in neurons of the adult brain.

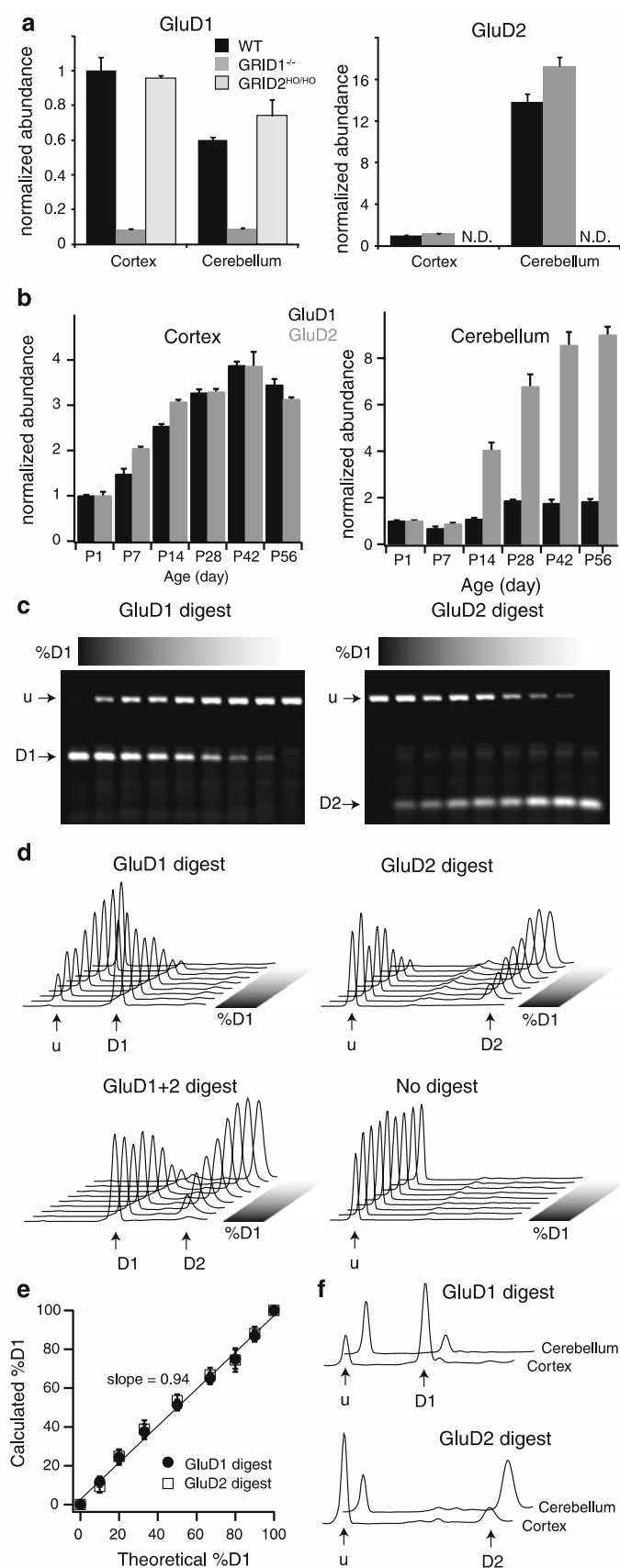
GluD1 and GluD2 mRNA are co-expressed in the cortex, hippocampus and cerebellum and increase postnatally

We next characterized the expression of GluD1 and GluD2 mRNAs in mouse neocortex and cerebellum using quantitative RT-PCR. The abundance of these mRNAs was normalized to those of a set of mRNA species showing little variation across brain structures and postnatal ages (see methods). The expression level of the GluD1 mRNA in adult mice was 1.66 ± 0.13 fold higher in the neocortex than in the cerebellum ($p < 0.05$, Fig. 3a). This moderate difference between the two structures is consistent with the above in situ hybridization results. The same experiments performed on $GRID1^{-/-}$ mice yielded only minimal signal, attesting to the specificity of GluD1 mRNA detection. This residual signal can be attributed to the production of truncated GluD1 mRNAs in the KO mice, in which only exons 11 and 12 of the $GRID1$ gene are deleted (Gao et al. 2007). The expression level of the GluD2 mRNA in adult mice was 13.8 ± 0.8 fold higher in the cerebellum than in the neocortex ($p < 0.05$, Fig. 3a), consistent with its high abundance in cerebellar Purkinje cells (Araki et al. 1993; Lomeli et al. 1993). No GluD2 mRNA was detected in neocortex or cerebellum of mutant mice carrying a homozygous deletion of the $GRID2$ gene encompassing the PCR amplicon [Hotfoot-Nancy strain, $GRID2^{HO/HO}$; (Lalouette et al. 2001)], confirming expression of GluD2 in the neocortex of WT mice. Hence, GluD1 and GluD2 mRNAs are both expressed in the neocortex and cerebellum of adult mice. GluD1 mRNA levels moderately differ between these two structures, whereas GluD2 mRNA level is markedly higher in the cerebellum than in the neocortex. Postnatal variations of GluD1 and GluD2 mRNA expression were also examined (Fig. 3b). The expression levels of GluD1 and GluD2 mRNAs in the neocortex smoothly increased by a factor of ~ 4 between P1 and P42 and non-significantly decreased between P42 and P56. In the cerebellum, GluD1 mRNA expression was stable before P14 and reached a plateau after a twofold increase between P14 and P28. In contrast, the GluD2 mRNA continuously increased after P7 to reach ~ 9 fold its P1 level at P56. Hence, GluD1 and GluD2 mRNAs are both up-regulated during the postnatal development of the neocortex and the cerebellum.

The relative proportions of GluD1 and GluD2 mRNAs in the neocortex and the cerebellum were quantified using co-amplification of their cDNAs with common primers, followed by subunit-specific restriction digest of the PCR products (see methods). The ability of the PCR to maintain original proportions of GluD1 and GluD2 cDNAs was first assessed by mixing known amounts of two plasmids containing their entire coding sequence (Fig. 3c, d). Using either GluD1-specific or GluD2-specific digest, we obtained a linear relationship between the ratio of input GluD1 and GluD2 plasmids and the ratio measured on PCR products using this approach (GluD1-specific, slope = 0.94 ± 0.06 , $r^2 = 0.995$; GluD2-specific, slope = 0.95 ± 0.08 , $r^2 = 0.992$; Fig. 3e). The same protocol was then applied to cDNAs obtained from neocortex and cerebellum of adult mice (Fig. 3f). Using GluD1-specific digest, we found that the GluD1 transcript represented $80.7 \pm 1.5\%$ of GluD transcripts in the neocortex (ratio GluD1/GluD2 = 4.3 ± 0.4). In contrast, in the cerebellum, GluD2 was the most abundant subunit (ratio GluD1/GluD2 = 0.32 ± 0.01) and represented $75.8 \pm 0.3\%$ of GluD mRNAs. The same analyses performed with GluD2-specific digest yielded similar results (neocortex and cerebellum, ratio GluD1/GluD2 = 4.62 ± 0.32 and 0.37 ± 0.01 respectively). These results indicate that GluD1 and GluD2 mRNAs are co-expressed at a high GluD1/GluD2 ratio in the neocortex and a low GluD1/GluD2 ratio in the cerebellum.

Co-expression of GluD1 and GluD2 mRNAs was next tested at the single cell level using single cell RT-PCR (scRT-PCR) of neocortical neurons from acute brain slices (see "Materials and methods"). Excitatory pyramidal neurons and inhibitory interneurons were visually selected and electrophysiologically characterized based on their action potential firing patterns (Cauli et al. 1997; Connors and Gutnick 1990). Subsequent scRT-PCR analyses revealed typical expression of vesicular glutamate transporter VGLUT1 in pyramidal neurons and of glutamic acid decarboxylase GAD 65 and/or GAD 67 isoforms in interneurons (Fig. 4a). Delta subunit mRNA expression was detected in all cells tested. GluD1 was expressed in all pyramidal neurons tested ($n = 13$), and additional expression of GluD2 was detected in 4 of these neurons (Fig. 4a). The GluD1 mRNA was also found in a majority of interneurons tested ($n = 11$ out of 13), with additional occurrence of the GluD2 mRNA in 3 of these neurons. Only GluD2 was detected in the two remaining interneurons (Fig. 4a). We also analyzed the expression of GluD subunit mRNAs in single hippocampal neurons because GluD1 protein distribution in this structure was examined in detail during the course of this study (see Figs. 5, 8 below). This was performed on CA1 pyramidal cells ($n = 10$) and interneurons ($n = 10$) from stratum radiatum and stratum

Fig. 3 GluD1 and GluD2 mRNA expression in cortex and cerebellum. **a** Abundance of GluD1 and GluD2 normalized to two reference genes as determined by quantitative RT-PCR and standardized to their cortical levels. *N.D.* not detected. Note the low or absence of signal in mice lacking a given GluD subunit and the minimal change of expression level of the remaining subunit. **b** Abundance of GluD1 and GluD2 normalized to four reference genes analyzed by quantitative RT-PCR during postnatal development and standardized to their P1 levels. **c–e.** Calibration of the relative quantification of GluD1 and GluD2 mRNAs by cDNA co-amplification. **c** Fluorescence images of PCR fragments amplified from a mix of GluD1- and GluD2-encoding plasmids using a Cy5.5-labeled primer and migrated on agarose gel after subunit specific restriction digest (*u* uncut). **d** Fluorescence profiles of agarose gels (*upper panels* same gels as in **c**). No undigested PCR product is observed upon GluD1+GluD2 digest. **e** Ratios obtained using either GluD1 or GluD2 digest from variable proportion of GluD1- and GluD2-encoding plasmids. Note that the slope of the regression line derived from GluD1 digest is close to 1, indicating that GluD1 and GluD2 are amplified with similar efficiency. **f** Relative abundance of GluD1 and GluD2 transcripts determined from mouse brain extracts by cDNA co-amplification as in **c–d**. Both GluD1- and GluD2-specific digest indicate that GluD1 is the most abundant GluD subunit in the cortex while GluD2 is the predominant subunit in the cerebellum



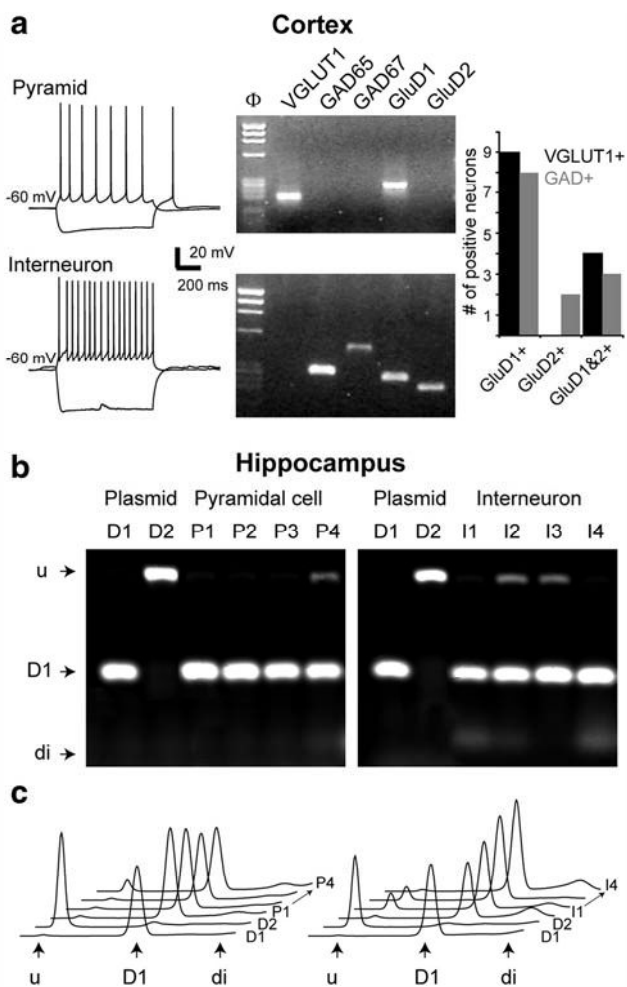


Fig. 4 Expression of GluD1 and GluD2 transcripts in single cortical and hippocampal neurons. **a** Expression of GluD subunit mRNAs and neuron-type markers in cortical neurons. *Left panels* show typical responses of a pyramidal cell and an interneuron to depolarizing and hyperpolarizing current pulses in neocortical slices. *Middle panels* agarose gels of single cell RT-PCR products obtained from the same neurons as in *left panels*. *Right panel* summary of GluD1 and GluD2 expression in excitatory pyramidal cells (VGLUT1+, $n = 13$) and inhibitory interneurons (GAD+, $n = 13$). **b, c** Relative abundance of GluD subunit mRNAs determined by co-amplification of GluD1 and GluD2 cDNAs obtained from single hippocampal neurons. **b** Fluorescence images of PCR fragments amplified from GluD1- and GluD2-encoding plasmids (D1, D2) and from cDNAs obtained from single pyramidal cells (P1-4) and interneurons (I1-4). PCR was performed using a Cy5.5-labeled primer and products were migrated on agarose gel after GluD1-specific restriction digest by Bfa I (*u* uncut, *di* primer dimer). **c** Fluorescence profiles of agarose gels shown in **b** reveal expression of both GluD1 (cut) and GluD2 (uncut) in individual cells and the predominance of the GluD1 transcript

lacunosum molecular using co-amplification of GluD1 and GluD2 cDNAs obtained from single neurons harvested in hippocampal slices (see above and “Materials and methods”). GluD1 and GluD2 mRNAs were both detected in all tested cells. However, GluD1 was the most abundant subunit and represented $97.5 \pm 0.9 \%$ and $92.1 \pm 3.0 \%$

of GluD cDNAs obtained from single pyramidal cells and interneurons, respectively (Fig. 4b, c). These results indicate that GluD1 and GluD2 mRNA are widely expressed in neuronal types of the neocortex and hippocampus, and that their occurrences and proportions in single cells reflect the dominance of GluD1 observed in our analyses of cortical tissue samples (see above).

GluD1 and GluD2 proteins are widely expressed in the adult brain and increase postnatally

In order to study the expression of the GluD1 protein, we raised a polyclonal anti-GluD1 antibody against part of its C-terminal intracellular domain that shows low homology with GluD2 (see “Materials and methods”). This antibody was tested on western blots of protein extracts from HEK cells mock-transfected or transfected with plasmids encoding GluD1, GluD2 or the NMDA receptor subunit GluN1 (Fig. 5a). A single band of molecular weight of ~ 100 kD was immunolabeled in the GluD1-containing lane whereas other lanes were negative, consistent with specific detection of the 1,009 amino acids GluD1 protein. Conversely, the same experiment performed with a GluD2-specific antibody raised against the corresponding region of the GluD2 protein (Takayama et al. 1995) resulted in labeling of a single band of molecular weight ~ 100 kD in the GluD2-containing lane (Fig. 5a). Anti-GluD1 immunocytochemistry of HEK cells expressing GluD1 resulted in labeling localized primarily at the plasma membrane, whereas no labeling was observed in mock-transfected or GluD2-expressing HEK cells (Fig. 5c). Finally, the anti-GluD1 antibody labeled a main band of ~ 100 kD on western blots of mouse neocortical and cerebellar protein extracts (Fig. 5b). This band was not observed in extracts from $GRID1^{-/-}$ mice but was present in extracts from $GRID2^{HO/HO}$ mice. The same experiments performed with the anti-GluD2 antibody labeled a ~ 100 kD band, which was not detected in $GRID2^{HO/HO}$ but persisted in $GRID1^{-/-}$ mice extracts (Fig. 5b). These results indicate that the present anti-GluD1 antibody enables specific and sensitive detection of the GluD1 protein, and confirm the reported specificity of the anti-GluD2 antibody (Takayama et al. 1995).

We probed the expression of GluD1 and GluD2 proteins in various brain structures and peripheral organs of adult mice using similar western blot analyses (Fig. 5d). None of these proteins were detected in any of the seven peripheral organs examined. Expression of GluD proteins was normalized to that of the housekeeping enzyme glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). The GluD1 protein was detected in all brain structures tested and was ~ 1.5 – 2 fold higher in cortex, hippocampus and striatum than in olfactory bulb, thalamus, mesencephalon and cerebellum (Fig. 5d), in good agreement with above *in situ* hybridization

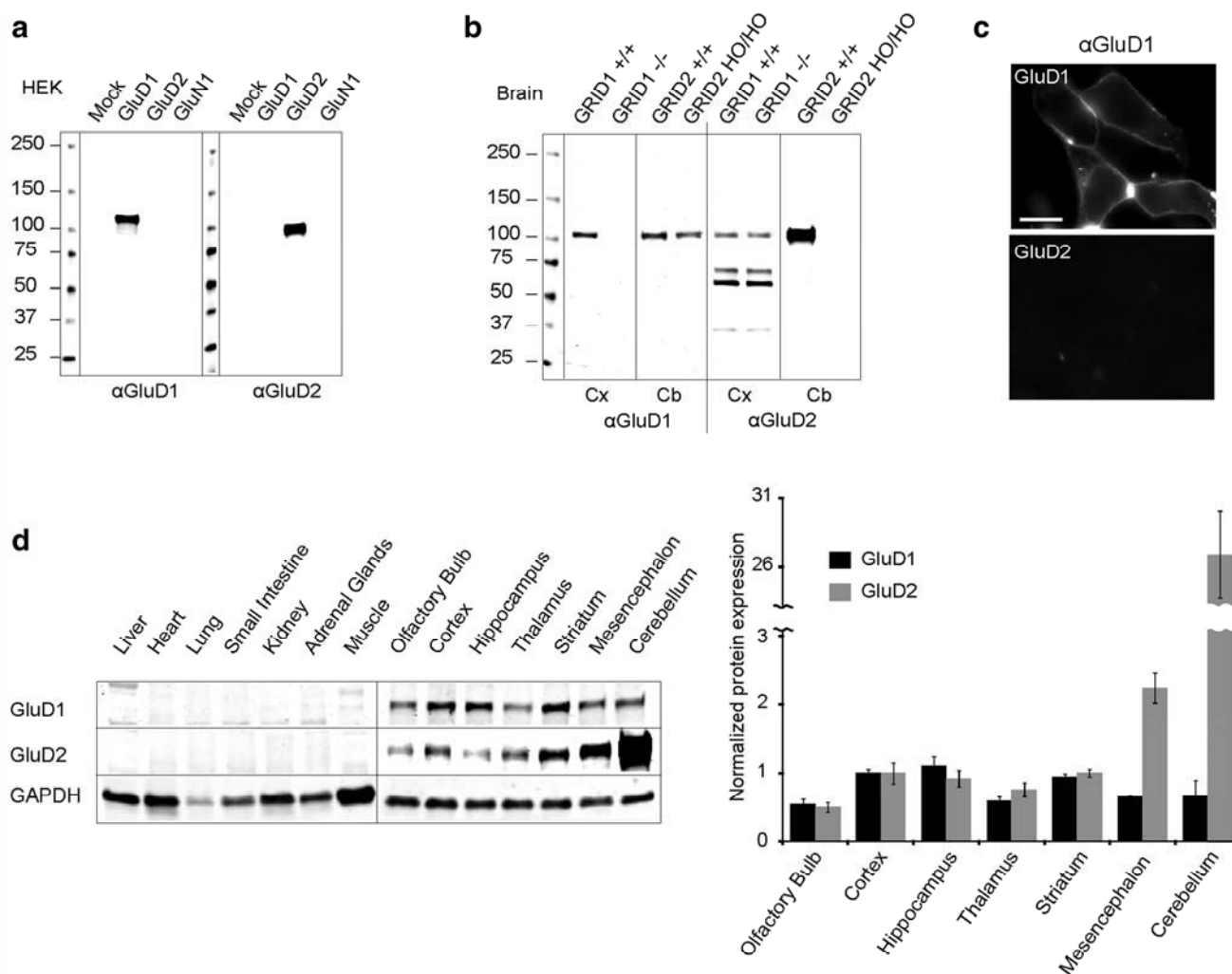


Fig. 5 Expression of GluD1 and GluD2 proteins **a, b** Western blot analysis of GluD1 and GluD2 in HEK cells expressing indicated glutamate receptor subunits and in mouse brain extracts. α GluD: antibody against GluD subunit. Note the absence of signal in controls lacking a given GluD subunit. **c** Fluorescence image of HEK expressing GluD subunits following immunocytochemistry using anti-GluD1 antibody. Labeling localized primarily at the plasma membrane in GluD1-expressing cells, whereas no labeling was

observed in GluD2-expressing cells. **d** Western blot analysis of GluD expression in peripheral organs and brain structures. GluD1 and GluD2 staining intensity was normalized to that of GAPDH. Histogram shows the abundance of GluD1 and GluD2 in diverse brain structures as compared to their cortical levels. Protein amounts loaded per lane: 15 μ g for non-nervous tissues and 5 μ g for brain and HEK cells lysates

and quantitative RT-PCR results. GluD2 protein expression was also detected in all brain regions examined, but with more contrasted inter-structure differences than GluD1 (Fig. 5d). Indeed, GluD2 level exhibited moderate differences among forebrain regions, but was higher in the mesencephalon and reached 27 ± 4 fold its cortical level in the cerebellum, consistent with quantitative RT-PCR data. These results indicate that both GluD1 and GluD2 proteins are widely expressed in the adult mouse brain. They further indicate that the abundance of GluD1 across the brain is less variable than that of GluD2, which is markedly enriched in the cerebellum, presumably because of its high abundance in Purkinje cells (Araki et al. 1993; Lomeli et al. 1993).

