

Université de Montréal

# **Modulation des neurones GABAergiques du mésencéphale ventral**

Par

François Michel

Département de pharmacologie

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor (Ph.D)  
en Sciences neurologiques

Octobre 2003

© François Michel, 2003



W  
4  
U58  
2004  
V.001

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Modulation des neurones GABAergiques du mésencéphale ventral**

Présentée par :  
François Michel

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Laurent Descarries, président-rapporteur  
Dr Louis-Eric Trudeau, directeur de recherche  
Dr Richard Warren, membre du jury  
Dr Angel Alonso, examinateur externe  
Dr Michel Bouvier, représentant du doyen de la FES

## Résumé

Le système dopaminergique central est au cœur de processus physiopathologiques comme la schizophrénie. Situé dans le mésencéphale ventral, il est principalement composé de neurones dopaminergiques mais également de neurones GABAergiques (environ 20 %). Ces cellules innervent localement les neurones dopaminergiques et en régulent l'activité. Cependant, la description physiologique des interneurons GABAergiques reste très sommaire. Le projet de cette thèse consistait donc à approfondir les connaissances des différentes modalités régulatrices qui régissent l'activité GABAergique au sein des noyaux dopaminergiques.

Le mésencéphale ventral reçoit de nombreuses afférences. En particulier, les neurones cholinergiques du tronc cérébral font majoritairement synapse sur les neurones GABAergiques. L'aspect fonctionnel de cette innervation préférentielle n'ayant pas été étudié, nous avons profité de notre modèle de culture primaire de neurones du mésencéphale ventral pour décrire les influences cholinergiques sur les neurones GABAergiques. Par ailleurs, le mode d'action des antipsychotiques reste en grande partie inexplicé. Nous avons étudié les effets de la clozapine (un antipsychotique atypique) sur les neurones GABAergiques pour en évaluer l'implication éventuelle dans les effets du médicament.

Au cours de ce travail, nous avons démontré que l'acétylcholine augmente le taux de décharge des neurones GABAergiques, tant par la stimulation des récepteurs nicotiniques que muscariniques. L'activation des derniers induit une légère dépolarisation des cellules GABAergiques sans en affecter la résistance membranaire. Ces effets sont fortement dépendants de la concentration de  $Ca^{2+}$  intracellulaire. La muscarine induirait une hausse de cette concentration par l'activation de canaux TRPC. Ces canaux sous-tendent un influx calcique depuis le milieu extracellulaire et sont indépendants du voltage et des stocks internes de  $Ca^{2+}$ . Des études pharmacologiques, immunocytochimiques ainsi que l'utilisation de cultures issues de souris transgéniques nous ont permis de conclure à

l'implication majoritaire du récepteur muscarinique M3 dans ces effets et, dans une moindre mesure, du récepteur M5. Pour finir, nous avons démontré que la clozapine diminue les courants synaptiques GABAergiques. Elle inhibe les récepteurs canaux GABA<sub>A</sub> à des concentrations compatibles avec les quantités que l'on pourrait retrouver dans le cerveau de schizophrènes sous traitement.

Ces résultats contribuent à une meilleure compréhension d'une population de neurones primordiaux dans la régulation du système dopaminergique central.

**Mots-clés** : Système dopaminergique, système cholinergique, patch clamp, imagerie calcique, récepteurs muscariniques, TRPC, culture primaire, culture micro-goutte, aire tegmentaire ventrale, substance noire.

## Abstract

The central dopaminergic system is implicated in many physiopathological processes such as schizophrenia. Located in the ventral mesencephalon, it is mainly composed of dopaminergic neurons and, to lesser extent, of GABAergic neurons (about 20 %). These latter cells locally impinge on dopaminergic neurons and regulate their activity. Nevertheless, the physiological description of these interneurons remains very partial. The overall objective of this thesis was therefore to increase our knowledge of some of the mechanisms that regulate mesencephalic GABAergic neurons.

The ventral mesencephalon is innervated by many nuclei. In particular, cholinergic neurons of the pons preferentially innervate GABAergic neurons. The functional role of this preferential innervation has not been determined. In this thesis, we therefore took advantage of a mesencephalic neuron primary culture system to study the influence of acetylcholine receptors on GABAergic neurons. Considering that the mechanism of action of antipsychotic drugs remains mostly unknown; we also studied the effect of clozapine (an atypical antipsychotic) on mesencephalic GABAergic neurons.