We also examined the expression of GluD proteins normalized to actin levels during postnatal development of the cortex and the cerebellum (Fig. 6a, b). Cortical expression of GluD1 and GluD2 increased ~ 4.5 fold (GluD1) or ~ 6.5 fold (GluD2) between P0 and P28. Between P28 and P56, GluD1 decreased down to ~ 3 fold its P0 level, whereas GluD2 level remained roughly stable. In the cerebellum, GluD1 abundance continuously increased to reach ~ 3.5 fold its P0 level at P42 and then slightly decreased at P56. GluD2 level was almost undetectable at P0, then increased ~ 4 fold between P15 and P42 and remained stable at P56. These results show overall consistency with those obtained above on GluD mRNAs

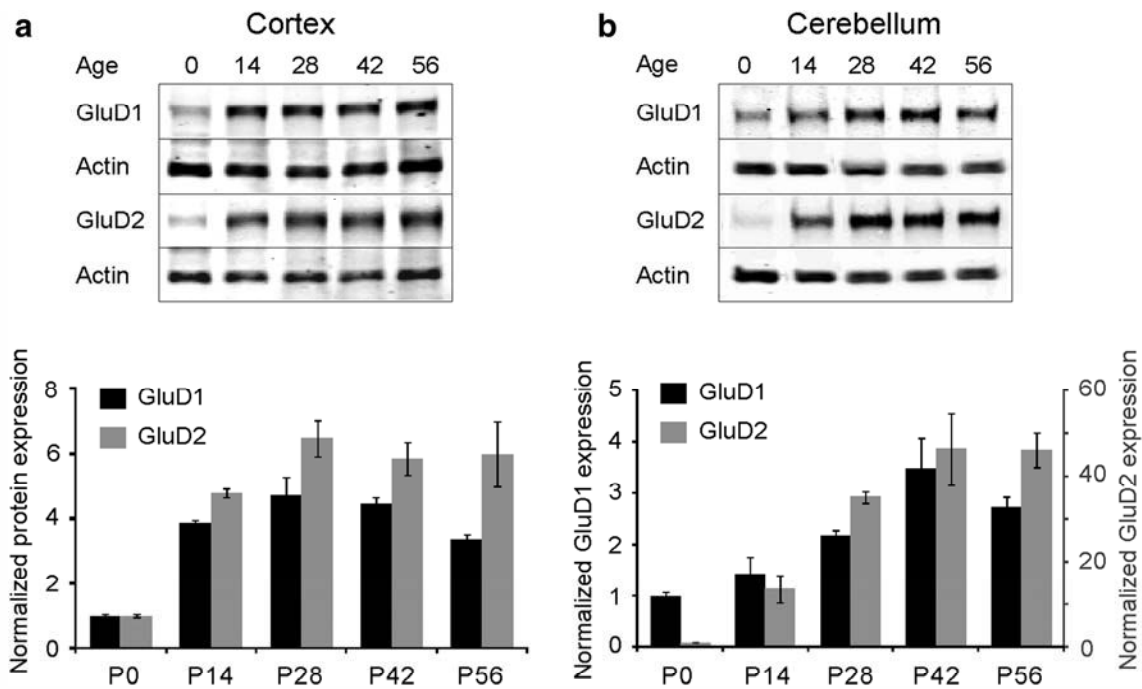


Fig. 6 Upregulation of GluD1 and GluD2 proteins during postnatal development. *Upper panels* Western blot analysis of GluD cortical and cerebellar expression at indicated postnatal days. GluD1 and GluD2 staining intensity was normalized to that of β -actin. *Lower*

panels histograms show the abundance of GluD1 and GluD2 during postnatal development as compared to P0 levels. Note the distinct y-axis used for GluD2 in cerebellum

and confirm, at the protein level, that GluD1 and GluD2 are both up-regulated during postnatal development of the neocortex and the cerebellum.

Expression and localization patterns of the GluD1 protein in the adult brain

We used the histoblot technique to determine the regional distribution and expression levels of GluD1 in the young adult mouse brain. This method is a reliable and convenient way to compare the regional distribution of different proteins in brain samples without compromising the integrity of antibody-binding sites by tissue fixation, which is required for conventional immunohistochemistry (Tonnes et al. 1999). Proteins transferred to nitrocellulose membranes were immunostained with purified GluD1-specific antibodies using conventional immunoblotting. The overall expression pattern of GluD1 showed a strong immunoreactivity in the hippocampus, caudate putamen and neocortex (Fig. 7a). Moderate immunoreactivity was detected in the granule cell layer of the cerebellum and in the deep cerebellar nuclei, and weak in the thalamus, in midbrain nuclei, including the inferior and superior colliculus, and brainstem nuclei (Fig. 7a). No labeling was observed in white matter areas like the corpus callosum. These results indicate that the GluD1 protein is widely expressed in neurons of the

adult brain, as observed at the mRNA level using in situ hybridization.

To study in more detail the distribution patterns of GluD1, we carried out immunohistochemical studies at the light microscopic level, focusing on the forebrain. Similarly to histoblots, immunoreactivity for GluD1 was strong in the hippocampus, caudate putamen and neocortex (Fig. 7b). Moderate immunoreactivity was observed in the basolateral amygdaloid nucleus, in some thalamic nuclei and in the lateral habenula (Fig. 7b). In the hippocampus, GluD1 was highest in the stratum lacunosum-moleculare of the CA1 and CA3 regions, and in the molecular layer of the dentate gyrus, and lower in the strata oriens and radiatum, with no immunoreactivity detected in the stratum pyramidale (Fig. 7b). To validate the specificity of the immunoreactions, $GRID1^{-/-}$ mice were used. The complete lack of labeling in $GRID1^{-/-}$ mice (Fig. 7c) demonstrates that immunolabeling at the light microscopic level is due to specific antibody-antigen interactions.

We next used electron microscopy to study the subcellular distribution of GluD1 in the different subfields of the CA1 region of the hippocampus. Using the pre-embedding immunogold method, labeling for GluD1 in the strata oriens, radiatum and lacunosum-moleculare was found primarily along the plasma membrane, but also associated with the endoplasmic reticulum (ER) cisterna of dendritic shafts and spine apparatus (Fig. 8a–f). To a lesser extent,

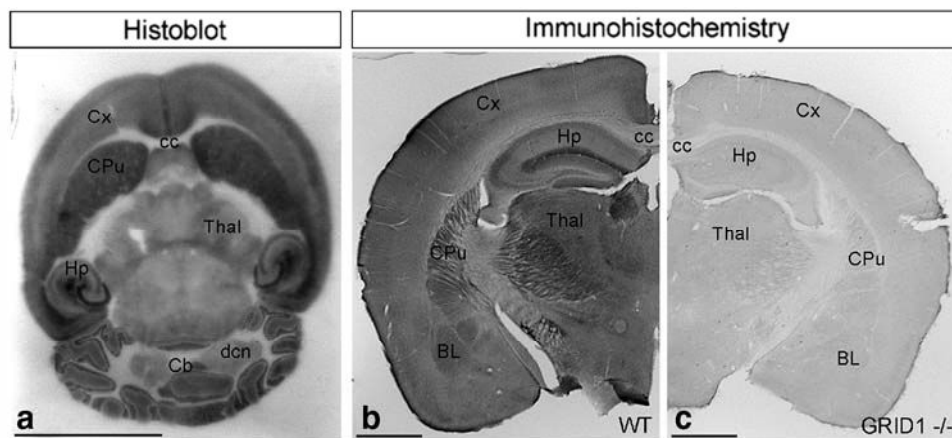


Fig. 7 Distribution of GluD1 protein in the adult mouse brain. **a** GluD1 protein regional distribution was visualized on histoblots of brain horizontal sections of adult mice using an affinity-purified anti-GluD1 antibody. The receptor subunit exhibited a broad distribution in the brain. In particular, strong immunoreactivity for GluD1 was detected in the hippocampus (Hp), caudate putamen (CPu), cerebellum (Cb) and cortex (Cx), with the lowest intensity in the thalamus (Thal) and deep cerebellar nuclei (dcn), and no labeling in areas like the corpus callosum (cc). **b, c** Immunoreactivity for GluD1 in the

forebrain using a pre-embedding immunoperoxidase method at the light microscopic level. In the hippocampus, GluD1 immunoreactivity was low in the strata oriens and radiatum of the CA1 and CA3 regions. Immunoreactivity was highest in the stratum lacunosum-moleculare of the CA1 and CA3 regions, and in the molecular layer of the dentate gyrus. In the $GRID1^{-/-}$ mice, the pattern of immunoreactivity detected in the WT was missing. *BL* basolateral amygdala. Scale bar **a** 0.5 cm, **b, c** 0.2 cm

immunoparticles for GluD1 were also detected at presynaptic sites, along the plasma membrane of axon terminals establishing excitatory synapses with spines of CA1 pyramidal cells. Quantitative analysis of immunogold particles confirmed that most immunoparticles were found at postsynaptic sites (96.3 %, $n = 1,345$) and only few (3.7 %, $n = 52$) at presynaptic sites. Of the immunoparticles located at postsynaptic sites, 70.8 % ($n = 942$) were found in the plasma membrane of dendritic spines and shafts, and 29.2 % ($n = 393$) at cytoplasmic site associated in intracellular membranes. Finally, to determine if GluD1 is also located at postsynaptic membrane specialization we used post-embedding immunogold techniques in the stratum lacunosum-moleculare, a region consisting primarily of tuft dendrites from CA1 neurons and exhibiting prominent labeling for GluD1 (Fig. 8g, h). Using this approach, we found that immunoparticles for GluD1 were mainly localized along the postsynaptic density of excitatory synapses in dendritic spines (Fig. 8g, h). Although single cell RT-PCR analyses revealed expression of GluD1 in both CA1 pyramidal cells and interneurons, spines observed in this study are far more likely to be those of pyramidal cells (densely spiny) than those of interneurons (less numerous and sparsely spiny) (Freund and Buzsaki 1996).

Discussion

We probed the expression of GluD1 and GluD2 in the adult rodent brain using a combination of mRNA and

protein detection techniques. GluD1 was expressed in neurons throughout the brain, with higher levels in the forebrain and lower levels in the cerebellum. GluD1 was localized at the postsynaptic density of excitatory synapses on hippocampal pyramidal cells. GluD2 expression was also widespread but was markedly enriched in the cerebellum. Likewise, the GluD1/GluD2 mRNA ratio was high in the cortex and low in the cerebellum. Co-expression of GluD1 and GluD2 mRNAs was assessed in single cortical and hippocampal neurons. The expression of both subunits increased during postnatal development. Our results suggest that GluD1 and GluD2 contribute to the function of neuronal networks throughout the adult brain.

GluD1 is widely expressed in neurons of the adult brain

Our results show that GluD1 is expressed in most regions of the adult brain. The converging dataset we obtained using multiple probes of GluD1 mRNA and protein, and control experiments performed using inactive probes or $GRID1^{-/-}$ mice leave little doubt on the validity of the present conclusion. Although GluD1 expression was not uniform across the brain, we observed only moderate variations of its regional abundance with maximal differences of ~ 2 fold between the structures examined. A good overall correspondence was observed between GluD1 mRNA and protein levels. It is noteworthy that expression of the GluD1 mRNA was sufficiently high to be consistently detected in individual cortical and hippocampal

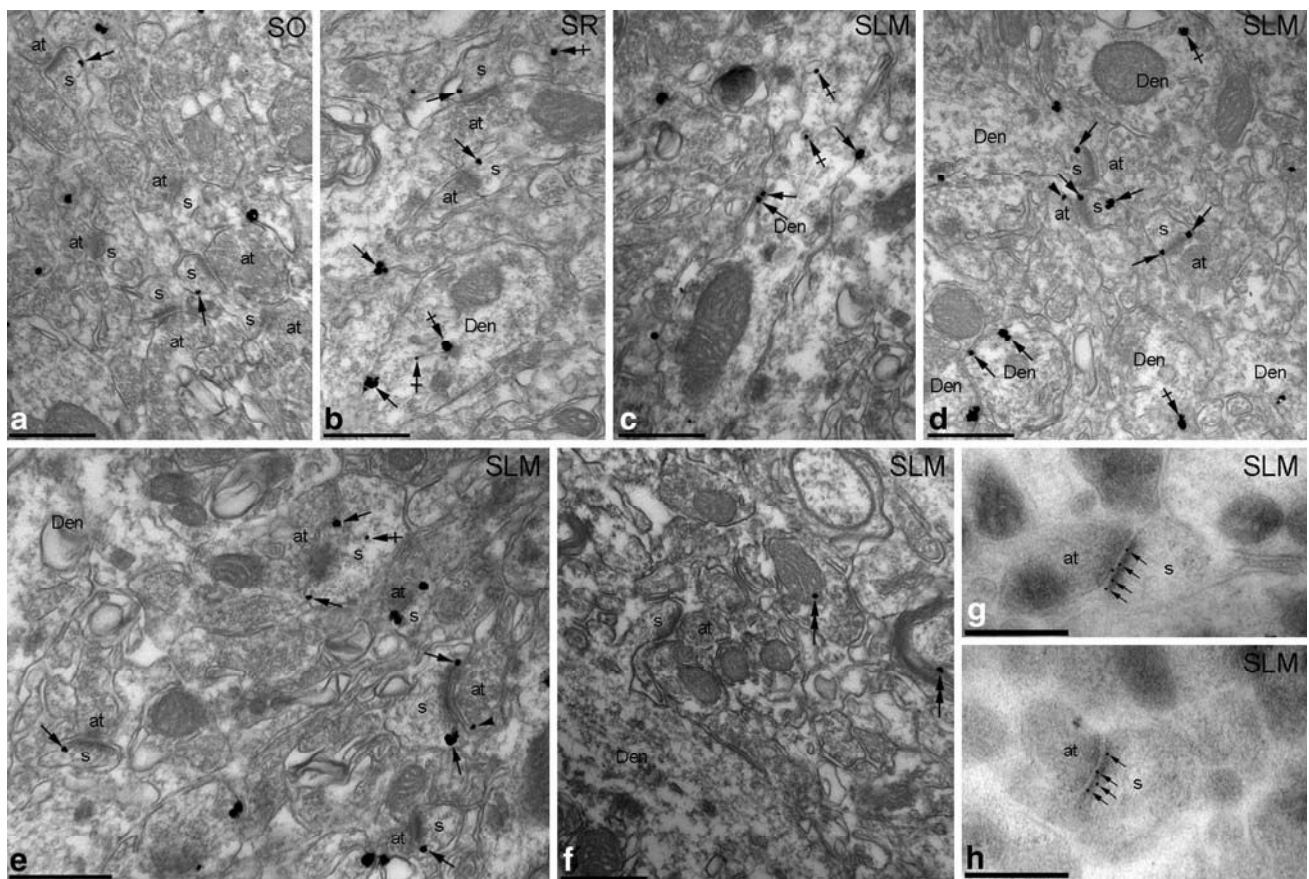


Fig. 8 Subcellular localization of GluD1. Electron micrographs of the hippocampus showing immunoparticles for GluD1 in different subfields of CA1 region, as detected using immunogold methods in the adult mice. **a, b** Using the pre-embedding immunogold method, only few immunoparticles for GluD1 were detected along the extrasynaptic plasma membrane (*arrows*) of some dendritic spines (*s*) of CA1 pyramidal cells establishing asymmetrical synapses with axon terminal (*at*) in the strata oriens (**a**) and radiatum (**b**). Few GluD1 immunoparticles were observed associated with intracellular membranes (*crossed arrows*) of the dendritic shafts (*Den*). **c–e** The stratum lacunosum-moleculare showed the highest density of immunoparticles for GluD1, mainly detected along the extrasynaptic

plasma membrane (*arrows*) of some dendritic spines (*s*) and dendritic shafts (*Den*) of pyramidal cells, as well as at intracellular sites (*crossed arrows*). To a lesser extent, GluD1 immunoparticles were observed at presynaptic sites along the extrasynaptic plasma membrane of axon terminals (*at*) establishing excitatory synapses with dendritic spines (*s*). **f** Specificity of the antibody was tested in *GRID1*^{-/-} mice. Very few immunoparticles for GluD1 were observed associated with mitochondria and/or myelinated axons (*double arrows*). **g–h** Using the post-embedding immunogold method, GluD1 immunoparticles were detected along the postsynaptic density of dendritic spines (*s*) of CA1 pyramidal cells establishing asymmetrical synapses with axon terminal (*at*). Scale bars **a–h** 0.5 μ m

neurons using single cell RT-PCR, unlike low abundance mRNAs encoding neuropeptide receptors (Ferezou et al. 2007; Gallopin et al. 2006). GluD1 expression was primarily neuronal, as judged from low in situ hybridization and immunochemical signals in the white matter and from the absence of protein detection in other organs examined. The strong labeling of essentially glutamatergic (e.g. hippocampal pyramidal cell layer) or GABAergic (e.g. striatum) brain regions indicates that GluD1 expression is not restricted to either excitatory or inhibitory neurons, as assessed by single cell RT-PCR experiments on cortical neurons. Furthermore, the intense labeling observed in the dorsal raphe and some hypothalamic nuclei raises the

possibility that GluD1 is expressed also in aminergic and peptidergic neurons. Closer examination in the hippocampus revealed that GluD1 was mainly localized at the plasma membrane along the postsynaptic density of excitatory synapses in dendritic spines of pyramidal cells. This localization is similar to that reported for GluD2 at the parallel fiber-to-Purkinje cell synapse (Landsend et al. 1997). These results suggest that GluD1 plays a role at glutamatergic synapses throughout the brain, possibly in synapse organization and/or in mediating excitatory currents as reported for GluD2 (Ady et al. 2014; Kakegawa et al. 2008; Kato et al. 2012; Matsuda et al. 2010; Uemura et al. 2010).

GluD1 and GluD2 are widely co-expressed in the adult brain

We also found expression of GluD2 mRNA and protein in all adult brain regions examined, as assessed by control experiments on GRID2^{HO/HO} mice. However, GluD2 expression levels were more contrasted than those of GluD1. Indeed, GluD2 was markedly more abundant in the cerebellum than in the forebrain, consistent with its high enrichment in Purkinje cells (Araki et al. 1993; Yamasaki et al. 2011). Interestingly, this distribution is reminiscent of that of mGlu1, which forms a complex with GluD2 (Kato et al. 2012) and triggers GluD2-mediated currents (Ady et al. 2014; Kato et al. 2012), and exhibits similarly widespread expression with high enrichment in Purkinje cells (Shigemoto et al. 1992). Expression of the GluD2 mRNA outside the cerebellum was nonetheless sufficiently high to be detected in individual neurons using single cell RT-PCR, as reported for mGlu1 (Cauli et al. 2000).

These results show that GluD1 and GluD2 are widely co-expressed in the brain. Quantification of the relative proportions of their mRNAs indicates that GluD1 is more abundant than GluD2 in the cortex, whereas GluD2 predominates in the cerebellum. Regional western blots further suggest that GluD1 is also dominant in other forebrain regions tested, in which GluD1 and GluD2 levels are similar to those measured in the cortex. Conversely, abundance of the two proteins may be more even in the mesencephalon where GluD1 level is lower, and GluD2 level higher, than in the cortex. Interestingly, The anti-GluD1/2 antibody used by Mayat et al. (1995) produces intense labeling in the dorsal cochlear nucleus at a level similar to that observed in the cerebellum. GluD1–2 levels and GluD1/GluD2 ratio in the dorsal cochlear nucleus were not examined in the present study. Nonetheless, the cerebellum-like properties of this brainstem nucleus (Bell et al. 2008) suggest that a high GluD2 level may account for its strong immunolabeling described by Mayat et al. (1995). This suggests in turn that GluD2 may predominate over GluD1 in discrete brain regions or neuron types outside the cerebellum.

It is noteworthy that regional co-expression does not imply cellular co-expression. Although we detected GluD1 and GluD2 co-expression in our sample of individual cortical and hippocampal neurons, they rather appear segregated to different neuronal types in the cerebellum. Indeed, we found that GluD1 is present in granule cells, which are reportedly devoid of GluD2 (Araki et al. 1993; Yamasaki et al. 2011). Conversely, we observed no conspicuous expression of GluD1 in Purkinje cells, which abundantly express GluD2 (Araki et al. 1993).

GluD1 and GluD2 are upregulated during postnatal development

We found that the expression of GluD1 and GluD2 largely increase during the postnatal development of the cortex and the cerebellum. This finding is at odds with the rapid decrease of GluD1 expression after birth reported from *in situ* hybridization experiments (Lomeli et al. 1993). This discrepancy can be explained by the difficulty to normalize *in situ* hybridization signals due to lack of internal control. In contrast, the present results derive from careful normalization of mRNA and protein abundance to the expression of multiple reference genes, attesting to their validity. In the cortex, GluD1 and GluD2 increased synchronously after birth to reach adult levels at postnatal day 28. This time-window is posterior to the proliferation and migration of cortical neuron precursors (Bayer and Altman 1991) and corresponds to the main period of cortical synapse formation (Blue and Parnavelas 1983). In the cerebellum, GluD1 and GluD2 increased asynchronously, consistent with their main expression in granule and Purkinje cells, respectively. GluD1 increase occurred primarily after P14, at the onset of mossy fiber-granule cell synapse formation (Hamori and Somogyi 1983), whereas GluD2 already increased after P7 during the development of Purkinje cell dendrites and the formation of parallel fiber synapses onto these cells. The expression time-course of delta subunits and their sustained expression in the adult are consistent with a role in the maturation and adult function of neuronal networks rather than in their embryonic development, as reported for GluD2 (Ady et al. 2014; Kakegawa et al. 2008; Kashiwabuchi et al. 1995; Kato et al. 2012; Matsuda et al. 2010; Uemura et al. 2010) and as suggested by the present observation of GluD1 localization at postsynaptic densities.

GluD1 and GluD2 contribution to the function of neuronal networks

The present results and those of earlier studies indicate that the major role of GluD subunits pertains to the organization and/or function of excitatory synapses (Ady et al. 2014; Kakegawa et al. 2008; Kato et al. 2012; Matsuda et al. 2010; Uemura et al. 2010). Although widespread regional co-expression of GluD1 and GluD2 raises the possibility that they co-assemble as heteromers, data obtained so far suggest that co-assembly is not required for function. Indeed, GluD2 fulfills its functions at the parallel fiber-Purkinje cell synapse in the absence of GluD1 (Ady et al. 2014; Kakegawa et al. 2008; Matsuda et al. 2010; Uemura et al. 2010). Furthermore, the marked differences in relative abundance of the two subunits we observed at the

regional level indicate that GluDs occur mainly as homomers. This suggests in turn that GluD1 and GluD2 have distinct contributions to brain functions. Indeed, mice lacking GRID1 or GRID2 genes exhibited modest, non-significant, changes of the remaining GluD subunit expression, indicating that each subunit does not effectively compensate for the absence of the other. Nonetheless, GRID1^{-/-} and GRID2^{-/-} mice exhibit changes in the expression of other genes related to excitatory transmission [e.g. other iGluRs, (Yadav et al. 2011, 2013; Yamasaki et al. 2011)], which likely compensate for the absence of the cognate GluD subunit at glutamatergic synapses. Mice lacking functional GluD1 or GluD2 show different patterns of behavioral and neurochemical alterations. As expected, GRID2 deletions prominently affects the cerebellum (Guastavino et al. 1990; Kashiwabuchi et al. 1995; Lalouette et al. 2001; Yamasaki et al. 2011), but may result in more subtle alterations of other structures that express lower levels of GluD2. Conversely, GRID1^{-/-} mice exhibit multiple alterations of cognitive, emotional and social behaviors (Yadav et al. 2012, 2013), in agreement with the association of human GRID1 gene mutations with schizophrenia (Fallin et al. 2005; Gao et al. 2007; Guo et al. 2007; Treutlein et al. 2009). Likewise, neurochemical alterations have been assessed in several brain regions of these mice (Yadav et al. 2012, 2013), consistent with widespread GluD1 expression. Hence, our results provide molecular and anatomical bases for the involvement of GluD subunits in multiple brain functions.

Acknowledgments The authors thank Delphine Bouteiller, Thierry Galli, Yannick Marie and Agathe Verraes for their valuable help. We thank Jian Zuo and Carole Levenes for sharing GRID1 KO and GRID2 HO mouse line respectively. S.N. is a fellow of the Nakajima Foundation. This work was supported by grants from Agence Nationale de la Recherche (ANR# BLAN-SVSE4-LS-110624, “IHU Institut de Neurosciences Translationnelles de Paris”; “Investissements d’avenir” ANR-10-IAIHU-06), Fondation pour la Recherche sur le Cerveau/Rotary Club de France, and from the Spanish Ministry of Education and Science (BFU2012-38348 and CONSOLIDER CSD2008-00005) to R.L.

Conflict of interest The authors declare no competing financial interests.

References

- Ady V, Perroy J, Tricoire L, Piochon C, Dadak S, Chen X, Dusart I, Fagnh L, Lamboloz B, Levenes C (2014) Type 1 metabotropic glutamate receptors (mGlu1) trigger the gating of GluD2 delta glutamate receptors. *EMBO Rep* 15(1):103–109. doi:10.1002/embr.201337371
- Angulo MC, Lamboloz B, Audinat E, Hestrin S, Rossier J (1997) Subunit composition, kinetic, and permeation properties of AMPA receptors in single neocortical nonpyramidal cells. *J Neurosci* 17(17):6685–6696
- Araki K, Meguro H, Kushiya E, Takayama C, Inoue Y, Mishina M (1993) Selective expression of the glutamate receptor channel delta 2 subunit in cerebellar Purkinje cells. *Biochem Biophys Res Commun* 197(3):1267–1276. doi:10.1006/bbrc.1993.2614
- Bayer S, Altman J (1991) Neocortical development. Raven Press, New York
- Bell CC, Han V, Sawtell NB (2008) Cerebellum-like structures and their implications for cerebellar function. *Annu Rev Neurosci* 31:1–24. doi:10.1146/annurev.neuro.30.051606.094225
- Blue ME, Parnavelas JG (1983) The formation and maturation of synapses in the visual cortex of the rat. I. Qualitative analysis. *J Neurocytol* 12(4):599–616
- Cauli B, Audinat E, Lamboloz B, Angulo MC, Ropert N, Tsuzuki K, Hestrin S, Rossier J (1997) Molecular and physiological diversity of cortical nonpyramidal cells. *J Neurosci* 17(10):3894–3906
- Cauli B, Porter JT, Tsuzuki K, Lamboloz B, Rossier J, Quenet B, Audinat E (2000) Classification of fusiform neocortical interneurons based on unsupervised clustering. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(11):6144–6149 (97/11/6144)
- Connors BW, Gutnick MJ (1990) Intrinsic firing patterns of diverse neocortical neurons. *Trends Neurosci* 13(3):99–104 pii:0166-2236(90)90185-D
- Fallin MD, Lasseter VK, Avramopoulos D, Nicodemus KK, Wolyniec PS, McGrath JA, Steel G, Nestadt G, Liang KY, Haganir RL, Valle D, Pulver AE (2005) Bipolar I disorder and schizophrenia: a 440-single-nucleotide polymorphism screen of 64 candidate genes among Ashkenazi Jewish case-parent trios. *Am J Hum Genet* 77(6):918–936. doi:10.1086/497703
- Ferezou I, Hill EL, Cauli B, Gibelin N, Kaneko T, Rossier J, Lamboloz B (2007) Extensive overlap of mu-opioid and nicotinic sensitivity in cortical interneurons. *Cereb Cortex* 17(8):1948–1957. doi:10.1093/cercor/bhl104
- Freund TF, Buzsaki G (1996) Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6(4):347–470. doi:10.1002/(SICI)1098-1063(1996)
- Gallopin T, Geoffroy H, Rossier J, Lamboloz B (2006) Cortical sources of CRF, NKB, and CCK and their effects on pyramidal cells in the neocortex. *Cereb Cortex* 16(10):1440–1452. doi:10.1093/cercor/bhj081
- Gao J, Maison SF, Wu X, Hirose K, Jones SM, Bayazitov I, Tian Y, Mittleman G, Matthews DB, Zakharenko SS, Liberman MC, Zuo J (2007) Orphan glutamate receptor delta1 subunit required for high-frequency hearing. *Mol Cell Biol* 27(12):4500–4512. doi:10.1128/MCB.02051-06
- Gras C, Amilhon B, Lepicard EM, Poirel O, Vinatier J, Herbin M, Dumas S, Tzavara ET, Wade MR, Nomikos GG, Hanoun N, Saurini F, Kemel ML, Gasnier B, Giros B, El Mestikawy S (2008) The vesicular glutamate transporter VGLUT3 synergizes striatal acetylcholine tone. *Nat Neurosci* 11(3):292–300. doi:10.1038/nn2052
- Guastavino JM, Sotelo C, Damez-Kinselle I (1990) Hot-foot murine mutation: behavioral effects and neuroanatomical alterations. *Brain Res* 523(2):199–210 pii:0006-8993(90)91488-3
- Guo SZ, Huang K, Shi YY, Tang W, Zhou J, Feng GY, Zhu SM, Liu HJ, Chen Y, Sun XD, He L (2007) A case-control association study between the GRID1 gene and schizophrenia in the Chinese Northern Han population. *Schizophr Res* 93(1–3):385–390. doi:10.1016/j.schres.2007.03.007
- Hamori J, Somogyi J (1983) Differentiation of cerebellar mossy fiber synapses in the rat: a quantitative electron microscope study. *J Comp Neurol* 220(4):365–377. doi:10.1002/cne.902200402
- Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J (2007) qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol* 8(2):R19. doi:10.1186/gb-2007-8-2-r19

- Kakegawa W, Miyazaki T, Emi K, Matsuda K, Kohda K, Motohashi J, Mishina M, Kawahara S, Watanabe M, Yuzaki M (2008) Differential regulation of synaptic plasticity and cerebellar motor learning by the C-terminal PDZ-binding motif of GluRdelta2. *J Neurosci* 28(6):1460–1468. doi:10.1523/JNEUROSCI.2553-07.2008
- Karagiannis A, Gallopin T, David C, Battaglia D, Geoffroy H, Rossier J, Hillman EM, Staiger JF, Cauli B (2009) Classification of NPY-expressing neocortical interneurons. *J Neurosci* 29(11):3642–3659. doi:10.1523/JNEUROSCI.0058-09.2009
- Kashiwabuchi N, Ikeda K, Araki K, Hirano T, Shibuki K, Takayama C, Inoue Y, Kutsuwada T, Yagi T, Kang Y et al (1995) Impairment of motor coordination, Purkinje cell synapse formation, and cerebellar long-term depression in GluR delta 2 mutant mice. *Cell* 81(2):245–252 pii:0092-8674(95)90334-8
- Kato AS, Knierman MD, Siuda ER, Isaac JT, Nisenbaum ES, Bredt DS (2012) Glutamate receptor delta2 associates with metabotropic glutamate receptor 1 (mGluR1), protein kinase Cgamma, and canonical transient receptor potential 3 and regulates mGluR1-mediated synaptic transmission in cerebellar Purkinje neurons. *J Neurosci* 32(44):15296–15308. doi:10.1523/JNEUROSCI.0705-12.2012
- Kuroyanagi T, Yokoyama M, Hirano T (2009) Postsynaptic glutamate receptor delta family contributes to presynaptic terminal differentiation and establishment of synaptic transmission. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(12):4912–4916. doi:10.1073/pnas.0900892106
- Lalouette A, Lohof A, Sotelo C, Guenet J, Mariani J (2001) Neurobiological effects of a null mutation depend on genetic context: comparison between two hotfoot alleles of the delta-2 ionotropic glutamate receptor. *Neuroscience* 105(2):443–455. pii:S0306452201001932
- Lambolez B, Audinat E, Bochet P, Crepel F, Rossier J (1992) AMPA receptor subunits expressed by single Purkinje cells. *Neuron* 9(2):247–258. pii:0896-6273(92)90164-9
- Lambolez B, Ropert N, Perrais D, Rossier J, Hestrin S (1996) Correlation between kinetics and RNA splicing of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptors in neocortical neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(5):1797–1802
- Landsend AS, Amiry-Moghaddam M, Matsubara A, Bergersen L, Usami S, Wenthold RJ, Ottersen OP (1997) Differential localization of delta glutamate receptors in the rat cerebellum: coexpression with AMPA receptors in parallel fiber-spine synapses and absence from climbing fiber-spine synapses. *J Neurosci* 17(2):834–842
- Lomeli H, Sprengel R, Laurie DJ, Kohr G, Herb A, Seeburg PH, Wisden W (1993) The rat delta-1 and delta-2 subunits extend the excitatory amino acid receptor family. *FEBS Lett* 315(3):318–322. pii:0014-5793(93)81186-4
- Lujan R, Nusser Z, Roberts JD, Shigemoto R, Somogyi P (1996) Perisynaptic location of metabotropic glutamate receptors mGluR1 and mGluR5 on dendrites and dendritic spines in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 8(7):1488–1500
- Matsuda K, Miura E, Miyazaki T, Kakegawa W, Emi K, Narumi S, Fukazawa Y, Ito-Ishida A, Kondo T, Shigemoto R, Watanabe M, Yuzaki M (2010) Cbln1 is a ligand for an orphan glutamate receptor delta2, a bidirectional synapse organizer. *Science* 328(5976):363–368. doi:10.1126/science.1185152
- Mayat E, Petralia RS, Wang YX, Wenthold RJ (1995) Immunoprecipitation, immunoblotting, and immunocytochemistry studies suggest that glutamate receptor delta subunits form novel postsynaptic receptor complexes. *J Neurosci* 15(3 Pt 2):2533–2546
- Orth A, Tapken D, Hollmann M (2013) The delta subfamily of glutamate receptors: characterization of receptor chimeras and mutants. *Eur J Neurosci* 37(10):1620–1630. doi:10.1111/ejn.12193
- Pachot A, Blond JL, Mouglin B, Miossec P (2004) Peptidylpropyl isomerase B (PPIB): a suitable reference gene for mRNA quantification in peripheral whole blood. *J Biotechnol* 114(1–2):121–124. doi:10.1016/j.jbiotec.2004.07.001
- Ryu K, Yokoyama M, Yamashita M, Hirano T (2012) Induction of excitatory and inhibitory presynaptic differentiation by GluD1. *Biochem Biophys Res Commun* 417(1):157–161. doi:10.1016/j.bbrc.2011.11.075
- Schmid SM, Hollmann M (2008) To gate or not to gate: are the delta subunits in the glutamate receptor family functional ion channels? *Mol Neurobiol* 37(2–3):126–141. doi:10.1007/s12035-008-8025-0
- Shigemoto R, Nakanishi S, Mizuno N (1992) Distribution of the mRNA for a metabotropic glutamate receptor (mGluR1) in the central nervous system: an in situ hybridization study in adult and developing rat. *J Comp Neurol* 322(1):121–135. doi:10.1002/cne.903220110
- Szabo A, Somogyi J, Cauli B, Lambolez B, Somogyi P, Lamsa KP (2012) Calcium-permeable AMPA receptors provide a common mechanism for LTP in glutamatergic synapses of distinct hippocampal interneuron types. *J Neurosci* 32(19):6511–6516. doi:10.1523/JNEUROSCI.0206-12.2012
- Takayama C, Nakagawa S, Watanabe M, Mishina M, Inoue Y (1995) Light- and electron-microscopic localization of the glutamate receptor channel delta 2 subunit in the mouse Purkinje cell. *Neurosci Lett* 188(2):89–92. pii:030439409511403J
- Tonnes J, Stierli B, Cerletti C, Behrmann JT, Molnar E, Streit P (1999) Regional distribution and developmental changes of GluR1-flop protein revealed by monoclonal antibody in rat brain. *J Neurochem* 73(5):2195–2205
- Treutlein J, Muhleisen TW, Frank J, Mattheisen M, Herms S, Ludwig KU, Treutlein T, Schmael C, Strohmaier J, Bossenz KV, Breuer R, Paul T, Witt SH, Schulze TG, Schlosser RG, Nenadic I, Sauer H, Becker T, Maier W, Cichon S, Nothen MM, Rietschel M (2009) Dissection of phenotype reveals possible association between schizophrenia and glutamate receptor delta 1 (GRID1) gene promoter. *Schizophr Res* 111(1–3):123–130. doi:10.1016/j.schres.2009.03.011
- Uemura T, Lee SJ, Yasumura M, Takeuchi T, Yoshida T, Ra M, Taguchi R, Sakimura K, Mishina M (2010) Trans-synaptic interaction of GluRdelta2 and Neurexin through Cbln1 mediates synapse formation in the cerebellum. *Cell* 141(6):1068–1079. doi:10.1016/j.cell.2010.04.035
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3(7):RESEARCH0034
- Weldon S, Ambroz K, Schutz-Geschwender A, Olive DM (2008) Near-infrared fluorescence detection permits accurate imaging of loading controls for Western blot analysis. *Anal Biochem* 375(1):156–158. doi:10.1016/j.ab.2007.11.035
- Yadav R, Rimerman R, Scofield MA, Dravid SM (2011) Mutations in the transmembrane domain M3 generate spontaneously open orphan glutamate delta1 receptor. *Brain Res* 1382:1–8. doi:10.1016/j.brainres.2010.12.086
- Yadav R, Gupta SC, Hillman BG, Bhatt JM, Stairs DJ, Dravid SM (2012) Deletion of glutamate delta-1 receptor in mouse leads to aberrant emotional and social behaviors. *PLoS One* 7(3):e32969. doi:10.1371/journal.pone.0032969
- Yadav R, Hillman BG, Gupta SC, Suryavanshi P, Bhatt JM, Pavuluri R, Stairs DJ, Dravid SM (2013) Deletion of glutamate delta-1 receptor in mouse leads to enhanced working memory and deficit in fear conditioning. *PLoS One* 8(4):e60785. doi:10.1371/journal.pone.0060785
- Yamasaki M, Miyazaki T, Azechi H, Abe M, Natsume R, Hagiwara T, Aiba A, Mishina M, Sakimura K, Watanabe M (2011)

Glutamate receptor delta2 is essential for input pathway-dependent regulation of synaptic AMPAR contents in cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci* 31(9):3362–3374. doi:10.1523/JNEUROSCI.5601-10.2011

Yamazaki M, Araki K, Shibata A, Mishina M (1992) Molecular cloning of a cDNA encoding a novel member of the mouse glutamate receptor channel family. *Biochem Biophys Res Commun* 183(2):886–892 pii:0006-291X(92)90566-4

Etude du slowEPSC mGluR dans les neurones DA de la substance noire compacte

Nous avons dans un deuxième temps cherché à évaluer le rôle de GluR δ 1 dans la génération du slow EPSC dans les neurones dopaminergiques de la substance noire compacte (SNc). Ces neurones présentent en effet un slowEPSC de large amplitude lors de l'activation des récepteurs mGluRs (Bengtson et al., 2004, Shen and Johnson, 1997, Tozzi et al., 2003). Les travaux menés par l'équipe du Dr Mercuri semble indiquer que ce courant est médié par les TRPCs. Cependant, l'absence de pharmacologie convaincante ainsi qu'une courbe I-V peu ressemblante à celle des TRPCs laisse supposer que ce courant n'est pas entièrement médié par ces canaux.

Ce travail couple scRT-PCR, enregistrement de courants mGluR-GRID1 en système hétérologue, caractérisation pharmacologique en tranche de SNc sur les animaux sauvages et KO pour GluR δ 1, enregistrement *in vivo* de neurones dopaminergiques chez le sauvage et le mutant, ainsi que des enregistrements sur des animaux ayant reçu des injections stéréotaxiques dans la SNc d'un virus Sindbis contenant soit une GFP seule, soit une version dominant-négatif de GluR δ 1 ou enfin une version sauvage de GluR δ 1 . Enfin, dans un dernier temps, les neurones de différentes aires cérébrales projetant vers la SNc ont été transduits par un Lv contenant le gène de la ChR2 afin de reproduire le slowEPSC dans des conditions plus physiologiques. Ces travaux ne seront pas présentés ici car ils ne font pas encore l'objet d'un manuscrit prêt à être soumis.

Bibliographie

- E. E. Abrahamson and R. Y. Moore. The posterior hypothalamic area : chemoarchitecture and afferent connections. *Brain research*, 889(1-2) :1–22, Jan. 2001. ISSN 0006-8993. PMID : 11166682.
- A. R. Adamantidis, F. Zhang, A. M. Aravanis, K. Deisseroth, and L. de Lecea. Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons. *Nature*, page 420–424, Nov. 2007. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nature06310>.
- V. Ady, J. Perroy, L. Tricoire, C. Piochon, S. Dadak, X. Chen, I. Dusart, L. Fagni, B. Lambolez, and C. Levenes. Type 1 metabotropic glutamate receptors (mGlu1) trigger the gating of GluD2 delta glutamate receptors. *EMBO reports*, 15(1) :103–109, Jan. 2014. ISSN 1469-3178. doi : 10.1002/embr.201337371. PMID : 24357660.
- A. Agmon and B. W. Connors. Thalamocortical responses of mouse somatosensory (barrel) cortex in vitro. *Neuroscience*, 41(2-3) :365–379, 1991.
- L. F. Agnati, G. Leo, A. Zanardi, S. Genedani, A. Rivera, K. Fuxe, and D. Guidolin. Volume transmission and wiring transmission from cellular to molecular networks : history and perspectives. *Acta physiologica (Oxford, England)*, 187(1-2) :329–344, June 2006. ISSN 1748-1708. doi : 10.1111/j.1748-1716.2006.01579.x. PMID : 16734770.
- M. Amar, E. Lucas-Meunier, G. Baux, and P. Fossier. Blockade of different muscarinic receptor subtypes changes the equilibrium between excitation and inhibition in rat visual cortex. *Neuroscience*, 169(4) :1610–1620, Sept. 2010. ISSN 1873-7544. doi : 10.1016/j.neuroscience.2010.06.019. PMID : 20600670.
- D. L. Andersen, A. L. Eckert, V. W.-W. Tsai, C. J. Burke, A. E. G. Tannenberg, and P. R. Dodd. GABA(A) receptor sites in the developing human foetus. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, 139(2) :107–119, Dec. 2002. ISSN 0165-3806. PMID : 12480125.
- S. Andjelic, T. Gallopin, B. Cauli, E. L. Hill, L. Roux, S. Badr, E. Hu, G. Tamás, and B. Lambolez. Glutamatergic nonpyramidal neurons from neocortical layer VI and their comparison with pyramidal and spiny stellate neurons. *J. Neurophysiol.*, 101(2) :641–654, Feb. 2009.
- M. C. Angulo, B. Lambolez, E. Audinat, S. Hestrin, and J. Rossier. Subunit composition, kinetic, and permeation properties of AMPA receptors in single neocortical nonpyramidal cells. *J. Neurosci.*, 17(17) :6685–6696, Sept. 1997.
- P. Aracri, D. Banfi, M. E. Pasini, A. Amadeo, and A. Becchetti. Hypocretin (orexin) regulates glutamate input to fast-spiking interneurons in layer v of the fr2 region of the murine prefrontal cortex. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)*, Dec. 2013. ISSN 1460-2199. doi : 10.1093/cercor/bht326. PMID : 24297328.

- K. Araki, H. Meguro, E. Kushiya, C. Takayama, Y. Inoue, and M. Mishina. Selective expression of the glutamate receptor channel delta 2 subunit in cerebellar purkinje cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 197(3) :1267–1276, Dec. 1993. doi : 10.1006/bbrc.1993.2614. URL <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.1993.2614>.
- Y. Arimatsu, M. Ishida, T. Kaneko, S. Ichinose, and A. Omori. Organization and development of corticocortical associative neurons expressing the orphan nuclear receptor. *J. Comp. Neurol.*, 466(2) :180–196, Nov. 2003.
- S. Arroyo, C. Bennett, D. Aziz, S. Brown, and S. Hestrin. Prolonged disynaptic inhibition in the cortex mediated by slow, non- $\alpha 7$ nicotinic excitation of a specific subset of cortical interneurons. *J. Neurosci.*, 32(11) :3859–3864, Mar. 2012.
- G. Ascoli, L. Alonso-Nanclares, S. Anderson, G. Barrionuevo, R. Benavides-Piccione, A. Burkhalter, G. Buzsáki, B. Cauli, J. Defelipe, A. Fairén, D. Feldmeyer, G. Fishell, Y. Fregnac, T. Freund, D. Gardner, E. Gardner, J. Goldberg, M. Helmstaedter, S. Hestrin, F. Karube, Z. Kisvárdy, B. Lambolez, D. Lewis, O. Marin, H. Markram, A. Muñoz, A. Packer, C. Petersen, K. Rockland, J. Rossier, B. Rudy, P. Somogyi, J. Staiger, G. Tamas, A. Thomson, M. Toledo-Rodriguez, Y. Wang, D. West, and R. Yuste. Petilla terminology : nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat. Rev. Neurosci.*, 9(7) : 557–568, July 2008. doi : 10.1038/nrn2402.
- A. Bacci, J. Huguenard, and D. Prince. Functional autaptic neurotransmission in fast-spiking interneurons : a novel form of feedback inhibition in the neocortex. *J. Neurosci.*, 23(3) : 859–866, Feb. 2003.
- A. Baeyer. Ueber die reduction aromatischer verbindungen mittelst ... *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 140(3) :295–296, 1866.
- C. D. C. Bailey, M. D. Biasi, P. J. Fletcher, and E. K. Lambe. The nicotinic acetylcholine receptor alpha5 subunit plays a key role in attention circuitry and accuracy. *J. Neurosci.*, 30(27) :9241–9252, July 2010.
- K. R. Bailey and R. G. Mair. Lesions of specific and nonspecific thalamic nuclei affect prefrontal cortex-dependent aspects of spatial working memory. *Behav. Neurosci.*, 119(2) :410–419, Apr. 2005. doi : 10.1037/0735-7044.119.2.410. URL <http://dx.doi.org/10.1037/0735-7044.119.2.410>.
- A. P. Bannister. Inter- and intra-laminar connections of pyramidal cells in the neocortex. *Neuroscience Research*, 53(2) :95–103, Oct. 2005. ISSN 0168-0102. doi : 10.1016/j.neures.2005.06.019. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168010205001884>.
- N. J. Bannister, J. C. Nelson, and J. J. B. Jack. Excitatory inputs to spiny cells in layers 4 and 6 of cat striate cortex. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 357(1428) :1793–1808, Dec. 2002.
- D. Battaglia, A. Karagiannis, T. Gallopin, H. W. Gutch, and B. Cauli. Beyond the frontiers of neuronal types. *Front Neural Circuits*, 7 :13, 2013. ISSN 1662-5110. doi : 10.3389/fn-cir.2013.00013. PMID : 23403725 PMCID : PMC3566547.
- L. Bayer, E. Eggemann, B. Saint-Mleux, D. Machard, B. E. Jones, M. Mühlethaler, and M. Serafin. Selective action of orexin (hypocretin) on nonspecific thalamocortical projection neurons. *J. Neurosci.*, 22(18) :7835–7839, Sept. 2002a.