During this work, we demonstrated that acetylcholine increases the firing rate of GABAergic neurons, both through muscarinic and nicotinic receptor activation. Muscarinic receptor activation led to a mild depolarization without greatly affecting overall membrane resistance. These effects were largely  $[Ca^{2+}]_i$  dependent. We also discovered that muscarine increases  $[Ca^{2+}]_i$  through some receptor-operated channels which are likely to be TRPC channels. These channels underlie  $Ca^{2+}$  influx from the extracellular medium and are independent of voltage and internal  $Ca^{2+}$  stores. Using a pharmacological, immunocytochemical and transgenic approach, we concluded that M3 muscarinic receptors and to a lesser extent M5 receptors are the most likely to be implicated in these effects. Finally, we demonstrated that clozapine reduces GABA-mediated synaptic currents through inhibition of  $GABA_A$  receptors. This effect was obtained at drug concentrations that are therapeutically relevant and that could be found in the brain of schizophrenic patients.

Together, these new findings contribute to a better understanding of a population of neurons that are central to the regulation of the central dopaminergic system.

**Keywords :** Dopaminergic system, cholinergic system, patch-clamp, calcium imaging, muscarinic receptors, TRPC, primary culture, micro-dot culture, ventral tegmental area, substantia nigra.

## Résumé de vulgarisation

Les cellules nerveuses ou neurones se répartissent en deux catégories principales. Dans la première, elles traitent l'information par des connexions de neurone à neurone ; dans la seconde, par contre, les neurones ont plutôt un rôle régulateur global. Parmi cette dernière catégorie, certains neurones libèrent de la dopamine et d'autres de l'acétylcholine, qui sont des messagers chimiques. Les neurones à dopamine sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques tel que la schizophrénie. Situés à la base du cerveau, leur activité est régulée, entre autres, par des neurones qui libèrent un messenger inhibiteur, le GABA. Ces neurones inhibiteurs sont localisés au sein même des structures dopaminergiques, mais sont en plus faible nombre que les neurones dopaminergiques (environ 20 %). La description physiologique de ces neurones GABAergiques locaux est très sommaire ; c'est pourquoi nous nous sommes concentrés sur l'étude de leurs régulations, en particulier, par l'acétylcholine et la clozapine (un antipsychotique atypique).

Afin d'isoler les propriétés intrinsèques de ces neurones, nous avons utilisé des cultures de cellules directement issues de cerveaux de rats nouveau-nés. Ces cultures nous ont permis de mesurer l'effet de l'activation des deux familles de récepteurs à l'acétylcholine : les récepteurs nicotiques et muscariniques. Ces deux familles de récepteurs sont activées par le même messenger chimique, mais ont des structures moléculaires fondamentalement différentes. Grâce aux techniques d'électrophysiologie et d'imagerie calcique, nous avons démontré que ces récepteurs ont un effet excitateur sur les neurones GABAergiques. En particulier, l'activation des récepteurs muscariniques induit une hausse du calcium intracellulaire dont dépend l'augmentation de l'activité des neurones GABAergiques. Le calcium est un ion qui agit comme un messenger intracellulaire important. Dans le cadre de notre étude, nous avons démontré que l'activation de récepteurs muscariniques induit un influx de calcium à partir du milieu extracellulaire par des canaux ioniques qui traversent la membrane cellulaire. Ces canaux, de type TRPC, ne sont pas activés par des variations du potentiel membranaire, mais plutôt par des mécanismes qui

impliquent une enzyme (la protéine kinase C). Celle-ci fixe chimiquement des groupements phosphates sur les protéines à des sites précis et contribue ainsi à la régulation d'une multitude de cibles cellulaires. Des études pharmacologiques, des marquages sélectifs de protéines, ainsi que l'utilisation de cultures issues de souris transgéniques, nous ont permis de conclure à l'implication majoritaire du récepteur muscarinique M3 dans ces effets et, dans une moindre mesure, du récepteur M5. Pour finir, nous avons démontré que la clozapine diminue l'efficacité des récepteurs canaux au GABA à des concentrations compatibles avec les quantités que l'on pourrait retrouver dans le cerveau de schizophrènes sous traitement. Cet effet pourrait contribuer aux propriétés thérapeutiques et/ou aux effets secondaires de la clozapine.