- L. Bayer, G. Mairet-Coello, P.-Y. Risold, and B. Griffond. Orexin/hypocretin neurons : chemical phenotype and possible interactions with melanin-concentrating hormone neurons. *Regul. Pept.*, 104(1-3) :33–39, Mar. 2002b.
- L. Bayer, M. Serafin, E. Eggermann, B. Saint-Mleux, D. Machard, B. E. Jones, and M. Mühlenthaler. Exclusive postsynaptic action of hypocretin-orexin on sublayer 6b cortical neurons. *J. Neurosci.*, 24(30) :6760–6764, July 2004.
- M. Beierlein and B. W. Connors. Short-term dynamics of thalamocortical and intracortical synapses onto layer 6 neurons in neocortex. *J. Neurophysiol.*, 88(4) :1924–1932, Oct. 2002.
- M. Beierlein, J. R. Gibson, and B. W. Connors. Two dynamically distinct inhibitory networks in layer 4 of the neocortex. *J. Neurophysiol.*, 90(5) :2987–3000, Nov. 2003. ISSN 0022-3077. doi : 10.1152/jn.00283.2003. PMID : 12815025.
- K. A. Bell, H. Shim, C.-K. Chen, and A. R. McQuiston. Nicotinic excitatory postsynaptic potentials in hippocampal CA1 interneurons are predominantly mediated by nicotinic receptors that contain $\alpha 4$ and $\beta 2$ subunits. *Neuropharmacology*, 61(8) :1379–1388, Dec. 2011. ISSN 1873-7064. doi : 10.1016/j.neuropharm.2011.08.024. PMID : 21878344 PMCID : PMC3196356.
- C. P. Bengtson, A. Tozzi, G. Bernardi, and N. B. Mercuri. Transient receptor potential-like channels mediate metabotropic glutamate receptor EPSCs in rat dopamine neurones. *J. Physiol. (Lond.)*, 555(Pt 2) :323–330, Mar. 2004. doi : 10.1113/jphysiol.2003.060061. URL <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2003.060061>.
- C. Bennett, S. Arroyo, D. Berns, and S. Hestrin. Mechanisms generating dual-component nicotinic EPSCs in cortical interneurons. *J. Neurosci.*, page 17287–17296, Nov. 2012.
- H. W. Berendse and H. J. Groenewegen. Restricted cortical termination fields of the midline and intralaminar thalamic nuclei in the rat. *Neuroscience*, 42(1) :73–102, 1991.
- A. Berndt, P. Schoenenberger, J. Mattis, K. M. Tye, K. Deisseroth, P. Hegemann, and T. G. Oertner. High-efficiency channelrhodopsins for fast neuronal stimulation at low light levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 108(18) :7595–7600, May 2011. ISSN 1091-6490. doi : 10.1073/pnas.1017210108. PMID : 21504945.
- E. H. Bertram and D. X. Zhang. Thalamic excitation of hippocampal CA1 neurons : a comparison with the effects of CA3 stimulation. *Neuroscience*, 92(1) :15–26, 1999. ISSN 0306-4522. PMID : 10392827.
- T. Bessaïh, L. Bourgeois, C. I. Badiu, D. A. Carter, T. I. Toth, D. Ruano, B. Lambolez, V. Cru-nelli, and N. Leresche. Nucleus-specific abnormalities of GABAergic synaptic transmission in a genetic model of absence seizures. *Journal of neurophysiology*, 96(6) :3074–3081, Dec. 2006. ISSN 0022-3077. doi : 10.1152/jn.00682.2006. PMID : 16971676.
- C. T. Beuckmann and M. Yanagisawa. Orexins : from neuropeptides to energy homeostasis and sleep/wake regulation. *J. Mol. Med.*, 80(6) :329–342, June 2002.
- J. P. Bolam, B. H. Wainer, and A. D. Smith. Characterization of cholinergic neurons in the rat neostriatum. a combination of choline acetyltransferase immunocytochemistry, golgi-impregnation and electron microscopy. *Neuroscience*, 12(3) :711–718, July 1984. ISSN 0306-4522. PMID : 6382048.
- P. Bourgin, S. Huitrón-Résendiz, A. D. Spier, V. Fabre, B. Morte, J. R. Criado, J. G. Sutcliffe, S. J. Henriksen, and L. de Lecea. Hypocretin-1 modulates rapid eye movement sleep

- through activation of locus coeruleus neurons. *J. Neurosci.*, 20(20) :7760–7765, Oct. 2000.
- V. Braitenberg and A. Schüz. *Anatomy of the cortex. Statistics and geometry. [Revised edition (1998) under the title : Cortex : statistics and geometry of neuronal connectivity]*. Berlin : Springer-Verlag, 1991.
- M. Brecht and B. Sakmann. Dynamic representation of whisker deflection by synaptic potentials in spiny stellate and pyramidal cells in the barrels and septa of layer 4 rat somatosensory cortex. *The Journal of physiology*, 543(Pt 1) :49–70, Aug. 2002. ISSN 0022-3751. PMID : 12181281 PMCID : PMC2290465.
- J. F. v. Brederode and G. L. Snyder. A comparison of the electrophysiological properties of morphologically identified cells in layers 5B and 6 of the rat neocortex. *Neuroscience*, 50 (2) :315–337, Sept. 1992.
- R. M. Bruno and D. J. Simons. Feedforward mechanisms of excitatory and inhibitory cortical receptive fields. *J. Neurosci.*, 22(24) :10966–10975, Dec. 2002. ISSN 1529-2401. PMID : 12486192.
- J. Brunton and S. Charpak. μ -opioid peptides inhibit thalamic neurons. *J. Neurosci.*, 18 (5) :1671–1678, Mar. 1998.
- D. J. Bucci, P. C. Holland, and M. Gallagher. Removal of cholinergic input to rat posterior parietal cortex disrupts incremental processing of conditioned stimuli. *J. Neurosci.*, 18(19) : 8038–8046, Oct. 1998.
- S. L. Buchanan, D. A. Powell, F. Beylotte, 3rd, and J. Penney. Lesions of the midline thalamic nuclei impair classical conditioning under partial but not continuous reinforcement conditions. *Behav. Brain Res.*, 97(1-2) :49–58, Dec. 1998.
- S. Burette, C. J. Tyler, and C. S. Leonard. Direct and indirect excitation of laterodorsal tegmental neurons by Hypocretin/Orexin peptides : implications for wakefulness and narcolepsy. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 22(7) : 2862–2872, Apr. 2002. ISSN 1529-2401. doi : 20026234. PMID : 11923451.
- M. Canepari, C. Auger, and D. Ogden. Ca^{2+} ion permeability and single-channel properties of the metabotropic slow EPSC of rat purkinje neurons. *J. Neurosci.*, 24(14) :3563–3573, Apr. 2004. doi : 10.1523/JNEUROSCI.5374-03.2004. URL <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5374-03.2004>.
- J. A. Cardin, M. Carlén, K. Meletis, U. Knoblich, F. Zhang, K. Deisseroth, L.-H. Tsai, and C. I. Moore. Targeted optogenetic stimulation and recording of neurons in vivo using cell-type-specific expression of channelrhodopsin-2. *Nat. Protoc.*, 5(2) :247–254, Feb. 2010. doi : 10.1038/nprot.2009.228. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2009.228>.
- M. E. Carter, A. Adamantidis, H. Ohtsu, K. Deisseroth, and L. de Lecea. Sleep homeostasis modulates hypocretin-mediated sleep-to-wake transitions. *J. Neurosci.*, 29 (35) :10939–10949, Sept. 2009. doi : 10.1523/JNEUROSCI.1205-09.2009. URL <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1205-09.2009>.
- P. Castaigne, A. Buge, R. Escourolle, and M. Masson. Ramollissement pédonculaire médian, tegmento-thalamique avec ophtalmoplégie et hypersomnie. *Rev neurol (Paris)*, 106 :357–367, 1962.
- M. A. Castro-Alamancos. Dynamics of sensory thalamocortical synap-

- tic networks during information processing states. *Prog. Neurobiol.*, 74 (4) :213–247, Nov. 2004. doi : 10.1016/j.pneurobio.2004.09.002. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2004.09.002>.
- B. Cauli, E. Audinat, B. Lambolez, M. C. Angulo, N. Ropert, K. Tsuzuki, S. Hestrin, and J. Rossier. Molecular and physiological diversity of cortical nonpyramidal cells. *J. Neurosci.*, 17(10) :3894–3906, May 1997.
- B. Cauli, J. T. Porter, K. Tsuzuki, B. Lambolez, J. Rossier, B. Quenet, and E. Audinat. Classification of fusiform neocortical interneurons based on unsupervised clustering. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97(11) :6144–6149, May 2000.
- B. Cauli, X.-K. Tong, A. Rancillac, N. Serluca, B. Lambolez, J. Rossier, and E. Hamel. Cortical GABA interneurons in neurovascular coupling : relays for subcortical vasoactive pathways. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 24(41) : 8940–8949, Oct. 2004. ISSN 1529-2401. doi : 10.1523/JNEUROSCI.3065-04.2004. PMID : 15483113.
- P. Cesaro, J. Nguyen-Legros, B. Pollin, and S. Laplante. Single intralaminar thalamic neurons project to cerebral cortex, striatum and nucleus reticularis thalami. a retrograde anatomical tracing study in the rat. *Brain research*, 325(1-2) :29–37, Jan. 1985. ISSN 0006-8993. PMID : 3978421.
- J. P. Changeux. The TiPS lecture. the nicotinic acetylcholine receptor : an allosteric protein prototype of ligand-gated ion channels. *Trends in pharmacological sciences*, 11(12) :485–492, Dec. 1990. ISSN 0165-6147. PMID : 2080554.
- R. M. Chemelli, J. T. Willie, C. M. Sinton, J. K. Elmquist, T. Scammell, C. Lee, J. A. Richardson, S. C. Williams, Y. Xiong, Y. Kisanuki, T. E. Fitch, M. Nakazato, R. E. Hammer, C. B. Saper, and M. Yanagisawa. Narcolepsy in orexin knockout mice : molecular genetics of sleep regulation. *Cell*, 98(4) :437–451, Aug. 1999.
- M. Chen, P. C. Pugh, and J. F. Margiotta. Nicotinic synapses formed between chick ciliary ganglion neurons in culture resemble those present on the neurons in vivo. *Journal of neurobiology*, 47(4) :265–279, June 2001. ISSN 0022-3034. PMID : 11351338.
- T. Cholvin, M. Loureiro, R. Cassel, B. Cosquer, K. Geiger, D. De Sa Nogueira, H. Raingard, L. Robelin, C. Kelche, A. Pereira de Vasconcelos, and J.-C. Cassel. The ventral midline thalamus contributes to strategy shifting in a memory task requiring both prefrontal cortical and hippocampal functions. *J. Neurosci.*, 33(20) :8772–8783, May 2013. ISSN 1529-2401. doi : 10.1523/JNEUROSCI.0771-13.2013. PMID : 23678120.
- R. Christison. On the properties of the ordeal-bean of old calabar, western africa. *Monthly Journal of Medicine*, 20 :193–204, 1855.
- E. Christophe, A. Roebuck, J. F. Staiger, D. J. Lavery, S. Charpak, and E. Audinat. Two types of nicotinic receptors mediate an excitation of neocortical layer I interneurons. *J. Neurophysiol.*, 88(3) :1318–1327, Sept. 2002.
- Z. Chu, M. Galarreta, and S. Hestrin. Synaptic interactions of late-spiking neocortical neurons in layer I. *J. Neurosci.*, 23(1) :96–102, Jan. 2003.
- E. d. Cid-Pellitero and M. Garzón. Hypocretin1/OrexinA axon targeting of laterodorsal tegmental nucleus neurons projecting to the rat medial prefrontal cortex. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 21(12) :2762–2773, Dec. 2011. ISSN 1460-2199. doi : 10.1093/cer-

- cor/bhr070. PMID : 21508301.
- B. Clancy and L. J. Cauler. Widespread projections from subgriseal neurons (layer VII) to layer I in adult rat cortex. *J. Comp. Neurol.*, 407(2) :275–286, May 1999.
- R. A. Code and J. A. Winer. Commissural neurons in layer III of cat primary auditory cortex (AI) : pyramidal and non-pyramidal cell input. *J. Comp. Neurol.*, 242(4) :485–510, Dec. 1985.
- A. Compte, M. V. Sanchez-Vives, D. A. McCormick, and X.-J. Wang. Cellular and network mechanisms of slow oscillatory activity (<1 Hz) and wave propagations in a cortical network model. *Journal of neurophysiology*, 89(5) :2707–2725, May 2003. ISSN 0022-3077. doi : 10.1152/jn.00845.2002. PMID : 12612051.
- C. M. Constantinople and R. M. Bruno. Deep cortical layers are activated directly by thalamus. *Science (New York, N.Y.)*, 340(6140) :1591–1594, June 2013. ISSN 1095-9203. doi : 10.1126/science.1236425. PMID : 23812718.
- R. Cossart, C. Bernard, and Y. Ben-Ari. Multiple facets of GABAergic neurons and synapses : multiple fates of GABA signalling in epilepsies. *Trends in neurosciences*, 28(2) :108–115, Feb. 2005. ISSN 0166-2236. doi : 10.1016/j.tins.2004.11.011. PMID : 15667934.
- J. J. Couey, R. M. Meredith, S. Spijker, R. B. Poorthuis, A. B. Smit, A. B. Brussaard, and H. D. Mansvelder. Distributed network actions by nicotine increase the threshold for spike-timing-dependent plasticity in prefrontal cortex. *Neuron*, 54(1) :73–87, Apr. 2007. doi : 10.1016/j.neuron.2007.03.006. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2007.03.006>.
- P. J. Craig, S. Bose, R. Zwart, R. E. Beattie, E. A. Folly, L. R. Johnson, E. Bell, N. M. Evans, G. Benedetti, K. H. Pearson, G. I. McPhie, S. G. Volsen, N. S. Millar, E. Sher, and L. M. Broad. Stable expression and characterisation of a human alpha 7 nicotinic subunit chimera : a tool for functional high-throughput screening. *Eur. J. Pharmacol.*, 502(1-2) :31–40, Oct. 2004. doi : 10.1016/j.ejphar.2004.08.042. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.08.042>.
- M. Criado, L. Svobodová, J. Mulet, F. Sala, and S. Sala. Substitutions of amino acids in the pore domain of homomeric $\alpha 7$ nicotinic receptors for analogous residues present in heteromeric receptors modify gating, rectification and binding properties. *J. Neurochem.*, 119(1) :40–49, Oct. 2011. doi : 10.1111/j.1471-4159.2011.07398.x. URL <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07398.x>.
- S. J. Cruikshank, T. J. Lewis, and B. W. Connors. Synaptic basis for intense thalamocortical activation of feedforward inhibitory cells in neocortex. *Nat. Neurosci.*, 10(4) :462–468, Apr. 2007. doi : 10.1038/nn1861. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nn1861>.
- S. J. Cruikshank, H. Urabe, A. V. Nurmikko, and B. W. Connors. Pathway-specific feed-forward circuits between thalamus and neocortex revealed by selective optical stimulation of axons. *Neuron*, 65(2) :230–245, Jan. 2010. doi : 10.1016/j.neuron.2009.12.025. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2009.12.025>.
- S. J. Cruikshank, O. J. Ahmed, T. R. Stevens, S. L. Patrick, A. N. Gonzalez, M. Elmaleh, and B. W. Connors. Thalamic control of layer 1 circuits in prefrontal cortex. *J. Neurosci.*, 32(49) :17813–17823, Dec. 2012. doi : 10.1523/JNEUROSCI.3231-12.2012. URL <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3231-12.2012>.

- Z. Csaba, E. Krejci, and V. Bernard. Postsynaptic muscarinic m2 receptors at cholinergic and glutamatergic synapses of mouse brainstem motoneurons. *The Journal of comparative neurology*, 521(9) :2008–2024, June 2013. ISSN 1096-9861. doi : 10.1002/cne.23268. PMID : 23184757.
- A. Dahlström and K. Fuxe. Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia*, 20(7) :398–399, July 1964. ISSN 0014-4754. PMID : 5856530.
- H. Dale. The action of certain esters and ethers of choline and their relation to muscarine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 6 :147–190, 1914.
- H. H. Dale and H. W. Dudley. The presence of histamine and acetylcholine in the spleen of the ox and the horse. *The Journal of physiology*, 68(2) :97–123, Oct. 1929. ISSN 0022-3751. PMID : 16994063 PMCID : PMC1402860.
- L. de Lecea, T. S. Kilduff, C. Peyron, X. Gao, P. E. Foye, P. E. Danielson, C. Fukuhara, E. L. Battenberg, V. T. Gautvik, n. Bartlett, F S, W. N. Frankel, A. N. van den Pol, F. E. Bloom, K. M. Gautvik, and J. G. Sutcliffe. The hypocretins : hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(1) :322–327, Jan. 1998. ISSN 0027-8424. PMID : 9419374 PMCID : PMC18213.
- J. DeFelipe, P. L. López-Cruz, R. Benavides-Piccione, C. Bielza, P. Larrañaga, S. Anderson, A. Burkhalter, B. Cauli, A. Fairén, D. Feldmeyer, G. Fishell, D. Fitzpatrick, T. F. Freund, G. González-Burgos, S. Hestrin, S. Hill, P. R. Hof, J. Huang, E. G. Jones, Y. Kawaguchi, Z. Kisvárdy, Y. Kubota, D. A. Lewis, O. Marín, H. Markram, C. J. McBain, H. S. Meyer, H. Monyer, S. B. Nelson, K. Rockland, J. Rossier, J. L. R. Rubenstein, B. Rudy, M. Scanziani, G. M. Shepherd, C. C. Sherwood, J. F. Staiger, G. Tamás, A. Thomson, Y. Wang, R. Yuste, and G. A. Ascoli. New insights into the classification and nomenclature of cortical GABAergic interneurons. *Nat. Rev. Neurosci.*, 14(3) :202–216, Mar. 2013. ISSN 1471-0048. doi : 10.1038/nrn3444. PMID : 23385869 PMCID : PMC3619199.
- K. Deisseroth. Optogenetics. *Nature methods*, 8(1) :26–29, Jan. 2011. ISSN 1548-7105. doi : 10.1038/nmeth.f.324. PMID : 21191368.
- E. Del Cid-Pellitero and M. Garzón. Hypocretin1/OrexinA-containing axons innervate locus coeruleus neurons that project to the rat medial prefrontal cortex. implication in the sleep-wakefulness cycle and cortical activation. *Synapse (New York, N.Y.)*, 65(9) :843–857, Sept. 2011a. ISSN 1098-2396. doi : 10.1002/syn.20912. PMID : 21308795.
- E. Del Cid-Pellitero and M. Garzón. Medial prefrontal cortex receives input from dorsal raphe nucleus neurons targeted by hypocretin1/orexinA-containing axons. *Neuroscience*, 172 : 30–43, Jan. 2011b. ISSN 1873-7544. doi : 10.1016/j.neuroscience.2010.10.058. PMID : 21036204.
- F. Desarnaud, E. Murillo-Rodríguez, L. Lin, M. Xu, D. Gerashchenko, S. N. Shiromani, S. Nishino, E. Mignot, and P. J. Shiromani. The diurnal rhythm of hypocretin in young and old f344 rats. *Sleep*, 27(5) :851–856, Aug. 2004.
- L. Descarries. The hypothesis of an ambient level of acetylcholine in the central nervous system. *Journal of physiology, Paris*, 92(3-4) :215–220, Aug. 1998. ISSN 0928-4257. PMID : 9789811.
- L. Descarries, V. Gisiger, and M. Steriade. Diffuse transmission by acetylcholine in the CNS.

- Progress in neurobiology*, 53(5) :603–625, Dec. 1997. ISSN 0301-0082. PMID : 9421837.
- M. Deschenes, J. Bourassa, and A. Parent. Striatal and cortical projections of single neurons from the central lateral thalamic nucleus in the rat. *Neuroscience*, 72(3) :679–687, June 1996. ISSN 0306-4522. PMID : 9157314.
- A. Y. Deutch, J. Holliday, R. H. Roth, L. L. Chun, and E. Hawrot. Immunohistochemical localization of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor in mammalian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84(23) :8697–8701, Dec. 1987.
- C. G. Diniz Behn and V. Booth. Simulating microinjection experiments in a novel model of the rat sleep-wake regulatory network. *J. Neurophysiol.*, 103(4) :1937–1953, Apr. 2010. doi : 10.1152/jn.00795.2009. URL <http://dx.doi.org/10.1152/jn.00795.2009>.
- C. G. Diniz Behn, N. Kopell, E. N. Brown, T. Mochizuki, and T. E. Scammell. Delayed orexin signaling consolidates wakefulness and sleep : physiology and modeling. *J. Neurophysiol.*, 99(6) :3090–3103, June 2008. doi : 10.1152/jn.01243.2007. URL <http://dx.doi.org/10.1152/jn.01243.2007>.
- M. J. Dolleman-Van der Weel and M. P. Witter. Nucleus reuniens thalami innervates gamma aminobutyric acid positive cells in hippocampal field CA1 of the rat. *Neuroscience letters*, 278(3) :145–148, Jan. 2000. ISSN 0304-3940. PMID : 10653014.
- M. J. Dolleman-Van der Weel, F. H. Lopes da Silva, and M. P. Witter. Nucleus reuniens thalami modulates activity in hippocampal field CA1 through excitatory and inhibitory mechanisms. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 17(14) :5640–5650, July 1997. ISSN 0270-6474. PMID : 9204945.
- J. P. Donoghue and K. L. Carroll. Cholinergic modulation of sensory responses in rat primary somatic sensory cortex. *Brain Res.*, 408(1-2) :367–371, Apr. 1987.
- R. J. Douglas and K. A. C. Martin. Neuronal circuits of the neocortex. *Annu. Rev. Neurosci.*, 27 :419–451, 2004. ISSN 0147-006X. doi : 10.1146/annurev.neuro.27.070203.144152. PMID : 15217339.
- F. Eckenstein and R. W. Baughman. Two types of cholinergic innervation in cortex, one colocalized with vasoactive intestinal polypeptide. *Nature*, 309(5964) :153–155, May 1984. ISSN 0028-0836. PMID : 6717593.
- F. Eckenstein and H. Thoenen. Cholinergic neurons in the rat cerebral cortex demonstrated by immunohistochemical localization of choline acetyltransferase. *Neuroscience letters*, 36(3) :211–215, Apr. 1983. ISSN 0304-3940. PMID : 6866328.
- F. P. Eckenstein, R. W. Baughman, and J. Quinn. An anatomical study of cholinergic innervation in rat cerebral cortex. *Neuroscience*, 25(2) :457–474, May 1988.
- E. Eggermann and D. Feldmeyer. Cholinergic filtering in the recurrent excitatory microcircuit of cortical layer 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 106(28) :11753–11758, July 2009. doi : 10.1073/pnas.0810062106. URL <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0810062106>.
- A. V. Egorov, B. N. Hamam, E. Fransén, M. E. Hasselmo, and A. A. Alonso. Graded persistent activity in entorhinal cortex neurons. *Nature*, 420(6912) :173–178, Nov. 2002. doi : 10.1038/nature01171. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nature01171>.
- J. v. Engelhardt, M. Eliava, A. H. Meyer, A. Rozov, and H. Monyer. Functional characterization of intrinsic cholinergic interneurons in the cortex. *The Journal of Neuroscience*, 27(21) :5633–5642, May 2007. ISSN 0270-6474, 1529-2401. doi : 10.1523/JNEUROSCI.4647-

- 06.2007. URL <http://www.jneurosci.org/content/27/21/5633>. PMID : 17522308.
- K. S. Eriksson, O. Sergeeva, R. E. Brown, and H. L. Haas. Orexin/hypocretin excites the histaminergic neurons of the tuberomammillary nucleus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(23) :9273–9279, Dec. 2001. ISSN 1529-2401. PMID : 11717361.
- I. V. Estabrooke, M. T. McCarthy, E. Ko, T. C. Chou, R. M. Chemelli, M. Yanagisawa, C. B. Saper, and T. E. Scammell. Fos expression in orexin neurons varies with behavioral state. *J. Neurosci.*, 21(5) :1656–1662, Mar. 2001.
- D. R. Euston, A. J. Gruber, and B. L. McNaughton. The role of medial prefrontal cortex in memory and decision making. *Neuron*, 76(6) :1057–1070, Dec. 2012. ISSN 1097-4199. doi : 10.1016/j.neuron.2012.12.002. PMID : 23259943.
- E. Façon, M. Steriade, and N. Wertheim. [prolonged hypersomnia caused by bilateral lesions of the medial activator system ; thrombotic syndrome of the bifurcation of the basilar trunk]. *Revue neurologique*, 98(2) :117–133, Feb. 1958. ISSN 0035-3787. PMID : 13568432.
- S. Frahm, M. A. Slimak, L. Ferrarese, J. Santos-Torres, B. Antolin-Fontes, S. Auer, S. Filkin, S. Pons, J.-F. Fontaine, V. Tsetlin, U. Maskos, and I. Ibañez-Tallon. Aversion to nicotine is regulated by the balanced activity of $\beta 4$ and $\alpha 5$ nicotinic receptor subunits in the medial habenula. *Neuron*, 70(3) :522–535, May 2011. ISSN 1097-4199. doi : 10.1016/j.neuron.2011.04.013. PMID : 21555077.
- C. François, G. Percheron, A. Parent, A. F. Sadikot, G. Fenelon, and J. Yelnik. Topography of the projection from the central complex of the thalamus to the sensorimotor striatal territory in monkeys. *The Journal of comparative neurology*, 305(1) :17–34, Mar. 1991. ISSN 0021-9967. doi : 10.1002/cne.903050104. PMID : 1709648.
- D. D. Fraser and B. A. MacVicar. Cholinergic-dependent plateau potential in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 16(13) :4113–4128, July 1996. ISSN 0270-6474. PMID : 8753873.
- S. Funahashi, C. J. Bruce, and P. S. Goldman-Rakic. Mnemonic coding of visual space in the monkey's dorsolateral prefrontal cortex. *Journal of neurophysiology*, 61(2) :331–349, Feb. 1989. ISSN 0022-3077. PMID : 2918358.
- J. M. Fuster and G. E. Alexander. Neuron activity related to short-term memory. *Science (New York, N.Y.)*, 173(3997) :652–654, Aug. 1971. ISSN 0036-8075. PMID : 4998337.
- L. Gabernet, S. P. Jadhav, D. E. Feldman, M. Carandini, and M. Scanziani. Somatosensory integration controlled by dynamic thalamocortical feed-forward inhibition. *Neuron*, 48(2) :315–327, Oct. 2005. doi : 10.1016/j.neuron.2005.09.022. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2005.09.022>.
- M. Galarreta and S. Hestrin. A network of fast-spiking cells in the neocortex connected by electrical synapses. *Nature*, 402(6757) :72–75, Nov. 1999. ISSN 0028-0836. doi : 10.1038/47029. PMID : 10573418.
- M. Galarreta and S. Hestrin. Electrical and chemical synapses among parvalbumin fast-spiking GABAergic interneurons in adult mouse neocortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99(19) :12438–12443, Sept. 2002. ISSN 0027-8424. doi : 10.1073/pnas.192159599. PMID : 12213962.
- J. Gao, S. F. Maison, X. Wu, K. Hirose, S. M. Jones, I. Bayazitov, Y. Tian, G. Mittleman,

- D. B. Matthews, S. S. Zakharenko, M. C. Liberman, and J. Zuo. Orphan glutamate receptor delta1 subunit required for high-frequency hearing. *Mol. Cell. Biol.*, 27(12) :4500–4512, June 2007. ISSN 0270-7306. doi : 10.1128/MCB.02051-06. PMID : 17438141.
- E. Garcia-Rill, J. A. Biedermann, T. Chambers, R. D. Skinner, R. E. Mrak, M. Husain, and C. N. Karson. Mesopontine neurons in schizophrenia. *Neuroscience*, 66(2) :321–335, May 1995. ISSN 0306-4522. PMID : 7477875.
- N. Gervasi, R. Hepp, L. Tricoire, J. Zhang, B. Lambolez, D. Paupardin-Tritsch, and P. Vincent. Dynamics of protein kinase a signaling at the membrane, in the cytosol, and in the nucleus of neurons in mouse brain slices. *J. Neurosci.*, 27(11) :2744–2750, Mar. 2007. ISSN 1529-2401. doi : 10.1523/JNEUROSCI.5352-06.2007. PMID : 17360896.
- J. R. Gibson, M. Beierlein, and B. W. Connors. Two networks of electrically coupled inhibitory neurons in neocortex. *Nature*, 402(6757) :75–79, Nov. 1999. ISSN 0028-0836. doi : 10.1038/47035. PMID : 10573419.
- Z. Gil and Y. Amitai. Properties of convergent thalamocortical and intracortical synaptic potentials in single neurons of neocortex. *J. Neurosci.*, 16(20) :6567–6578, Oct. 1996. ISSN 0270-6474. PMID : 8815933.
- J. M. Giménez-Amaya, N. R. McFarland, S. de las Heras, and S. N. Haber. Organization of thalamic projections to the ventral striatum in the primate. *The Journal of comparative neurology*, 354(1) :127–149, Mar. 1995. ISSN 0021-9967. doi : 10.1002/cne.903540109. PMID : 7542290.
- A. Goel and D. V. Buonomano. Timing as an intrinsic property of neural networks : evidence from in vivo and in vitro experiments. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 369(1637) :20120460, Mar. 2014. ISSN 1471-2970. doi : 10.1098/rstb.2012.0460. PMID : 24446494 PMCID : PMC3895985.
- P. S. Goldman-Rakic. Cellular basis of working memory. *Neuron*, 14(3) :477–485, Mar. 1995. ISSN 0896-6273. PMID : 7695894.
- M. Gopalakrishnan, B. Buisson, E. Touma, T. Giordano, J. E. Campbell, I. C. Hu, D. Donnelly-Roberts, S. P. Arneric, D. Bertrand, and J. P. Sullivan. Stable expression and pharmacological properties of the human alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor. *Eur. J. Pharmacol.*, 290(3) :237–246, Aug. 1995. ISSN 0014-2999. PMID : 7589218.
- G. Govindaiah and C. L. Cox. Modulation of thalamic neuron excitability by orexins. *Neuropharmacology*, 51(3) :414–425, Sept. 2006. ISSN 0028-3908. doi : 10.1016/j.neuropharm.2006.03.030. PMID : 16713607.
- P. J. Groot-Kormelink, J. P. Boorman, and L. G. Sivilotti. Formation of functional alpha3beta4alpha5 human neuronal nicotinic receptors in xenopus oocytes : a reporter mutation approach. *British journal of pharmacology*, 134(4) :789–796, Oct. 2001. ISSN 0007-1188. doi : 10.1038/sj.bjp.0704313. PMID : 11606319 PMCID : PMC1573006.
- K. Guillem, B. Bloem, R. B. Poorthuis, M. Loos, A. B. Smit, U. Maskos, S. Spijker, and H. D. Mansvelder. Nicotinic acetylcholine receptor $\beta 2$ subunits in the medial prefrontal cortex control attention. *Science*, 333(6044) :888–891, Aug. 2011. ISSN 1095-9203. doi : 10.1126/science.1207079. PMID : 21836018.
- J. J. Hagan, R. A. Leslie, S. Patel, M. L. Evans, T. A. Wattam, S. Holmes, C. D. Benham, S. G. Taylor, C. Routledge, P. Hemmati, R. P. Munton, T. E. Ashmeade, A. S. Shah, J. P.

- Hatcher, P. D. Hatcher, D. N. Jones, M. I. Smith, D. C. Piper, A. J. Hunter, R. A. Porter, and N. Upton. Orexin activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96(19) :10911–10916, Sept. 1999. ISSN 0027-8424. PMID : 10485925.
- A. P. Haghghi and E. Cooper. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors are blocked by intracellular spermine in a voltage-dependent manner. *J. Neurosci.*, 18(11) :4050–4062, June 1998.
- A. P. Haghghi and E. Cooper. A molecular link between inward rectification and calcium permeability of neuronal nicotinic acetylcholine $\alpha 3\beta 4$ and $\alpha 4\beta 2$ receptors. *J. Neurosci.*, 20(2) :529–541, Jan. 2000.
- B. Haider, A. Duque, A. R. Hasenstaub, and D. A. McCormick. Neocortical network activity in vivo is generated through a dynamic balance of excitation and inhibition. *J. Neurosci.*, 26(17) :4535–4545, Apr. 2006. ISSN 1529-2401. doi : 10.1523/JNEUROSCI.5297-05.2006. PMID : 16641233.
- S. Haj-Dahmane and R. Andrade. Muscarinic activation of a voltage-dependent cation non-selective current in rat association cortex. *J. Neurosci.*, 16(12) :3848–3861, June 1996.
- S. Haj-Dahmane and R. Andrade. Ionic mechanism of the slow afterdepolarization induced by muscarinic receptor activation in rat prefrontal cortex. *Journal of neurophysiology*, 80(3) :1197–1210, Sept. 1998. ISSN 0022-3077. PMID : 9744932.
- J. Hanbery and H. Jasper. Independence of diffuse thalamo-cortical projection system shown by specific nuclear destructions. *Journal of neurophysiology*, 16(3) :252–271, May 1953. ISSN 0022-3077. PMID : 13053244.
- J. Hanbery and H. Jasper. The non-specific thalamocortical projection system. *Journal of neurosurgery*, 11(1) :24–25, Jan. 1954. ISSN 0022-3085. doi : 10.3171/jns.1954.11.1.0024. PMID : 13131092.
- K. B. Hansen, P. Naur, N. L. Kurtkaya, A. S. Kristensen, M. Gajhede, J. S. Kastrop, and S. F. Traynelis. Modulation of the dimer interface at ionotropic glutamate-like receptor $\delta 2$ by d-serine and extracellular calcium. *J. Neurosci.*, 29(4) :907–917, Jan. 2009. ISSN 1529-2401. doi : 10.1523/JNEUROSCI.4081-08.2009. PMID : 19176800.
- J. Hartmann, E. Dragicevic, H. Adelsberger, H. A. Henning, M. Sumser, J. Abramowitz, R. Blum, A. Dietrich, M. Freichel, V. Flockerzi, L. Birnbaumer, and A. Konnerth. TRPC3 channels are required for synaptic transmission and motor coordination. *Neuron*, 59(3) :392–398, Aug. 2008. ISSN 1097-4199. doi : 10.1016/j.neuron.2008.06.009. PMID : 18701065.
- K. Hashimoto, R. Ichikawa, H. Takechi, Y. Inoue, A. Aiba, K. Sakimura, M. Mishina, T. Hashikawa, A. Konnerth, M. Watanabe, and M. Kano. Roles of glutamate receptor $\delta 2$ subunit (GluR $\delta 2$) and metabotropic glutamate receptor subtype 1 (mGluR1) in climbing fiber synapse elimination during postnatal cerebellar development. *J. Neurosci.*, 21(24) :9701–9712, Dec. 2001. ISSN 1529-2401. PMID : 11739579.
- O. K. Hassani, M. G. Lee, and B. E. Jones. Melanin-concentrating hormone neurons discharge in a reciprocal manner to orexin neurons across the sleep-wake cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 106(7) :2418–2422, Feb. 2009. ISSN 1091-6490. doi : 10.1073/pnas.0811400106. PMID : 19188611.

- Y. A. Hay, S. Andjelic, S. Badr, and B. Lambolez. Orexin-dependent activation of layer VIb enhances cortical network activity and integration of non-specific thalamocortical inputs. *Brain Struct Funct*, Aug. 2014. ISSN 1863-2661.
- D. O. Hebb. *The organization of behavior*. Hebb, D O, John Wiley & Sons edition, 1949.
- J. C. Hedreen, S. J. Bacon, L. C. Cork, C. A. Kitt, G. D. Crawford, P. M. Salvaterra, and D. L. Price. Immunocytochemical identification of cholinergic neurons in the monkey central nervous system using monoclonal antibodies against choline acetyltransferase. *Neuroscience letters*, 43(2-3) :173–177, Dec. 1983. ISSN 0304-3940. PMID : 6369179.
- J. R. Hembrook and R. G. Mair. Lesions of reuniens and rhomboid thalamic nuclei impair radial maze win-shift performance. *Hippocampus*, 21(8) :815–826, Aug. 2011. doi : 10.1002/hipo.20797. URL <http://dx.doi.org/10.1002/hipo.20797>.
- J. R. Hembrook, K. D. Onos, and R. G. Mair. Inactivation of ventral midline thalamus produces selective spatial delayed conditional discrimination impairment in the rat. *Hippocampus*, 22(4) :853–860, Apr. 2012. doi : 10.1002/hipo.20945. URL <http://dx.doi.org/10.1002/hipo.20945>.
- S. H. Hendry, C. R. Houser, E. G. Jones, and J. E. Vaughn. Synaptic organization of immunocytochemically identified GABA neurons in the monkey sensory-motor cortex. *Journal of neurocytology*, 12(4) :639–660, Aug. 1983. ISSN 0300-4864. PMID : 6352868.
- T. K. Hensch. Critical period regulation. *Annual review of neuroscience*, 27 :549–579, 2004. ISSN 0147-006X. doi : 10.1146/annurev.neuro.27.070203.144327. PMID : 15217343.
- T. K. Hensch and M. Fagiolini. Excitatory-inhibitory balance and critical period plasticity in developing visual cortex. *Progress in brain research*, 147 :115–124, 2005. ISSN 0079-6123. doi : 10.1016/S0079-6123(04)47009-5. PMID : 15581701.
- T. K. Hensch and M. P. Stryker. Columnar architecture sculpted by GABA circuits in developing cat visual cortex. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5664) :1678–1681, Mar. 2004. ISSN 1095-9203. doi : 10.1126/science.1091031. PMID : 15017001 PMCID : PMC2562723.
- R. Hepp, L. Tricoire, E. Hu, N. Gervasi, D. Paupardin-Tritsch, B. Lambolez, and P. Vincent. Phosphodiesterase type 2 and the homeostasis of cyclic GMP in living thalamic neurons. *J. Neurochem.*, 102(6) :1875–1886, Sept. 2007. ISSN 0022-3042. doi : 10.1111/j.1471-4159.2007.04657.x. PMID : 17561940.
- M. Herkenham. Laminar organization of thalamic projections to the rat neocortex. *Science*, 207(4430) :532–535, Feb. 1980.
- M. Herkenham and C. B. Pert. Mosaic distribution of opiate receptors, parafascicular projections and acetylcholinesterase in rat striatum. *Nature*, 291(5814) :415–418, June 1981. ISSN 0028-0836. PMID : 6165892.
- S. Hestrin and W. E. Armstrong. Morphology and physiology of cortical neurons in layer I. *J. Neurosci.*, 16(17) :5290–5300, Sept. 1996. ISSN 0270-6474. PMID : 8757242.
- H. Hirai, T. Launey, S. Mikawa, T. Torashima, D. Yanagihara, T. Kasaura, A. Miyamoto, and M. Yuzaki. New role of delta2-glutamate receptors in AMPA receptor trafficking and cerebellar function. *Nat. Neurosci.*, 6(8) :869–876, Aug. 2003. ISSN 1097-6256. doi : 10.1038/nn1086. PMID : 12833050.
- H. Hirai, T. Miyazaki, W. Kakegawa, S. Matsuda, M. Mishina, M. Watanabe, and M. Yuzaki. Rescue of abnormal phenotypes of the delta2 glutamate receptor-null mice by mu-

- tant delta2 transgenes. *EMBO Rep.*, 6(1) :90–95, Jan. 2005. ISSN 1469-221X. doi : 10.1038/sj.embor.7400312. PMID : 15592450.
- T. Hirano, K. Kasono, K. Araki, K. Shinozuka, and M. Mishina. Involvement of the glutamate receptor delta 2 subunit in the long-term depression of glutamate responsiveness in cultured rat purkinje cells. *Neurosci. Lett.*, 182(2) :172–176, Dec. 1994. ISSN 0304-3940. PMID : 7715804.
- K. Hironaka, H. Umemori, T. Tezuka, M. Mishina, and T. Yamamoto. The protein-tyrosine phosphatase PTPMEG interacts with glutamate receptor delta 2 and epsilon subunits. *J. Biol. Chem.*, 275(21) :16167–16173, May 2000. ISSN 0021-9258. doi : 10.1074/jbc.M909302199. PMID : 10748123.
- J. A. Hirsch, C. A. Gallagher, J. M. Alonso, and L. M. Martinez. Ascending projections of simple and complex cells in layer 6 of the cat striate cortex. *J. Neurosci.*, 18(19) : 8086–8094, Oct. 1998.
- T. Hofmann, A. G. Obukhov, M. Schaefer, C. Harteneck, T. Gudermann, and G. Schultz. Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature*, 397 (6716) :259–263, Jan. 1999. ISSN 0028-0836. doi : 10.1038/16711. PMID : 9930701.
- J. P. Hornung and L. J. Garey. Ultrastructure of visual callosal neurons in cat identified by retrograde axonal transport of horseradish peroxidase. *J. Neurocytol.*, 10(2) :297–314, Apr. 1981.
- C. R. Houser, S. H. Hendry, E. G. Jones, and J. E. Vaughn. Morphological diversity of immunocytochemically identified GABA neurons in the monkey sensory-motor cortex. *J. Neurocytol.*, 12(4) :617–638, Aug. 1983.
- E. Hu, L. Demmou, B. Cauli, T. Gallopin, H. Geoffroy, R. M. Harris-Warrick, D. Paupardin-Tritsch, B. Lambolez, P. Vincent, and R. Hepp. VIP, CRF, and PACAP act at distinct receptors to elicit different cAMP/PKA dynamics in the neocortex. *Cereb. Cortex*, Aug. 2011.
- H. Hu, M. Martina, and P. Jonas. Dendritic mechanisms underlying rapid synaptic activation of fast-spiking hippocampal interneurons. *Science (New York, N.Y.)*, 327(5961) :52–58, Jan. 2010. ISSN 1095-9203. doi : 10.1126/science.1177876. PMID : 19965717.
- H. Huang, P. Ghosh, and A. N. v. d. Pol. Prefrontal cortex-projecting glutamatergic thalamic paraventricular nucleus-excited by hypocretin : a feedforward circuit that may enhance cognitive arousal. *J. Neurophysiol.*, 95(3) :1656–1668, Mar. 2006.
- M. Hübener and J. Bolz. Morphology of identified projection neurons in layer 5 of rat visual cortex. *Neuroscience letters*, 94(1-2) :76–81, Nov. 1988. ISSN 0304-3940. PMID : 2468117.
- T. Ida, K. Nakahara, T. Katayama, N. Murakami, and M. Nakazato. Effect of lateral cerebroventricular injection of the appetite-stimulating neuropeptide, orexin and neuropeptide y, on the various behavioral activities of rats. *Brain Res.*, 821(2) :526–529, Mar. 1999. ISSN 0006-8993. PMID : 10064841.
- T. Inoue and K. Imoto. Feedforward inhibitory connections from multiple thalamic cells to multiple regular-spiking cells in layer 4 of the somatosensory cortex. *J. Neurophysiol.*, 96(4) :1746–1754, Oct. 2006. ISSN 0022-3077. doi : 10.1152/jn.00301.2006. PMID : 16855112.
- H. Jasper, C. Ajmone-Marsan, and J. Hanbery. Pathways and functional properties of the

- nonspecific thalamo-cortical projection system. *Transactions of the American Neurological Association*, 3(78th Meeting) :9–11, 1953. ISSN 0065-9479. PMID : 13179162.
- H. H. Jasper and J. Tessier. Acetylcholine liberation from cerebral cortex during paradoxical (REM) sleep. *Science*, 172(3983) :601–602, May 1971. ISSN 0036-8075. PMID : 4324472.
- J. Jobst and O. Hesse. Ueber die bohne von calabar. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 129(1) :115–121, 1864.
- E. Jones. *Principles of thalamic organization*. In : *The Thalamus 2nd Edition (pp87-170)*. Cambridge University Press., 2007.
- E. G. Jones and R. Y. Leavitt. Retrograde axonal transport and the demonstration of non-specific projections to the cerebral cortex and striatum from thalamic intralaminar nuclei in the rat, cat and monkey. *The Journal of comparative neurology*, 154(4) :349–377, Apr. 1974. ISSN 0021-9967. doi : 10.1002/cne.901540402. PMID : 4132969.
- I. W. Jones and S. Wonnacott. Precise localization of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors on glutamatergic axon terminals in the rat ventral tegmental area. *J. Neurosci.*, 24(50) : 11244–11252, Dec. 2004. ISSN 1529-2401. doi : 10.1523/JNEUROSCI.3009-04.2004. PMID : 15601930.
- W. Kakegawa, K. Kohda, and M. Yuzaki. The delta2 'ionotropic' glutamate receptor functions as a non-ionotropic receptor to control cerebellar synaptic plasticity. *J. Physiol. (Lond.)*, 584(Pt 1) :89–96, Oct. 2007. ISSN 0022-3751. doi : 10.1113/jphysiol.2007.141291. PMID : 17702810.
- W. Kakegawa, T. Miyazaki, K. Emi, K. Matsuda, K. Kohda, J. Motohashi, M. Mishina, S. Kawahara, M. Watanabe, and M. Yuzaki. Differential regulation of synaptic plasticity and cerebellar motor learning by the c-terminal PDZ-binding motif of GluRdelta2. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(6) :1460–1468, Feb. 2008. ISSN 1529-2401. doi : 10.1523/JNEUROSCI.2553-07.2008. PMID : 18256267.
- W. Kakegawa, T. Miyazaki, K. Kohda, K. Matsuda, K. Emi, J. Motohashi, M. Watanabe, and M. Yuzaki. The n-terminal domain of GluR2 (GluRdelta2) recruits presynaptic terminals and regulates synaptogenesis in the cerebellum in vivo. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(18) :5738–5748, May 2009. ISSN 1529-2401. doi : 10.1523/JNEUROSCI.6013-08.2009. PMID : 19420242.
- N. Kalisman, G. Silberberg, and H. Markram. The neocortical microcircuit as a tabula rasa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102(3) :880–885, Jan. 2005. ISSN 0027-8424, 1091-6490. doi : 10.1073/pnas.0407088102. URL <http://www.pnas.org/content/102/3/880>. PMID : 15630093.
- A. Karagiannis, T. Gallopin, C. Dávid, D. Battaglia, H. Geoffroy, J. Rossier, E. M. C. Hillman, J. F. Staiger, and B. Cauli. Classification of NPY-expressing neocortical interneurons. *J. Neurosci.*, 29(11) :3642–3659, Mar. 2009.
- T. Karayannis, I. Huerta-Ocampo, and M. Capogna. GABAergic and pyramidal neurons of deep cortical layers directly receive and differently integrate callosal input. *Cereb. Cortex*, 17(5) :1213–1226, May 2007. ISSN 1047-3211. doi : 10.1093/cercor/bhl035. PMID : 16829551.
- N. Kashiwabuchi, K. Ikeda, K. Araki, T. Hirano, K. Shibuki, C. Takayama, Y. Inoue, T. Kut-