L'ensemble de ces nouveaux résultats concourt à un approfondissement des connaissances d'une population de neurones jouant un rôle primordial dans la régulation du système dopaminergique central.

## Table des matières

|  |           |
|--|-----------|
| Résumé .....   | iii       |
| Abstract .....   | v         |
| Résumé de vulgarisation .....  | vii       |
| Table des matières.....  | ix        |
| Liste des tableaux.....  | xii       |
| Liste des figures .....  | xiii      |
| Liste des abréviations.....  | xiv       |
| Remerciements.....   | xviii     |
| <b>Introduction.....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>Chapitre 1. Système dopaminergique du mésencéphale ventral.....</b> | <b>6</b>  |
| 1. Organisation anatomique .....                                       | 6         |
| 2. Dopamine et récepteurs.....   | 13        |
| 3. Fonctions cognitives .....  | 15        |
| 4. Fonctions motrices .....  | 32        |
| 5. Conclusions .....   | 36        |
| <b>Chapitre 2. Système cholinergique du tronc cérébral .....</b>       | <b>37</b> |
| 1. Centres cholinergiques.....   | 37        |
| 2. Fonctions cognitives .....  | 37        |
| 3. Noyaux mésopontins cholinergiques et mésencéphale ventral.....      | 40        |
| 4. Récepteurs cholinergiques .....                                     | 43        |
| <b>Chapitre 3. Considérations méthodologiques .....</b>                | <b>48</b> |
| 1. Modèles d'études neuropharmacologiques.....                         | 48        |
| 2. Neurones du mésencéphale ventral en culture primaire .....          | 55        |
| 3. Patch-clamp.....  | 61        |
| 4. Mesure de la concentration intracellulaire de calcium.....          | 73        |
| <b>Problématique.....</b>  | <b>85</b> |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Résultats</b> .....   | 86  |
| Contribution des co-auteurs .....  | 88  |
| Article 1 : Regulation of rat mesencephalic GABAergic neurones through nicotinic and<br>muscarinic receptors.....  | 89  |
| Regulation of rat mesencephalic GABAergic neurones through nicotinic and<br>muscarinic receptors.....  | 90  |
| Summary .....  | 91  |
| Key words .....  | 91  |
| Introduction.....  | 92  |
| Methods.....   | 95  |
| Results.....   | 99  |
| Discussion .....   | 107 |
| Acknowledgements.....  | 114 |
| Figures.....   | 115 |
| Figure legends .....   | 123 |
| References.....  | 127 |
| Article 2 : Muscarinic receptors mediate Ca <sup>2+</sup> influx in rat mesencephalic GABAergic<br>neurons through PKC-dependent activation of receptor-operated channels..... | 134 |
| Summary .....  | 137 |
| Key words .....  | 137 |
| Introduction.....  | 138 |
| Methods.....   | 140 |
| Results.....   | 145 |
| Discussion .....   | 152 |
| Acknowledgments.....   | 157 |
| Figures.....   | 158 |
| Legends .....  | 166 |
| References.....  | 170 |

|  |            |
|--|------------|
| Article 3 : Clozapine inhibits synaptic transmission at GABAergic synapses<br>established by ventral tegmental area neurones in culture..... | 176        |
| Abstract .....   | 178        |
| Keywords .....   | 178        |
| Introduction.....  | 179        |
| Methods.....   | 181        |
| Results.....   | 182        |
| Discussion .....   | 185        |
| Acknowledgements:.....   | 187        |
| Figures.....   | 188        |
| Legends .....  | 191        |
| References.....  | 193        |
| <b>Discussion générale</b> .....   | <b>197</b> |
| 1. Rôles des neurones GABAergiques au sein du mésencéphale ventral. ....   | 198        |
| 2. Implication des récepteurs M3 .....   | 202        |
| 3. Régulation calcique des neurones GABAergiques .....   | 204        |
| 4. Implications des effets de la clozapine sur les récepteurs GABA <sub>A</sub> .....  | 214        |
| 5. Perspectives.....   | 215        |
| <b>Conclusion</b> .....  | <b>218</b> |
| <b>Bibliographie</b> .....   | <b>220</b> |

## Liste des tableaux

|  |    |
|--|----|
| Tableau 1 : Affinité des récepteurs muscariniques pour les molécules utilisées (en nM) ... | 47 |
| Tableau 2 : Description des différents anticorps utilisés lors de ce travail .....         | 84 |