- suwada, T. Yagi, and Y. Kang. Impairment of motor coordination, purkinje cell synapse formation, and cerebellar long-term depression in GluR delta 2 mutant mice. *Cell*, 81(2) : 245–252, Apr. 1995. ISSN 0092-8674. PMID : 7736576.
- S. M. Kassam, P. M. Herman, N. M. Goodfellow, N. C. Alves, and E. K. Lambe. Developmental excitation of corticothalamic neurons by nicotinic acetylcholine receptors. *J. Neurosci.*, 28(35) :8756–8764, Aug. 2008.
- H. E. Kato, F. Zhang, O. Yizhar, C. Ramakrishnan, T. Nishizawa, K. Hirata, J. Ito, Y. Aita, T. Tsukazaki, S. Hayashi, P. Hegemann, A. D. Maturana, R. Ishitani, K. Deisseroth, and O. Nureki. Crystal structure of the channelrhodopsin light-gated cation channel. *Nature*, 482(7385) :369–374, Feb. 2012. ISSN 0028-0836. doi : 10.1038/nature10870. URL <http://www.nature.com/nature/journal/v482/n7385/full/nature10870.html>.
- Y. Kawaguchi. Physiological, morphological, and histochemical characterization of three classes of interneurons in rat neostriatum. *J. Neurosci.*, 13(11) :4908–4923, Nov. 1993. ISSN 0270-6474. PMID : 7693897.
- Y. Kawaguchi. Physiological subgroups of nonpyramidal cells with specific morphological characteristics in layer II/III of rat frontal cortex. *J. Neurosci.*, 15(4) :2638–2655, Apr. 1995. ISSN 0270-6474. PMID : 7722619.
- Y. Kawaguchi. Selective cholinergic modulation of cortical GABAergic cell subtypes. *J. Neurophysiol.*, 78(3) :1743–1747, Sept. 1997.
- S. J. Kim, Y. S. Kim, J. P. Yuan, R. S. Petralia, P. F. Worley, and D. J. Linden. Activation of the TRPC1 cation channel by metabotropic glutamate receptor mGluR1. *Nature*, 426 (6964) :285–291, Nov. 2003. ISSN 1476-4687. doi : 10.1038/nature02162. PMID : 14614461.
- F. Kimura, C. Itami, K. Ikezoe, H. Tamura, I. Fujita, Y. Yanagawa, K. Obata, and M. Ohshima. Fast activation of feedforward inhibitory neurons from thalamic input and its relevance to the regulation of spike sequences in the barrel cortex. *J. Physiol. (Lond.)*, 588(Pt 15) : 2769–2787, Aug. 2010. ISSN 1469-7793. doi : 10.1113/jphysiol.2010.188177. PMID : 20530116.
- Z. F. Kisvarday, A. Cowey, A. D. Smith, and P. Somogyi. Interlaminar and lateral excitatory amino acid connections in the striate cortex of monkey. *J. Neurosci.*, 9(2) :667–682, Feb. 1989. ISSN 0270-6474. PMID : 2537391.
- S. Kleinlogel, K. Feldbauer, R. E. Dempsey, H. Fotis, P. G. Wood, C. Bamann, and E. Bamberg. Ultra light-sensitive and fast neuronal activation with the Ca^{2+} -permeable channel-rhodopsin CatCh. *Nat. Neurosci.*, 14(4) :513–518, Apr. 2011. ISSN 1546-1726. doi : 10.1038/nn.2776. PMID : 21399632.
- T. Knöpfel. Genetically encoded optical indicators for the analysis of neuronal circuits. *Nature reviews. Neuroscience*, 13(10) :687–700, Oct. 2012. ISSN 1471-0048. doi : 10.1038/nrn3293. PMID : 22931891.
- K. Kohda, Y. Wang, and M. Yuzaki. Mutation of a glutamate receptor motif reveals its role in gating and delta2 receptor channel properties. *Nat. Neurosci.*, 3(4) :315–322, Apr. 2000. ISSN 1097-6256. doi : 10.1038/73877. PMID : 10725919.
- K. Kohda, Y. Kamiya, S. Matsuda, K. Kato, H. Umemori, and M. Yuzaki. Heteromer formation of delta2 glutamate receptors with AMPA or kainate receptors. *Brain Res. Mol. Brain Res.*,

- 110(1) :27–37, Jan. 2003. ISSN 0169-328X. PMID : 12573530.
- K. Kohda, W. Kakegawa, S. Matsuda, R. Nakagami, N. Kakiya, and M. Yuzaki. The extreme c-terminus of GluRdelta2 is essential for induction of long-term depression in cerebellar slices. *Eur. J. Neurosci.*, 25(5) :1357–1362, Mar. 2007. ISSN 0953-816X. doi : 10.1111/j.1460-9568.2007.05412.x. PMID : 17425562.
- M. M. Kohl and O. Paulsen. The roles of GABAB receptors in cortical network activity. *Adv. Pharmacol.*, 58 :205–229, 2010. ISSN 1557-8925. doi : 10.1016/S1054-3589(10)58009-8. PMID : 20655484.
- M. Koike, M. Iino, and S. Ozawa. Blocking effect of 1-naphthyl acetyl spermine on Ca^{2+} -permeable AMPA receptors in cultured rat hippocampal neurons. *Neurosci. Res.*, 29(1) : 27–36, Sept. 1997. ISSN 0168-0102. PMID : 9293490.
- A. M. Kraus, A. H. Hautefeuille, M.-P. Cros, V. Krutovskikh, J.-M. Tournier, P. Birembaut, A. Thépot, A. Paliwal, Z. Herceg, P. Boffetta, P. Brennan, and P. L. Hainaut. CHRNA5 as negative regulator of nicotine signaling in normal and cancer bronchial cells : effects on motility, migration and p63 expression. *Carcinogenesis*, 32(9) :1388–1395, Sept. 2011. ISSN 1460-2180. doi : 10.1093/carcin/bgr090. PMID : 21586512 PMCID : PMC3165122.
- R. H. Kramer, A. Mourot, and H. Adesnik. Optogenetic pharmacology for control of native neuronal signaling proteins. *Nature neuroscience*, 16(7) :816–823, July 2013. ISSN 1546-1726. doi : 10.1038/nn.3424. PMID : 23799474.
- Y. Kubota, R. Hattori, and Y. Yui. Three distinct subpopulations of GABAergic neurons in rat frontal agranular cortex. *Brain Res.*, 649(1-2) :159–173, June 1994.
- A. Kuryatov, W. Berrettini, and J. Lindstrom. Acetylcholine receptor (AChR) $\alpha 5$ subunit variant associated with risk for nicotine dependence and lung cancer reduces ($\alpha 4\alpha 2$) $\alpha 5$ AChR function. *Mol. Pharmacol.*, 79(1) :119–125, Jan. 2011. doi : 10.1124/mol.110.066357. URL <http://dx.doi.org/10.1124/mol.110.066357>.
- C. Labarca, M. W. Nowak, H. Zhang, L. Tang, P. Deshpande, and H. A. Lester. Channel gating governed symmetrically by conserved leucine residues in the m2 domain of nicotinic receptors. *Nature*, 376(6540) :514–516, Aug. 1995. ISSN 0028-0836. doi : 10.1038/376514a0. PMID : 7637783.
- A. Lalouette, J. L. Guénet, and S. Vríz. Hotfoot mouse mutations affect the delta 2 glutamate receptor gene and are allelic to lurcher. *Genomics*, 50(1) :9–13, May 1998. ISSN 0888-7543. doi : 10.1006/geno.1998.5314. PMID : 9628817.
- A. Lalouette, A. Lohof, C. Sotelo, J. Guénet, and J. Mariani. Neurobiological effects of a null mutation depend on genetic context : comparison between two hotfoot alleles of the delta-2 ionotropic glutamate receptor. *Neuroscience*, 105(2) :443–455, 2001. ISSN 0306-4522. PMID : 11672610.
- E. K. Lambe and G. K. Aghajanian. Hypocretin (orexin) induces calcium transients in single spines postsynaptic to identified thalamocortical boutons in prefrontal slice. *Neuron*, 40(1) :139–150, Sept. 2003. ISSN 0896-6273. PMID : 14527439.
- E. K. Lambe, P. Olausson, N. K. Horst, J. R. Taylor, and G. K. Aghajanian. Hypocretin and nicotine excite the same thalamocortical synapses in prefrontal cortex : correlation with improved attention in rat. *J. Neurosci.*, 25(21) :5225–5229, May 2005.
- E. K. Lambe, R.-J. Liu, and G. K. Aghajanian. Schizophrenia, hypocretin (orexin), and the

- thalamocortical activating system. *Schizophrenia bulletin*, 33(6) :1284–1290, Nov. 2007. ISSN 0586-7614. doi : 10.1093/schbul/sbm088. PMID : 17656637 PMCID : PMC2779889.
- B. Lambolez, E. Audinat, P. Bochet, F. Crépel, and J. Rossier. AMPA receptor subunits expressed by single purkinje cells. *Neuron*, 9(2) :247–258, Aug. 1992.
- B. Lamotte d'Incamps and P. Ascher. Four excitatory postsynaptic ionotropic receptors coactivated at the motoneuron-renshaw cell synapse. *J. Neurosci.*, 28(52) :14121–14131, Dec. 2008. ISSN 1529-2401. doi : 10.1523/JNEUROSCI.3311-08.2008. PMID : 19109494.
- B. Lamotte d'Incamps and P. Ascher. Subunit composition and kinetics of the renshaw cell heteromeric nicotinic receptors. *Biochemical pharmacology*, 86(8) :1114–1121, Oct. 2013. ISSN 1873-2968. doi : 10.1016/j.bcp.2013.06.017. PMID : 23811311.
- B. Lamotte d'Incamps, E. Krejci, and P. Ascher. Mechanisms shaping the slow nicotinic synaptic current at the motoneuron-renshaw cell synapse. *J. Neurosci.*, 32(24) :8413–8423, June 2012. ISSN 1529-2401. doi : 10.1523/JNEUROSCI.0181-12.2012. PMID : 22699921.
- Y. Lamour, P. Dutar, and A. Jobert. Topographic organization of basal forebrain neurons projecting to the rat cerebral cortex. *Neuroscience letters*, 34(2) :117–122, Dec. 1982. ISSN 0304-3940. PMID : 6306515.
- B. Lavoie and A. Parent. Serotonergic innervation of the thalamus in the primate : an immunohistochemical study. *The Journal of comparative neurology*, 312(1) :1–18, Oct. 1991. ISSN 0021-9967. doi : 10.1002/cne.903120102. PMID : 1744240.
- N. Le Roux, M. Amar, G. Baux, and P. Fossier. Homeostatic control of the excitation-inhibition balance in cortical layer 5 pyramidal neurons. *The European journal of neuroscience*, 24 (12) :3507–3518, Dec. 2006. ISSN 0953-816X. doi : 10.1111/j.1460-9568.2006.05203.x. PMID : 17229099.
- N. Le Roux, M. Amar, A. W. Moreau, and P. Fossier. Roles of nitric oxide in the homeostatic control of the excitation-inhibition balance in rat visual cortical networks. *Neuroscience*, 163(3) :942–951, Oct. 2009. ISSN 1873-7544. doi : 10.1016/j.neuroscience.2009.07.010. PMID : 19591901.
- R. N. Leão, S. Mikulovic, K. E. Leão, H. Munguba, H. Gezelius, A. Enjin, K. Patra, A. Eriksson, L. M. Loew, A. B. L. Tort, and K. Kullander. OLM interneurons differentially modulate CA3 and entorhinal inputs to hippocampal CA1 neurons. *Nature neuroscience*, 15(11) : 1524–1530, Nov. 2012. ISSN 1546-1726. doi : 10.1038/nn.3235. PMID : 23042082 PMCID : PMC3483451.
- M. G. Lee, O. K. Hassani, A. Alonso, and B. E. Jones. Cholinergic basal forebrain neurons burst with theta during waking and paradoxical sleep. *J. Neurosci.*, 25(17) :4365–4369, Apr. 2005. ISSN 1529-2401. doi : 10.1523/JNEUROSCI.0178-05.2005. PMID : 15858062.
- B. Li, F. Chen, J. Ye, X. Chen, J. Yan, Y. Li, Y. Xiong, Z. Zhou, J. Xia, and Z. Hu. The modulation of orexin a on HCN currents of pyramidal neurons in mouse prelimbic cortex. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 20(7) :1756–1767, July 2010. ISSN 1460-2199. doi : 10.1093/cercor/bhp241. PMID : 19915095.
- P. Li and J. H. Steinbach. The neuronal nicotinic alpha4beta2 receptor has a high maximal probability of being open. *Br. J. Pharmacol.*, 160(8) :1906–1915, Aug. 2010. ISSN 1476-5381. doi : 10.1111/j.1476-5381.2010.00761.x. PMID : 20649589.

- O. Liebreich. Ueber die chemische beschaffenheit der gehirnsubstanz. *Ann. d. Chemie und Pharm. B.*, cxxxiv. :29, 1865.
- L. Lin, J. Faraco, R. Li, H. Kadotani, W. Rogers, X. Lin, X. Qiu, P. J. d. Jong, S. Nishino, and E. Mignot. The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell*, 98(3) :365–376, Aug. 1999.
- J. E. Lisman, J. M. Fellous, and X. J. Wang. A role for NMDA-receptor channels in working memory. *Nature neuroscience*, 1(4) :273–275, Aug. 1998. ISSN 1097-6256. doi : 10.1038/1086. PMID : 10195158.
- Q. A. Liu and H. Shio. Mitochondrial morphogenesis, dendrite development, and synapse formation in cerebellum require both bcl-w and the glutamate receptor delta2. *PLoS Genet.*, 4(6) :e1000097, June 2008. ISSN 1553-7404. doi : 10.1371/journal.pgen.1000097. PMID : 18551174.
- Z.-W. Liu and X.-B. Gao. Adenosine inhibits activity of hypocretin/orexin neurons by the $\alpha 1$ receptor in the lateral hypothalamus : a possible sleep-promoting effect. *J. Neurophysiol.*, 97(1) :837–848, Jan. 2007. ISSN 0022-3077. doi : 10.1152/jn.00873.2006. PMID : 17093123.
- O. Loewi and E. Navratil. *Pflügers Arch. Ges. Physiol*, 214 :678, 1926.
- H. Lomeli, R. Sprengel, D. J. Laurie, G. Köhr, A. Herb, P. H. Seeburg, and W. Wisden. The rat delta-1 and delta-2 subunits extend the excitatory amino acid receptor family. *FEBS Lett.*, 315(3) :318–322, Jan. 1993. ISSN 0014-5793. PMID : 8422924.
- R. Lorente de Nó. *Cerebral cortex : architecture, intracortical connections, motor projections, Physiology of Nervous System, 2nd edition*. Oxford University Press, London, 1938.
- M. Loureiro, T. Cholvin, J. Lopez, N. Merienne, A. Latreche, B. Cosquer, K. Geiger, C. Kelche, J.-C. Cassel, and A. Pereira de Vasconcelos. The ventral midline thalamus (reuniens and rhomboid nuclei) contributes to the persistence of spatial memory in rats. *J. Neurosci.*, 32(29) :9947–9959, July 2012. ISSN 1529-2401. doi : 10.1523/JNEUROSCI.0410-12.2012. PMID : 22815509.
- J. Lübke, V. Egger, B. Sakmann, and D. Feldmeyer. Columnar organization of dendrites and axons of single and synaptically coupled excitatory spiny neurons in layer 4 of the rat barrel cortex. *J. Neurosci.*, 20(14) :5300–5311, July 2000.
- E. Lucas-Meunier, C. Monier, M. Amar, G. Baux, Y. Frégnac, and P. Fossier. Involvement of nicotinic and muscarinic receptors in the endogenous cholinergic modulation of the balance between excitation and inhibition in the young rat visual cortex. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 19(10) :2411–2427, Oct. 2009. ISSN 1460-2199. doi : 10.1093/cercor/bhn258. PMID : 19176636.
- P. G. Luiten, J. Spencer, D G, J. Traber, and R. P. Gaykema. The pattern of cortical projections from the intermediate parts of the magnocellular nucleus basalis in the rat demonstrated by tracing with phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. *Neuroscience letters*, 57(2) :137–142, June 1985. ISSN 0304-3940. PMID : 4034090.
- P. G. Luiten, R. P. Gaykema, J. Traber, and J. Spencer, D G. Cortical projection patterns of magnocellular basal nucleus subdivisions as revealed by anterogradely transported phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *Brain research*, 413(2) :229–250, June 1987. ISSN 0006-8993. PMID : 3300852.

- A. Lysakowski, B. H. Wainer, G. Bruce, and L. B. Hersh. An atlas of the regional and laminar distribution of choline acetyltransferase immunoreactivity in rat cerebral cortex. *Neuroscience*, 28(2) :291–336, 1989. ISSN 0306-4522. PMID : 2646551.
- G. Macchi, A. Quattrini, P. Chinzari, G. Marchesi, and G. Capocchi. Quantitative data on cell loss and cellular atrophy of intralaminar nuclei following cortical and subcortical lesions. *Brain research*, 89(1) :43–59, May 1975. ISSN 0006-8993. PMID : 1148844.
- G. Macchi, M. Bentivoglio, C. D'Atena, P. Rossini, and E. Tempesta. The cortical projections of the thalamic intralaminar nuclei restudied by means of the HRP retrograde axonal transport. *Neuroscience letters*, 4(3-4) :121–126, Mar. 1977. ISSN 0304-3940. PMID : 19604932.
- D. M. MacLean. The delta2 glutamate-like receptor undergoes similar conformational changes as other ionotropic glutamate receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(21) :6767–6768, May 2009. ISSN 1529-2401. doi : 10.1523/JNEUROSCI.1456-09.2009. PMID : 19474303.
- R. G. Mair and J. R. Hembrook. Memory enhancement with event-related stimulation of the rostral intralaminar thalamic nuclei. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(52) :14293–14300, Dec. 2008. ISSN 1529-2401. doi : 10.1523/JNEUROSCI.3301-08.2008. PMID : 19109510 PMCID : PMC2630113.
- G. Mandolesi, R. Cesa, E. Autuori, and P. Strata. An orphan ionotropic glutamate receptor : the delta2 subunit. *Neuroscience*, 158(1) :67–77, Jan. 2009. ISSN 0306-4522. doi : 10.1016/j.neuroscience.2008.02.050. PMID : 18424007.
- J. M. Mangin, M. Baloul, L. Prado De Carvalho, B. Rogister, J. M. Rigo, and P. Legendre. Kinetic properties of the alpha2 homo-oligomeric glycine receptor impairs a proper synaptic functioning. *The Journal of physiology*, 553(Pt 2) :369–386, Dec. 2003. ISSN 0022-3751. doi : 10.1113/jphysiol.2003.052142. PMID : 12972628 PMCID : PMC2343566.
- E. O. Mann, M. M. Kohl, and O. Paulsen. Distinct roles of GABA(A) and GABA(B) receptors in balancing and terminating persistent cortical activity. *J. Neurosci.*, 29(23) :7513–7518, June 2009. ISSN 1529-2401. doi : 10.1523/JNEUROSCI.6162-08.2009. PMID : 19515919.
- J. N. Marcus, C. J. Aschkenasi, C. E. Lee, R. M. Chemelli, C. B. Saper, M. Yanagisawa, and J. K. Elmquist. Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. *The Journal of comparative neurology*, 435(1) :6–25, June 2001. ISSN 0021-9967. PMID : 11370008.
- H. Markram, M. Toledo-Rodriguez, Y. Wang, A. Gupta, G. Silberberg, and C. Wu. Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat. Rev. Neurosci.*, 5(10) : 793–807, Jan. 2004. ISSN 1471-003X. doi : 10.1038/nrn1519. URL <http://www.nature.com/nrn/journal/v5/n10/full/nrn1519.html>.
- M. Marx and D. Feldmeyer. Morphology and physiology of excitatory neurons in layer 6b of the somatosensory rat barrel cortex. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 23(12) : 2803–2817, Dec. 2013. ISSN 1460-2199. doi : 10.1093/cercor/bhs254. PMID : 22944531 PMCID : PMC3827708.
- U. Maskos. The cholinergic mesopontine tegmentum is a relatively neglected nicotinic master modulator of the dopaminergic system : relevance to drugs of abuse and pathology. *British journal of pharmacology*, 153 Suppl 1 :S438–445, Mar. 2008. ISSN 0007-1188. doi :

- 10.1038/bjp.2008.5. PMID : 18223661 PMCID : PMC2268063.
- I. Matsuda and M. Mishina. Identification of a juxtamembrane segment of the glutamate receptor delta2 subunit required for the plasma membrane localization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 275(2) :565–571, Aug. 2000. ISSN 0006-291X. doi : 10.1006/bbrc.2000.3351. PMID : 10964704.
- K. Matsuda, S. Matsuda, C. M. Gladding, and M. Yuzaki. Characterization of the delta2 glutamate receptor-binding protein delphilin : Splicing variants with differential palmitoylation and an additional PDZ domain. *J. Biol. Chem.*, 281(35) :25577–25587, Sept. 2006. ISSN 0021-9258. doi : 10.1074/jbc.M602044200. PMID : 16835239.
- K. Matsuda, E. Miura, T. Miyazaki, W. Kakegawa, K. Emi, S. Narumi, Y. Fukazawa, A. Ito-Ishida, T. Kondo, R. Shigemoto, M. Watanabe, and M. Yuzaki. Cbln1 is a ligand for an orphan glutamate receptor delta2, a bidirectional synapse organizer. *Science*, 328(5976) : 363–368, Apr. 2010. ISSN 1095-9203. doi : 10.1126/science.1185152. PMID : 20395510.
- S. Matsuda and M. Yuzaki. Mutation in hotfoot-4J mice results in retention of delta2 glutamate receptors in ER. *Eur. J. Neurosci.*, 16(8) :1507–1516, Oct. 2002. ISSN 0953-816X. PMID : 12405964.
- S. Matsuda, R. Hannen, K. Matsuda, N. Yamada, T. Tubbs, and M. Yuzaki. The c-terminal juxtamembrane region of the delta 2 glutamate receptor controls its export from the endoplasmic reticulum. *Eur. J. Neurosci.*, 19(7) :1683–1690, Apr. 2004. ISSN 0953-816X. doi : 10.1111/j.1460-9568.2004.03307.x. PMID : 15078542.
- J. Mattis, K. M. Tye, E. A. Ferenczi, C. Ramakrishnan, D. J. O’Shea, R. Prakash, L. A. Gunaydin, M. Hyun, L. E. Fenno, V. Gradinaru, O. Yizhar, and K. Deisseroth. Principles for applying optogenetic tools derived from direct comparative analysis of microbial opsins. *Nat. Methods*, 9(2) :159–172, Feb. 2012. ISSN 1548-7105. doi : 10.1038/nmeth.1808. PMID : 22179551.
- N. Mechawar, K. C. Watkins, and L. Descarries. Ultrastructural features of the acetylcholine innervation in the developing parietal cortex of rat. *J. Comp. Neurol.*, 443(3) :250–258, Feb. 2002.
- K. Meller, W. Breipohl, and P. Glees. Synaptic organization of the molecular and the outer granular layer in the motor cortex in the white mouse during postnatal development. a golgi- and electronmicroscopical study. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, 92(2) :217–231, 1968. ISSN 0340-0336. PMID : 4907210.
- A. Mercer, D. C. West, O. T. Morris, S. Kirchhecker, J. E. Kerkhoff, and A. M. Thomson. Excitatory connections made by presynaptic cortico-cortical pyramidal cells in layer 6 of the neocortex. *Cereb. Cortex*, 15(10) :1485–1496, Oct. 2005.
- G. E. Meredith and F. G. Wouterlood. Hippocampal and midline thalamic fibers and terminals in relation to the choline acetyltransferase-immunoreactive neurons in nucleus accumbens of the rat : a light and electron microscopic study. *The Journal of comparative neurology*, 296(2) :204–221, June 1990. ISSN 0021-9967. doi : 10.1002/cne.902960203. PMID : 2358532.
- M. M. Mesulam, E. J. Mufson, B. H. Wainer, and A. I. Levey. Central cholinergic pathways in the rat : an overview based on an alternative nomenclature (ch1-ch6). *Neuroscience*, 10 (4) :1185–1201, Dec. 1983. ISSN 0306-4522. PMID : 6320048.

- M. M. Mesulam, L. B. Hersh, D. C. Mash, and C. Geula. Differential cholinergic innervation within functional subdivisions of the human cerebral cortex : a choline acetyltransferase study. *The Journal of comparative neurology*, 318(3) :316–328, Apr. 1992. ISSN 0021-9967. doi : 10.1002/cne.903180308. PMID : 1374768.
- H. S. Meyer, V. C. Wimmer, M. Oberlaender, C. P. J. de Kock, B. Sakmann, and M. Helmstaedter. Number and laminar distribution of neurons in a thalamocortical projection column of rat vibrissal cortex. *Cereb. Cortex*, 20(10) :2277–2286, Oct. 2010. ISSN 1460-2199. doi : 10.1093/cercor/bhq067. PMID : 20534784.
- M. Mieda and T. Sakurai. Bmal1 in the nervous system is essential for normal adaptation of circadian locomotor activity and food intake to periodic feeding. *J. Neurosci.*, 31(43) : 15391–15396, Oct. 2011. ISSN 1529-2401. doi : 10.1523/JNEUROSCI.2801-11.2011. PMID : 22031885.
- B. Minke, C. Wu, and W. L. Pak. Induction of photoreceptor voltage noise in the dark in drosophila mutant. *Nature*, 258(5530) :84–87, Nov. 1975. ISSN 0028-0836. PMID : 810728.
- E. Miura, T. Iijima, M. Yuzaki, and M. Watanabe. Distinct expression of cb1n family mRNAs in developing and adult mouse brains. *Eur. J. Neurosci.*, 24(3) :750–760, Aug. 2006. doi : 10.1111/j.1460-9568.2006.04950.x. URL <http://dx.doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04950.x>.
- A. W. Moreau, M. Amar, N. Le Roux, N. Morel, and P. Fossier. Serotonergic fine-tuning of the excitation-inhibition balance in rat visual cortical networks. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 20(2) :456–467, Feb. 2010. ISSN 1460-2199. doi : 10.1093/cercor/bhp114. PMID : 19520765.
- C. Morel, L. Fattore, S. Pons, Y. A. Hay, F. Marti, B. Lambolez, M. De Biasi, M. Lathrop, W. Fratta, U. Maskos, and P. Faure. Nicotine consumption is regulated by a human polymorphism in dopamine neurons. *Molecular psychiatry*, Dec. 2013. ISSN 1476-5578. doi : 10.1038/mp.2013.158. PMID : 24296975.
- R. Morison and E. Dempsey. A study of thalamo-cortical relations. *Am J Physiol*, 135 : 281–292, 1942.
- M. Moroni, R. Zwart, E. Sher, B. K. Cassels, and I. Bermudez. alpha4beta2 nicotinic receptors with high and low acetylcholine sensitivity : pharmacology, stoichiometry, and sensitivity to long-term exposure to nicotine. *Mol. Pharmacol.*, 70(2) :755–768, Aug. 2006. doi : 10.1124/mol.106.023044. URL <http://dx.doi.org/10.1124/mol.106.023044>.
- G. Moruzzi and H. W. Magoun. Brain stem reticular formation and activation of the EEG. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 1(4) :455–473, Nov. 1949.
- J. Motohashi, W. Kakegawa, and M. Yuzaki. Ho15J : a new hotfoot allele in a hot spot in the gene encoding the delta2 glutamate receptor. *Brain Res.*, 1140 :153–160, Apr. 2007. ISSN 0006-8993. doi : 10.1016/j.brainres.2006.03.068. PMID : 16647695.
- L. Mrzljak, A. I. Levey, and P. S. Goldman-Rakic. Association of m1 and m2 muscarinic receptor proteins with asymmetric synapses in the primate cerebral cortex : morphological evidence for cholinergic modulation of excitatory neurotransmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(11) :5194–5198, June 1993. ISSN 0027-8424. PMID : 8389473 PMCID : PMC46682.

- L. Mrzljak, M. Pappy, C. Leranth, and P. S. Goldman-Rakic. Cholinergic synaptic circuitry in the macaque prefrontal cortex. *The Journal of comparative neurology*, 357(4) :603–617, July 1995. ISSN 0021-9967. doi : 10.1002/cne.903570409. PMID : 7673486.
- C. I. O. Myme, K. Sugino, G. G. Turrigiano, and S. B. Nelson. The NMDA-to-AMPA ratio at synapses onto layer 2/3 pyramidal neurons is conserved across prefrontal and visual cortices. *J. Neurophysiol.*, 90(2) :771–779, Aug. 2003. ISSN 0022-3077. doi : 10.1152/jn.00070.2003. PMID : 12672778.
- G. Nagel, D. Ollig, M. Fuhrmann, S. Kateriya, A. M. Musti, E. Bamberg, and P. Hegemann. Channelrhodopsin-1 : a light-gated proton channel in green algae. *Science*, 296 (5577) :2395–2398, June 2002. ISSN 1095-9203. doi : 10.1126/science.1072068. PMID : 12089443.
- G. Nagel, T. Szellas, W. Huhn, S. Kateriya, N. Adeishvili, P. Berthold, D. Ollig, P. Hegemann, and E. Bamberg. Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100(24) :13940–13945, Nov. 2003. ISSN 0027-8424. doi : 10.1073/pnas.1936192100. PMID : 14615590.
- B. Nanda, A. Galvan, Y. Smith, and T. Wichmann. Effects of stimulation of the centromedian nucleus of the thalamus on the activity of striatal cells in awake rhesus monkeys. *Eur. J. Neurosci.*, 29(3) :588–598, Feb. 2009. doi : 10.1111/j.1460-9568.2008.06598.x. URL <http://dx.doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06598.x>.
- P. Naur, K. B. Hansen, A. S. Kristensen, S. M. Dravid, D. S. Pickering, L. Olsen, B. Vestergaard, J. Egebjerg, M. Gajhede, S. F. Traynelis, and J. S. Kastrop. Ionotropic glutamate-like receptor delta2 binds d-serine and glycine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104(35) :14116–14121, Aug. 2007. ISSN 0027-8424. doi : 10.1073/pnas.0703718104. PMID : 17715062.
- M. E. Nelson, A. Kuryatov, C. H. Choi, Y. Zhou, and J. Lindstrom. Alternate stoichiometries of alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors. *Mol. Pharmacol.*, 63(2) :332–341, Feb. 2003. ISSN 0026-895X. PMID : 12527804.
- H. Niki. Prefrontal unit activity during delayed alternation in the monkey. i. relation to direction of response. *Brain research*, 68(2) :185–196, Mar. 1974a. ISSN 0006-8993. PMID : 4363757.
- H. Niki. Prefrontal unit activity during delayed alternation in the monkey. II. relation to absolute versus relative direction of response. *Brain research*, 68(2) :197–204, Mar. 1974b. ISSN 0006-8993. PMID : 4363758.
- J. Olszewski. *The thalamus of Maccaca mulata. An atlas for use with stereotaxic instruments*. Basel : Karger, 1952.
- S. Ostojic. Two types of asynchronous activity in networks of excitatory and inhibitory spiking neurons. *Nature neuroscience*, Feb. 2014. ISSN 1546-1726. doi : 10.1038/nn.3658. PMID : 24561997.
- G. Paolone, C. S. Mallory, A. Koshy Cherian, T. R. Miller, R. D. Blakely, and M. Sarter. Monitoring cholinergic activity during attentional performance in mice heterozygous for the choline transporter : a model of cholinergic capacity limits. *Neuropharmacology*, 75 : 274–285, Dec. 2013. ISSN 1873-7064. doi : 10.1016/j.neuropharm.2013.07.032. PMID : 23958450 PMCID : PMC3865115.
- R. L. Papke and J. S. Thinschmidt. The correction of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor

- concentration-response relationships in xenopus oocytes. *Neurosci. Lett.*, 256(3) :163–166, Nov. 1998. ISSN 0304-3940. PMID : 9855365.
- A. Papoutsi, K. Sidiropoulou, V. Cutsuridis, and P. Poirazi. Induction and modulation of persistent activity in a layer v PFC microcircuit model. *Front Neural Circuits*, 7 :161, 2013. ISSN 1662-5110. doi : 10.3389/fncir.2013.00161. PMID : 24130519 PMCID : PMC3793128.
- M. Parent and A. Parent. Single-axon tracing and three-dimensional reconstruction of centre median-parafascicular thalamic neurons in primates. *The Journal of comparative neurology*, 481(1) :127–144, Jan. 2005. ISSN 0021-9967. doi : 10.1002/cne.20348. PMID : 15558721.
- A. Parker, M. J. Eacott, and D. Gaffan. The recognition memory deficit caused by mediodorsal thalamic lesion in non-human primates : a comparison with rhinal cortex lesion. *The European journal of neuroscience*, 9(11) :2423–2431, Nov. 1997. ISSN 0953-816X. PMID : 9464936.
- Q. Perrenoud, J. Rossier, H. Geoffroy, T. Vitalis, and T. Gallopin. Diversity of GABAergic interneurons in layer VIa and VIb of mouse barrel cortex. *Cereb. Cortex*, 23(2) :423–441, Feb. 2013. doi : 10.1093/cercor/bhs032. URL <http://dx.doi.org/10.1093/cercor/bhs032>.
- M. Persike, M. Zimmermann, J. Klein, and M. Karas. Quantitative determination of acetylcholine and choline in microdialysis samples by MALDI-TOF MS. *Analytical chemistry*, 82 (3) :922–929, Feb. 2010. ISSN 1520-6882. doi : 10.1021/ac902130h. PMID : 20058877.
- A. Peters and E. G. Jones. *Cerebral cortex, Vol.1 Cellular Components of the Cerebral Cortex*. Plenum, 1984.
- L. Petreanu, T. Mao, S. M. Sternson, and K. Svoboda. The subcellular organization of neocortical excitatory connections. *Nature*, 457(7233) :1142–1145, Feb. 2009. ISSN 1476-4687. doi : 10.1038/nature07709. PMID : 19151697.
- C. Peyron, D. K. Tighe, A. N. van den Pol, L. de Lecea, H. C. Heller, J. G. Sutcliffe, and T. S. Kilduff. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J. Neurosci.*, 18(23) :9996–10015, Dec. 1998. ISSN 0270-6474. PMID : 9822755.
- C. Peyron, J. Faraco, W. Rogers, B. Ripley, S. Overeem, Y. Charnay, S. Nevsimalova, M. Aldrich, D. Reynolds, R. Albin, R. Li, M. Hungs, M. Pedrazzoli, M. Padigaru, M. Kucherlapati, J. Fan, R. Maki, G. J. Lammers, C. Bouras, R. Kucherlapati, S. Nishino, and E. Mignot. A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains. *Nat. Med.*, 6(9) :991–997, Sept. 2000. ISSN 1078-8956. doi : 10.1038/79690. PMID : 10973318.
- J. R. Phillips, K. O. Johnson, and S. S. Hsiao. Spatial pattern representation and transformation in monkey somatosensory cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(4) :1317–1321, Feb. 1988. ISSN 0027-8424. PMID : 3422492 PMCID : PMC279758.
- R. B. Poorthuis, B. Bloem, M. B. Verhoog, and H. D. Mansvelder. Layer-specific interference with cholinergic signaling in the prefrontal cortex by smoking concentrations of nicotine. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 33 (11) :4843–4853, Mar. 2013. ISSN 1529-2401. doi : 10.1523/JNEUROSCI.5012-12.2013. PMID : 23486955.

- J. T. Porter, B. Cauli, J. F. Staiger, B. Lambolez, J. Rossier, and E. Audinat. Properties of bipolar VIPergic interneurons and their excitation by pyramidal neurons in the rat neocortex. *Eur. J. Neurosci.*, 10(12) :3617–3628, Dec. 1998.
- J. T. Porter, B. Cauli, K. Tsuzuki, B. Lambolez, J. Rossier, and E. Audinat. Selective excitation of subtypes of neocortical interneurons by nicotinic receptors. *J. Neurosci.*, 19 (13) :5228–5235, July 1999.
- J. T. Porter, C. K. Johnson, and A. Agmon. Diverse types of interneurons generate thalamus-evoked feedforward inhibition in the mouse barrel cortex. *J. Neurosci.*, 21(8) :2699–2710, Apr. 2001. ISSN 1529-2401. PMID : 11306623.
- J. J. Prieto and J. A. Winer. Layer VI in cat primary auditory cortex : Golgi study and sublaminal origins of projection neurons. *J. Comp. Neurol.*, 404(3) :332–358, Feb. 1999.
- R. Quinonez and R. E. Sutton. Lentiviral vectors for gene delivery into cells. *DNA Cell Biol.*, 21(12) :937–951, Dec. 2002. ISSN 1044-5498, 1557-7430. doi : 10.1089/104454902762053873. URL <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/104454902762053873>.
- J. Ramirez-Latorre, C. R. Yu, X. Qu, F. Perin, A. Karlin, and L. Role. Functional contributions of alpha5 subunit to neuronal acetylcholine receptor channels. *Nature*, 380(6572) :347–351, Mar. 1996.
- J. Ren, C. Qin, F. Hu, J. Tan, L. Qiu, S. Zhao, G. Feng, and M. Luo. Habenula "cholinergic" neurons co-release glutamate and acetylcholine and activate postsynaptic neurons via distinct transmission modes. *Neuron*, 69(3) :445–452, Feb. 2011. ISSN 1097-4199. doi : 10.1016/j.neuron.2010.12.038. PMID : 21315256.
- P. Rigas and M. A. Castro-Alamancos. Thalamocortical up states : differential effects of intrinsic and extrinsic cortical inputs on persistent activity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(16) :4261–4272, Apr. 2007. ISSN 1529-2401. doi : 10.1523/JNEUROSCI.0003-07.2007. PMID : 17442810.
- P. Rigas and M. A. Castro-Alamancos. Impact of persistent cortical activity (up states) on intracortical and thalamocortical synaptic inputs. *J. Neurophysiol.*, 102(1) :119–131, July 2009. ISSN 0022-3077. doi : 10.1152/jn.00126.2009. PMID : 19403750 PMCID : PMC2712261.
- J.-M. Rigo, C. I. Badiu, and P. Legendre. Heterogeneity of postsynaptic receptor occupancy fluctuations among glycinergic inhibitory synapses in the zebrafish hindbrain. *J. Physiol. (Lond.)*, 553(Pt 3) :819–832, Dec. 2003. ISSN 0022-3751. doi : 10.1113/jphysiol.2003.049577. PMID : 14500774.
- A. F. Sadikot and R. Sasseville. Neurogenesis in the mammalian neostriatum and nucleus accumbens : parvalbumin-immunoreactive GABAergic interneurons. *The Journal of comparative neurology*, 389(2) :193–211, Dec. 1997. ISSN 0021-9967. PMID : 9416916.
- A. F. Sadikot, A. Parent, and C. François. Efferent connections of the centromedian and parafascicular thalamic nuclei in the squirrel monkey : a PHA-L study of subcortical projections. *The Journal of comparative neurology*, 315(2) :137–159, Jan. 1992a. ISSN 0021-9967. doi : 10.1002/cne.903150203. PMID : 1372010.
- A. F. Sadikot, A. Parent, Y. Smith, and J. P. Bolam. Efferent connections of the centromedian and parafascicular thalamic nuclei in the squirrel monkey : a light and electron

- microscopic study of the thalamostriatal projection in relation to striatal heterogeneity. *The Journal of comparative neurology*, 320(2) :228–242, June 1992b. ISSN 0021-9967. doi : 10.1002/cne.903200207. PMID : 1619051.
- S. Safieddine and R. J. Wenthold. The glutamate receptor subunit delta1 is highly expressed in hair cells of the auditory and vestibular systems. *J. Neurosci.*, 17(19) :7523–7531, Oct. 1997. ISSN 0270-6474. PMID : 9295397.
- T. Sakurai, A. Amemiya, M. Ishii, I. Matsuzaki, R. M. Chemelli, H. Tanaka, S. C. Williams, J. A. Richardson, G. P. Kozlowski, S. Wilson, J. R. Arch, R. E. Buckingham, A. C. Haynes, S. A. Carr, R. S. Annan, D. E. McNulty, W. S. Liu, J. A. Terrett, N. A. Elshourbagy, D. J. Bergsma, and M. Yanagisawa. Orexins and orexin receptors : a family of hypothalamic neuropeptides and g protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*, 92(5) : 1 page following 696, Mar. 1998.
- M. V. Sanchez-Vives and D. A. McCormick. Cellular and network mechanisms of rhythmic recurrent activity in neocortex. *Nat. Neurosci.*, 3(10) :1027–1034, Oct. 2000. doi : 10.1038/79848. URL <http://dx.doi.org/10.1038/79848>.
- M. Sarter, V. Parikh, and W. M. Howe. Phasic acetylcholine release and the volume transmission hypothesis : time to move on. *Nat. Rev. Neurosci.*, 10(5) :383–390, May 2009. doi : 10.1038/nrn2635. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nrn2635>.
- S. M. Schmid and M. Hollmann. To gate or not to gate : are the delta subunits in the glutamate receptor family functional ion channels? *Mol. Neurobiol.*, 37(2-3) :126–141, June 2008. ISSN 0893-7648. doi : 10.1007/s12035-008-8025-0. PMID : 18521762.
- S. M. Schmid, S. Kott, C. Sager, T. Huelsken, and M. Hollmann. The glutamate receptor subunit delta2 is capable of gating its intrinsic ion channel as revealed by ligand binding domain transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(25) :10320–10325, June 2009. ISSN 1091-6490. doi : 10.1073/pnas.0900329106. PMID : 19506248 PMCID : PMC2700928.
- D. Schubert, R. Kötter, K. Zilles, H. J. Luhmann, and J. F. Staiger. Cell type-specific circuits of cortical layer IV spiny neurons. *J. Neurosci.*, 23(7) :2961–2970, Apr. 2003. ISSN 1529-2401. PMID : 12684483.
- P. Séguéla, J. Wadiche, K. Dineley-Miller, J. A. Dani, and J. W. Patrick. Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain alpha 7 : a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 13(2) :596–604, Feb. 1993. ISSN 0270-6474. PMID : 7678857.
- K. Z. Shen and S. W. Johnson. A slow excitatory postsynaptic current mediated by g-protein-coupled metabotropic glutamate receptors in rat ventral tegmental dopamine neurons. *Eur. J. Neurosci.*, 9(1) :48–54, Jan. 1997. ISSN 0953-816X. PMID : 9042568.
- F. J. Sigworth. The variance of sodium current fluctuations at the node of ranvier. *J. Physiol. (Lond.)*, 307 :97–129, Oct. 1980. ISSN 0022-3751. PMID : 6259340.
- G. Silberberg and H. Markram. Disynaptic inhibition between neocortical pyramidal cells mediated by martinotti cells. *Neuron*, 53(5) :735–746, Mar. 2007. ISSN 0896-6273. doi : 10.1016/j.neuron.2007.02.012. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896627307001110>.
- G. Silberberg, A. Gupta, and H. Markram. Stereotypy in neocorti-