## Liste des figures

|             |   |     |
|-------------|---|-----|
| Figure 1 :  | Voies DAergiques chez l'homme et le rat.....                                | 7   |
| Figure 2 :  | Ganglions de la base.....   | 33  |
| Figure 3 :  | Système cholinergique central chez l'humain .....                           | 39  |
| Figure 4 :  | Schéma des interactions cholinergico-DAergiques .....                       | 42  |
| Figure 5 :  | Photographies de cultures primaires de neurones du mésencéphale ventral.... | 57  |
| Figure 6 :  | Configurations pour les enregistrements de patch-clamp .....                | 62  |
| Figure 7 :  | Photographie d'une pipette de patch-clamp .....                             | 63  |
| Figure 8 :  | Schéma du dispositif expérimental d'enregistrement en patch-clamp .....     | 66  |
| Figure 9 :  | Exemple de trace du protocole d'enregistrement de l'AHP et de $R_m$ .....   | 72  |
| Figure 10:  | Structures chimiques du Fura-2 .....  | 74  |
| Figure 11 : | Spectre d'excitation du Fura-2 en fonction de la $[Ca^{2+}]_i$ .....        | 75  |
| Figure 12:  | Exemple de l'effet de la muscarine sur la $[Ca^{2+}]_i$ .....               | 78  |
| Figure 13 : | Régulations des neurones DAergiques de la SN.....                           | 201 |
| Figure 14 : | Modèles de l'activation des SOC .....                                       | 207 |
| Figure 15 : | Structure des canaux TRP .....  | 210 |
| Figure 16 : | Schéma du couplage entre RCPG et canaux TRP.....                            | 212 |
| Figure 17 : | Les neurones DAergiques expriment les TRPC1, 3, 5 et 6.....                 | 213 |

## Liste des abréviations

|               |   |
|---------------|---|
| ACh           | Acétylcholine   |
| AHP           | Afterhyperpolarisation (hyperpolarisation post potentiel d'action)  |
| AMPA          | $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxalone propionate   |
| AMPC          | Adénosine monophosphate cyclique  |
| ARNm          | Acide ribonucléique messenger   |
| ATV           | Aire tegmentaire ventrale   |
| $[Ca^{2+}]_i$ | Concentration de $Ca^{2+}$ intracellulaire  |
| CIF           | Calcium influx factor (Facteur d'influx calcique)   |
| CNQX          | Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione  |
| DA            | Dopamine  |
| DAG           | Diacyl glycérol   |
| DAT           | Transporteur de la dopamine   |
| DH $\beta$ E  | Dihydro- $\beta$ -érythroïdine  |
| DSM-IV        | Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux   |
| FUDR          | 5-Fluoro-2-deoxyuridine   |
| GAD           | Décarboxylase de l'acide glutamique   |
| GABA          | Acide $\gamma$ -aminobutyrique  |
| GFP           | Green fluorescente protein (Protéine fluorescente verte)  |
| GIRK          | G-protein gated inward rectifying $K^+$ channel (canal $K^+$ à rectification entrante activé par les protéines G) |
| GPI           | Globus pallidus latéral   |
| GPM           | Globus pallidus médian  |

|                   |   |
|-------------------|---|
| HVA               | Acide homovanillique  |
| I <sub>CRAC</sub> | Calcium Release-activated calcium current (Courants calciques induit par la relâche intracellulaire de calcium) |
| IP3               | Inositol tris-phosphate   |
| L-DOPA            | L-dihydroxyphénylalanine  |
| LDT               | Noyau latérodorsal tegmentaire  |
| M1, M2 ... M5     | Récepteur muscariniques de type 1, 2 ... 5  |
| M5-KO             | Lignée de souris dont le gène pour le récepteur muscarinique M5 n'est plus fonctionnel                          |
| MLA               | Methyllycaconitine  |
| NAc               | Noyau accumbens   |
| NMDA              | N-méthyl-D-aspartate  |
| PKA               | Protéine kinase A   |
| PKC               | Protéine kinase C   |
| PLC               | Phospholipase C   |
| PPT               | Noyau tegmentaire pédonculopontin   |
| PTAC              | ((5R,6R)6-(3-propylthio-1,2,5-thiadiazol-4-yl)-1-azabicyclo [3.2.1]octane)                                      |
| RCPG              | Récepteurs couplés aux protéines G  |
| REM               | Rapid eye movements (mouvements involontaires des yeux lors du sommeil paradoxal)                               |
| R <sub>m</sub>    | Résistance membranaire  |
| ROC               | Receptor-operated channels (Canaux activés par des récepteurs)  |
| SERCA             | Ca <sup>2+</sup> -ATPase du réticulum sarcoplasmique ou endoplasmique   |