- cal microcircuits. *Trends in Neurosciences*, 25(5) :227–230, May 2002. ISSN 0166-2236. doi : 10.1016/S0166-2236(02)02151-3. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166223602021513>.
- G. Silberberg, S. Grillner, F. E. LeBeau, R. Maex, and H. Markram. Synaptic pathways in neural microcircuits. *Trends in Neurosciences*, 28(10) :541–551, Oct. 2005. ISSN 0166-2236. doi : 10.1016/j.tins.2005.08.004. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166223605002122>.
- A. M. Sillito and J. A. Kemp. Cholinergic modulation of the functional organization of the cat visual cortex. *Brain Res.*, 289(1-2) :143–155, Dec. 1983. ISSN 0006-8993. PMID : 6661640.
- J. Simonnet, E. Eugène, I. Cohen, R. Miles, and D. Fricker. Cellular neuroanatomy of rat presubiculum. *Eur. J. Neurosci.*, 37(4) :583–597, Feb. 2013. ISSN 1460-9568. doi : 10.1111/ejn.12065. PMID : 23176296.
- J. F. Smiley, F. Morrell, and M. M. Mesulam. Cholinergic synapses in human cerebral cortex : an ultrastructural study in serial sections. *Experimental neurology*, 144(2) :361–368, Apr. 1997. ISSN 0014-4886. doi : 10.1006/exnr.1997.6413. PMID : 9168836.
- C.-H. Song, J.-X. Xia, J.-N. Ye, X.-W. Chen, C.-Q. Zhang, Q.-C. Zhang, E.-Q. Gao, and Z.-A. Hu. Signaling pathways of hypocretin-1 actions on pyramidal neurons in the rat prefrontal cortex. *Neuroreport*, 16(13) :1529–1533, Sept. 2005. ISSN 0959-4965. PMID : 16110284.
- J. F. Staiger, I. Flagmeyer, D. Schubert, K. Zilles, R. Kötter, and H. J. Luhmann. Functional diversity of layer IV spiny neurons in rat somatosensory cortex : quantitative morphology of electrophysiologically characterized and biocytin labeled cells. *Cereb. Cortex*, 14(6) : 690–701, June 2004.
- M. Steriade, D. A. McCormick, and T. J. Sejnowski. Thalamocortical oscillations in the sleeping and aroused brain. *Science*, 262(5134) :679–685, Oct. 1993. ISSN 0036-8075. PMID : 8235588.
- Y.-G. Sun, J. D. Pita-Almenar, C.-S. Wu, J. J. Renger, V. N. Uebele, H.-C. Lu, and M. Beierlein. Biphasic cholinergic synaptic transmission controls action potential activity in thalamic reticular nucleus neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 33(5) :2048–2059, Jan. 2013. ISSN 1529-2401. doi : 10.1523/JNEUROSCI.3177-12.2013. PMID : 23365242 PMCID : PMC3711637.
- H. A. Swadlow. Fast-spike interneurons and feedforward inhibition in awake sensory neocortex. *Cereb. Cortex*, 13(1) :25–32, Jan. 2003. ISSN 1047-3211. PMID : 12466212.
- B. Tahvildari, M. Wölfel, A. Duque, and D. A. McCormick. Selective functional interactions between excitatory and inhibitory cortical neurons and differential contribution to persistent activity of the slow oscillation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 32(35) :12165–12179, Aug. 2012. ISSN 1529-2401. doi : 10.1523/JNEUROSCI.1181-12.2012. PMID : 22933799 PMCID : PMC3466092.
- C. Takayama, S. Nakagawa, M. Watanabe, M. Mishina, and Y. Inoue. Light- and electron-microscopic localization of the glutamate receptor channel delta 2 subunit in the mouse purkinje cell. *Neurosci. Lett.*, 188(2) :89–92, Mar. 1995. ISSN 0304-3940. PMID : 7792064.
- C. Takayama, S. Nakagawa, M. Watanabe, M. Mishina, and Y. Inoue. Developmental changes in expression and distribution of the glutamate receptor channel delta 2 subunit according

- to the purkinje cell maturation. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, 92(2) :147–155, Apr. 1996. ISSN 0165-3806. PMID : 8738121.
- A. Taly, P.-J. Corringer, D. Guedin, P. Lestage, and J.-P. Changeux. Nicotinic receptors : allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. *Nature reviews. Drug discovery*, 8(9) :733–750, Sept. 2009. ISSN 1474-1784. doi : 10.1038/nrd2927. PMID : 19721446.
- G. Tamás, J. Szabadics, A. Lörincz, and P. Somogyi. Input and frequency-specific entrainment of postsynaptic firing by IPSPs of perisomatic or dendritic origin. *Eur. J. Neurosci.*, 20(10) :2681–2690, Nov. 2004. ISSN 0953-816X. doi : 10.1111/j.1460-9568.2004.03719.x. PMID : 15548211.
- A. M. Thomson and J. Deuchars. Synaptic interactions in neocortical local circuits : dual intracellular recordings in vitro. *Cereb. Cortex*, 7(6) :510–522, Sept. 1997. ISSN 1047-3211. PMID : 9276176.
- A. M. Thomson and O. T. Morris. Selectivity in the inter-laminar connections made by neocortical neurones. *J. Neurocytol.*, 31(3-5) :239–246, 2002.
- S. Tolu, R. Eddine, F. Marti, V. David, M. Graupner, S. Pons, M. Baudonnat, M. Husson, M. Besson, C. Reperant, J. Zemdegs, C. Pagès, Y. A. H. Hay, B. Lambolez, J. Caboche, B. Gutkin, A. M. Gardier, J.-P. Changeux, P. Faure, and U. Maskos. Co-activation of VTA DA and GABA neurons mediates nicotine reinforcement. *Mol. Psychiatry*, 18(3) :382–393, Mar. 2013. ISSN 1476-5578. doi : 10.1038/mp.2012.83. PMID : 22751493.
- J. Torres-Reveron and M. J. Friedlander. Properties of persistent postnatal cortical subplate neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(37) :9962–9974, Sept. 2007. ISSN 1529-2401. doi : 10.1523/JNEUROSCI.1536-07.2007. PMID : 17855610.
- J.-M. Tournier and P. Birembaut. Nicotinic acetylcholine receptors and predisposition to lung cancer. *Current opinion in oncology*, 23(1) :83–87, Jan. 2011. ISSN 1531-703X. doi : 10.1097/CCO.0b013e3283412ea1. PMID : 21045689.
- A. Tozzi, C. P. Bengtson, P. Longone, C. Carignani, F. R. Fusco, G. Bernardi, and N. B. Mercuri. Involvement of transient receptor potential-like channels in responses to mGluR-I activation in midbrain dopamine neurons. *The European journal of neuroscience*, 18(8) : 2133–2145, Oct. 2003. ISSN 0953-816X. PMID : 14622174.
- P. Trivedi, H. Yu, D. J. MacNeil, L. H. V. d. Ploeg, and X. M. Guan. Distribution of orexin receptor mRNA in the rat brain. *FEBS Lett.*, 438(1-2) :71–75, Oct. 1998.
- T. Tsunematsu, T. S. Kilduff, E. S. Boyden, S. Takahashi, M. Tominaga, and A. Yamanaka. Acute optogenetic silencing of orexin/hypocretin neurons induces slow-wave sleep in mice. *J. Neurosci.*, 31(29) :10529–10539, July 2011. ISSN 1529-2401. doi : 10.1523/JNEUROSCI.0784-11.2011. PMID : 21775598.
- P. Turrini, M. A. Casu, T. P. Wong, Y. De Koninck, A. Ribeiro-da Silva, and A. C. Cuello. Cholinergic nerve terminals establish classical synapses in the rat cerebral cortex : synaptic pattern and age-related atrophy. *Neuroscience*, 105(2) :277–285, 2001. ISSN 0306-4522. PMID : 11672595.
- T. Tömböl. *Cerebral cortex. Layer VI cells*. New York and London : Plenum, 1984.
- T. Uemura, H. Mori, and M. Mishina. Direct interaction of GluRdelta2 with shank scaffold

- proteins in cerebellar purkinje cells. *Molecular and cellular neurosciences*, 26(2) :330–341, June 2004. ISSN 1044-7431. doi : 10.1016/j.mcn.2004.02.007. PMID : 15207857.
- T. Uemura, S. Kakizawa, M. Yamasaki, K. Sakimura, M. Watanabe, M. Iino, and M. Mishina. Regulation of long-term depression and climbing fiber territory by glutamate receptor delta2 at parallel fiber synapses through its c-terminal domain in cerebellar purkinje cells. *J. Neurosci.*, 27(44) :12096–12108, Oct. 2007. ISSN 1529-2401. doi : 10.1523/JNEUROSCI.2680-07.2007. PMID : 17978051.
- T. Uemura, S.-J. Lee, M. Yasumura, T. Takeuchi, T. Yoshida, M. Ra, R. Taguchi, K. Sakimura, and M. Mishina. Trans-synaptic interaction of GluRdelta2 and neurexin through cb1n1 mediates synapse formation in the cerebellum. *Cell*, 141(6) :1068–1079, June 2010. ISSN 1097-4172. doi : 10.1016/j.cell.2010.04.035. PMID : 20537373.
- D. Umbriaco, K. C. Watkins, L. Descarries, C. Cozzari, and B. K. Hartman. Ultrastructural and morphometric features of the acetylcholine innervation in adult rat parietal cortex : an electron microscopic study in serial sections. *The Journal of comparative neurology*, 348(3) :351–373, Oct. 1994. ISSN 0021-9967. doi : 10.1002/cne.903480304. PMID : 7844253.
- W. M. Usrey and D. Fitzpatrick. Specificity in the axonal connections of layer VI neurons in tree shrew striate cortex : evidence for distinct granular and supragranular systems. *J. Neurosci.*, 16(3) :1203–1218, Feb. 1996.
- F. Valverde, M. V. Facal-Valverde, M. Santacana, and M. Heredia. Development and differentiation of early generated cells of sublayer VIb in the somatosensory cortex of the rat : a correlated golgi and autoradiographic study. *J. Comp. Neurol.*, 290(1) :118–140, Dec. 1989.
- E. Van der Gucht, S. Jacobs, T. Kaneko, F. Vandesande, and L. Arckens. Distribution and morphological characterization of phosphate-activated glutaminase-immunoreactive neurons in cat visual cortex. *Brain Res.*, 988(1-2) :29–42, Oct. 2003. ISSN 0006-8993. PMID : 14519524.
- Y. D. Van der Werf, M. P. Witter, and H. J. Groenewegen. The intralaminar and midline nuclei of the thalamus. anatomical and functional evidence for participation in processes of arousal and awareness. *Brain Res. Brain Res. Rev.*, 39(2-3) :107–140, Sept. 2002.
- R. P. Vertes. Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. *Neuroscience*, 142(1) :1–20, Sept. 2006. doi : 10.1016/j.neuroscience.2006.06.027. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.06.027>.
- R. P. Vertes, W. B. Hoover, A. C. Do Valle, A. Sherman, and J. J. Rodriguez. Efferent projections of reuniens and rhomboid nuclei of the thalamus in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 499(5) :768–796, Dec. 2006. doi : 10.1002/cne.21135. URL <http://dx.doi.org/10.1002/cne.21135>.
- F. Wang, V. Gerzanich, G. B. Wells, R. Anand, X. Peng, K. Keyser, and J. Lindstrom. Assembly of human neuronal nicotinic receptor alpha5 subunits with alpha3, beta2, and beta4 subunits. *J. Biol. Chem.*, 271(30) :17656–17665, July 1996. ISSN 0021-9258. PMID : 8663494.
- Q.-P. Wang, J.-L. Guan, T. Matsuoka, Y. Hirayana, and S. Shioda. Electron microscopic

- examination of the orexin immunoreactivity in the dorsal raphe nucleus. *Peptides*, 24(6) : 925–930, June 2003. ISSN 0196-9781. PMID : 12948846.
- X. J. Wang. Synaptic basis of cortical persistent activity : the importance of NMDA receptors to working memory. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 19(21) :9587–9603, Nov. 1999. ISSN 1529-2401. PMID : 10531461.
- X. J. Wang. Synaptic reverberation underlying mnemonic persistent activity. *Trends in neurosciences*, 24(8) :455–463, Aug. 2001. ISSN 0166-2236. PMID : 11476885.
- A. Wassef, J. Baker, and L. D. Kochan. GABA and schizophrenia : a review of basic science and clinical studies. *Journal of clinical psychopharmacology*, 23(6) :601–640, Dec. 2003. ISSN 0271-0749. doi : 10.1097/01.jcp.0000095349.32154.a5. PMID : 14624191.
- D. J. Watson, G. P. Kobinger, M. A. Passini, J. M. Wilson, and J. H. Wolfe. Targeted transduction patterns in the mouse brain by lentivirus vectors pseudotyped with VSV, ebola, mokola, LCMV, or MuLV envelope proteins. *Mol. Therapy*, 5(5) :528–537, 2002. ISSN 1525-0016. doi : 10.1006/mthe.2002.0584. URL <http://www.nature.com/mt/journal/v5/n5/full/mt200276a.html>.
- D. C. West, A. M. S. Kirchhecker, O. T. Morris, and A. M. Thomson. Layer 6 cortico-thalamic pyramidal cells preferentially innervate interneurons and generate facilitating EPSPs. *Cereb. Cortex*, 16(2) :200–211, Feb. 2006. doi : 10.1093/cercor/bhi098.
- E. L. White and M. P. Rock. A comparison of thalamocortical and other synaptic inputs to dendrites of two non-spiny neurons in a single barrel of mouse Sml cortex. *The Journal of comparative neurology*, 195(2) :265–277, Jan. 1981. ISSN 0021-9967. doi : 10.1002/cne.901950207. PMID : 7251926.
- E. L. White, E. Weinfeld, and D. L. Lev. Quantitative analysis of synaptic distribution along thalamocortical axons in adult mouse barrels. *The Journal of comparative neurology*, 479(1) :56–69, Nov. 2004. ISSN 0021-9967. doi : 10.1002/cne.20300. PMID : 15389615.
- K. Williams, M. Dattilo, T. N. Sabado, K. Kashiwagi, and K. Igarashi. Pharmacology of delta2 glutamate receptors : effects of pentamidine and protons. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 305(2) :740–748, May 2003. ISSN 0022-3565. doi : 10.1124/jpet.102.045799. PMID : 12606689.
- V. C. Wimmer, R. M. Bruno, C. P. J. de Kock, T. Kuner, and B. Sakmann. Dimensions of a projection column and architecture of VPM and POm axons in rat vibrissal cortex. *Cereb. Cortex*, 20(10) :2265–2276, Oct. 2010. ISSN 1460-2199. doi : 10.1093/cercor/bhq068. PMID : 20453248.
- U. H. Winzer-Serhan and F. M. Leslie. Expression of alpha5 nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNA during hippocampal and cortical development. *J. Comp. Neurol.*, 481(1) : 19–30, Jan. 2005. ISSN 0021-9967. doi : 10.1002/cne.20357. PMID : 15558717.
- R. A. Wise. Dopamine, learning and motivation. *Nature reviews. Neuroscience*, 5(6) :483–494, June 2004. ISSN 1471-003X. doi : 10.1038/nrn1406. PMID : 15152198.
- L. P. Wollmuth, T. Kuner, C. Jatzke, P. H. Seeburg, N. Heintz, and J. Zuo. The lurcher mutation identifies delta 2 as an AMPA/kainate receptor-like channel that is potentiated by ca(2+). *J. Neurosci.*, 20(16) :5973–5980, Aug. 2000. ISSN 0270-6474. PMID : 10934245.
- C. Wozny and S. R. Williams. Specificity of synaptic connectivity between layer 1 inhibitory interneurons and layer 2/3 pyramidal neurons in the rat neocortex. *Cereb. Cortex*, 21(8) :

- 1818–1826, Aug. 2011. ISSN 1460-2199. doi : 10.1093/cercor/bhq257. PMID : 21220765.
- J. Xia, X. Chen, C. Song, J. Ye, Z. Yu, and Z. Hu. Postsynaptic excitation of prefrontal cortical pyramidal neurons by hypocretin-1/orexin a through the inhibition of potassium currents. *Journal of neuroscience research*, 82(5) :729–736, Dec. 2005. ISSN 0360-4012. doi : 10.1002/jnr.20667. PMID : 16247802.
- J. X. Xia, S. Y. Fan, J. Yan, F. Chen, Y. Li, Z. P. Yu, and Z. A. Hu. Orexin a-induced extracellular calcium influx in prefrontal cortex neurons involves l-type calcium channels. *Journal of physiology and biochemistry*, 65(2) :125–136, June 2009. ISSN 1138-7548. PMID : 19886391.
- X. Xu, K. D. Roby, and E. M. Callaway. Immunochemical characterization of inhibitory mouse cortical neurons : three chemically distinct classes of inhibitory cells. *J. Comp. Neurol.*, 518(3) :389–404, Feb. 2010.
- R. Yadav, R. Rimerman, M. A. Scofield, and S. M. Dravid. Mutations in the transmembrane domain m3 generate spontaneously open orphan glutamate δ 1 receptor. *Brain research*, 1382 :1–8, Mar. 2011. ISSN 1872-6240. doi : 10.1016/j.brainres.2010.12.086. PMID : 21215726.
- A. Yamanaka, C. T. Beuckmann, J. T. Willie, J. Hara, N. Tsujino, M. Mieda, M. Tominaga, K. i. Yagami, F. Sugiyama, K. Goto, M. Yanagisawa, and T. Sakurai. Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice. *Neuron*, 38(5) :701–713, June 2003. ISSN 0896-6273. PMID : 12797956.
- M. Yamazaki, K. Araki, A. Shibata, and M. Mishina. Molecular cloning of a cDNA encoding a novel member of the mouse glutamate receptor channel family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 183(2) :886–892, Mar. 1992. ISSN 0006-291X. PMID : 1372507.
- J. Yan, C. He, J.-X. Xia, D. Zhang, and Z.-A. Hu. Orexin-a excites pyramidal neurons in layer 2/3 of the rat prefrontal cortex. *Neuroscience letters*, 520(1) :92–97, June 2012. ISSN 1872-7972. doi : 10.1016/j.neulet.2012.05.038. PMID : 22617634.
- M. Yuzaki. New insights into the structure and function of glutamate receptors : the orphan receptor delta2 reveals its family's secrets. *Keio J. Med.*, 52(2) :92–99, June 2003. ISSN 0022-9717. PMID : 12862360.
- A. Zarrinpar and E. M. Callaway. Local connections to specific types of layer VI neurons in the rat visual cortex. *J. Neurophysiol.*, 95(3) :1751–1761, Mar. 2006.
- D. X. Zhang and E. H. Bertram. Midline thalamic region : widespread excitatory input to the entorhinal cortex and amygdala. *J. Neurosci.*, 22(8) :3277–3284, Apr. 2002. ISSN 1529-2401. doi : 20026313. PMID : 11943829.
- F. Zhang, A. M. Aravanis, A. Adamantidis, L. de Lecea, and K. Deisseroth. Circuit-breakers : optical technologies for probing neural signals and systems. *Nat. Rev. Neurosci.*, 8(8) : 577–581, Aug. 2007. ISSN 1471-003X. doi : 10.1038/nrn2192. PMID : 17643087.
- F. Zhang, M. Prigge, F. Beyrière, S. P. Tsunoda, J. Mattis, O. Yizhar, P. Hegemann, and K. Deisseroth. Red-shifted optogenetic excitation : a tool for fast neural control derived from *volvox carteri*. *Nat. Neurosci.*, 11(6) :631–633, June 2008. ISSN 1097-6256. doi : 10.1038/nn.2120. PMID : 18432196.
- Z. Zhang, A. Reboreda, A. Alonso, P. A. Barker, and P. Séguéla. TRPC channels underlie cholinergic plateau potentials and persistent activity in entorhinal cor-

- tex. *Hippocampus*, 21(4) :386–397, Apr. 2011. doi : 10.1002/hipo.20755. URL <http://dx.doi.org/10.1002/hipo.20755>.
- Z. W. Zhang and M. Deschênes. Projections to layer VI of the posteromedial barrel field in the rat : a reappraisal of the role of corticothalamic pathways. *Cereb. Cortex*, 8(5) : 428–436, 1998.
- J. Zuo, P. L. De Jager, K. A. Takahashi, W. Jiang, D. J. Linden, and N. Heintz. Neurodegeneration in lurcher mice caused by mutation in delta2 glutamate receptor gene. *Nature*, 388(6644) :769–773, Aug. 1997. ISSN 0028-0836. doi : 10.1038/42009. PMID : 9285588.

Résumé

Au cours de cette thèse, j'ai cherché à comprendre comment trois structures impliquées dans la modulation des états de vigilance agissaient sur la dynamique du réseau cortical.

Les noyaux du thalamus non-spécifique sont impliqués dans le transfert d'informations contextuelles. À l'inverse, les noyaux spécifiques convoient des informations sensorielles vers le néocortex. Ces entrées sensorielles activent fortement les interneurons fast-spiking du cortex qui limite la durée de l'activation du réseau. À l'inverse, mes travaux montrent que les entrées contextuelles entraînent l'activation des interneurons lents, générant une activation prolongée du réseau cortical.

D'autre part, je me suis intéressée à la couche VIb du néocortex dont les neurones sont sensibles à deux modulateurs des états de vigilance : l'orexine et à l'acétylcholine. J'ai pu montrer que la couche VIb projette principalement dans les couches corticales infragranulaires où elle pourrait être servir d'amplificateur dépendant de l'orexine des entrées du thalamus non-spécifique.

Finalement, j'ai cherché à comprendre si la transmission nicotinique endogène était médiée par une synapse ou par transmission volumique. Pour cela, j'ai comparé les courants nicotiques reçus par les neurones des couches I et VI. Mes travaux mettent en évidence l'existence d'une synapse mixte comprenant des récepteurs $\alpha 4\beta 2$ et $\alpha 7$ dans la couche I et d'une synapse simple comprenant uniquement $\alpha 4\beta 2$ en couche VI. Ces synapses sont activées par la stimulation phasique des neurones cholinergiques. Néanmoins mes résultats suggèrent aussi l'existence de récepteurs $\alpha 4\beta 2$ extra-synaptiques activés par la libération tonique des fibres cholinergiques.

Summary

During my PhD, I investigated how three structures involved in the modulation of arousal states act on the dynamic of the cortical network.

Nuclei of the non-specific thalamus convey information on environmental and behavioral context, whereas specific nuclei relay sensory information to the neocortex. These sensory inputs activate strongly the fast-spiking interneurons of the neocortex that limits response duration of the network. Conversely, I showed that contextual inputs target mainly the slow adapting interneurons allowing a long-lasting activation of the cortical network.

I have also been interesting in the layer VIb of the neocortex whose neurons are sensitive to orexin and acetylcholine, two main modulators of the arousal states. I showed that layer VIb projects mainly onto infragranular cortical layers where its activation should act as an orexin-dependent amplifier of the non-specific thalamic inputs.

Finally, I tried to decipher whether the endogenous nicotinic transmission is mediated by a synapse or by volume transmission. To do that, I compared nicotinic currents received by layer I interneurons and layer VI pyramidal cells. I showed that nicotinic transmission is likely to be mediated by a mixed synapse comprising $\alpha 4\beta 2$ and $\alpha 7$ receptors in layer I and a simple $\alpha 4\beta 2$ containing synapse in layer VI. These synapses are activated by a phasic stimulation of the cholinergic fibers. However, my results also suggest that a tonic activation of these fibers recruits extra-synaptic $\alpha 4\beta 2$ receptors in both layer I and VI neurons.