|      |   |
|------|---|
| SN   | Substance noire   |
| SNC  | Substance noire compacte  |
| SNr  | Substance noire réticulée   |
| SNC  | Système nerveux central   |
| SOC  | Store operated-channels (Canaux activés par la libération des stocks internes de $\text{Ca}^{2+}$ ) |
| TEA  | Tetraethyl-amonium  |
| TH   | Tyrosine hydroxylase  |
| TRP  | Transient receptor potential  |
| TRPL | Transient receptor potential like   |
| TTX  | Térodotoxine  |
| VDCC | Canaux calciques dépendants du voltage  |

*La vie est d'une complexité inimaginable.  
Nous en connaissons si peu. Préservons la.*

## Remerciements

A tout seigneur tout honneur, je voudrais immensément remercier le Dr Louis-Éric Trudeau, pour son accueil dans son laboratoire en tant que premier thésard alors que notre premier contact s'est fait à plus de 5 000 Km, sa confiance en mes capacités, sa patience et sa disponibilité qui m'ont été fort utiles lorsque justement ces capacités me faisaient défaut. Je ne pourrais pas citer toutes les qualités scientifiques et humaines du Dr Trudeau sans devenir un peu "têteux", pourtant, je les ai toutes appréciées à leur juste valeur.

Mon passage à Montréal a été des plus enrichissants grâce à lui. Merci.

Je voudrais remercier Patrice "Paddy" Congar, complice dès les premières heures, notre compréhension mutuelle a créé une amitié qui durera, je l'espère, très longtemps. Premier post-doc du labo, Patrice a aplani bien des problèmes techniques avec bonne humeur et une implication totale pour le labo. J'ai beaucoup appris à son contact : un poste d'électrophysiologie n'est finalement composé que de boîtes reliées par des câbles... Il faut juste savoir qui fait quoi, comment et où !! Nos origines communes de "maudits français" expatriés ont sûrement contribué à notre complicité, notre retour en force de rapatriés ne saurait la changer. A bientôt Paddy !

Que serait cette thèse sans Marie-Josée Bourque ?? Sûrement un travail bien plus long et fastidieux et combien moins agréable. Son amitié et sa bonne humeur m'ont aidé au moins autant que ses compétences techniques et sa rigueur. Je garderai toujours un coin de la chaleur des Îles de la Madeleine dans mon cœur en attendant d'y aller "pour vrai".

Mes remerciements vont également à Isabel Jutras qui m'a fourni en cultures cellulaires une bonne partie de mon doctorat et qui a permis l'obtention de bon nombre des résultats présentés dans les articles de cette thèse.

L'ambiance d'un labo dépend pour beaucoup des âmes qui le hantent, aussi je voudrais remercier tout le monde pour l'aventure particulièrement agréable que j'ai passée dans ces lieux. La paire Annie/Claudia inséparable jusqu'à ce qu'Annie se mette en tête d'être la première étudiante diplômée du labo Trudeau, ce qu'elle fit haut la main ; Fannie : au moins aussi bavarde que moi ; Gabriel : "Le chum", sympa, serviable, intéressant et intéressé, j'espère qu'on se reverra (sauf si tu pars dans le grand nord !!) et puis la relève française : Deb et Greg et celle locale de Caro et Phil. A tous merci et bonne chance !

Je tiens à remercier toute la communauté neurobiologiste de l'Université de Montréal pour sa chaleur, sa compétence et les activités scientifiques ou non, qui ont enrichi mon séjour. Et tout particulièrement mes parrains les Drs Descarries et Robitaille qui m'ont aussi évalué pour mon pré-doc et font ainsi un peu partie de ce travail.

J'aimerais remercier le groupe de recherche en sciences neurologiques et la FES pour leur soutien financier qui a presque couvert la durée de ma thèse, ainsi que le Dr Galzi qui a pris le relais en m'acceptant comme post-doc alors que je n'avais pas complètement fini de rédiger ce mémoire.

Un merci également à Tanja Ouimet qui a joué un rôle central dans ma rencontre avec le Dr Trudeau et qui m'a beaucoup aidé moralement lors de mon DEA.

Une pensée pour Mlle Richerme, professeur de biologie de terminale, qui m'a instillé le goût de la physiologie et de l'enseignement. Sa rigueur et l'emploi du mot juste m'ont guidé jusqu'ici bien que je sois encore bien loin de ses compétences.

Pour finir, un grand merci à ma famille qui m'a encouragé sans hésiter à faire le grand saut et bien sûr à Coralie qui m'a supporté (dans les deux sens du terme) pendant les presque cinq années de ce marathon et qui m'a donné la joie d'avoir Chloé à nos côtés, cette demoiselle adorable qui a raccourci mes nuits mais qui me donne de l'amour au centuple !!!

# **Introduction**

Au cours du dernier siècle, le concept de neurosciences s'est peu à peu développé pour devenir une discipline de la biologie à part entière. En une centaine d'années, les neurosciences sont passées des balbutiements à l'un des fers de lance de la biologie moderne. Le XX<sup>ème</sup> siècle a été jalonné par des progrès constants dans la compréhension du fonctionnement du système nerveux central (SNC). L'étape primordiale coïncide avec le Prix Nobel de Camillo Golgi et Santiago Ramón y Cajal en 1906, qui enterra la théorie réticulaire du SNC pour confirmer enfin la théorie cellulariste et la doctrine neuronale. Jusqu'alors, le cerveau était le dernier organe pour lequel la controverse avait encore lieu et où le tout cellulaire n'était pas encore établi. La deuxième étape importante a été couronnée en 1936 par le prix Nobel décerné à Sir Henry H. Dale et Otto Loewi "pour leur découverte de la transmission chimique de l'influx nerveux". A la suite de ces étapes fondatrices, de nombreuses découvertes nous ont permis d'avoir une vision globale du fonctionnement du SNC de l'échelle moléculaire aux comportements des plus complexes. L'importance de l'évolution des techniques de biochimie, d'électrophysiologie ou d'imagerie, pour ne citer qu'elles, a permis cette révolution, comme l'atteste le prix Nobel 1991 de Erwin Neher et Bert Sakmann pour le développement du patch clamp et la compréhension que cette technique a apporté au fonctionnement des canaux ioniques. Cependant, la complexité du SNC est telle qu'il nous faut compartimenter et simplifier les axes d'approches afin de comprendre et de reconstruire un organe dont le fonctionnement se révèle des plus difficiles à appréhender dans sa totalité.

En première approche, nous poserons certains préliminaires se rapportant à notre étude : Le cortex cérébral, le thalamus et les ganglions de la base fournissent le substrat neurologique de la transformation de sensations et de mouvements simples en actes psychologiques et moteurs intégrés extrêmement complexes. Ces transformations se déroulent au travers de transferts ordonnés d'informations le long de voies en parallèles et en séries qui mènent à un réseau distribué à grande échelle. Les centaines de voies neurologiques qui contribuent à la formation de ce réseau peuvent être divisées en deux groupes principaux.

Un premier groupe contient des projections point à point (discrètes) telles que celles qui interconnectent individuellement les noyaux thalamiques à leurs cibles corticales. Le second groupe neuronal est formé de projections diffuses régulatrices qui innervent l'ensemble du SNC. Composées de noyaux relativement petits, ces structures régulatrices libèrent des monoamines comme neurotransmetteurs : dopamine (DA), noradrénaline, sérotonine, histamine ainsi que l'acétylcholine (ACh). Ces voies régulatrices sont moins impliquées dans la signification du contenu spécifique des expériences vécues que dans leurs influences générales et leurs impacts sur l'individu. Chacune de ces voies régulatrices est impliquée dans la modulation de comportements intégrés comme les émotions, la motivation ou l'état de vigilance. Au cours de notre étude, nous serons amenés à présenter deux de ces systèmes régulateurs, les systèmes dopaminergique (DAergique) et cholinergique.

Le SNC est un organe très organisé où il existe une relation indéniable entre structure et fonction. Cependant, au cours de l'histoire des neurosciences, cette notion a beaucoup évolué : au début du XIX<sup>ème</sup> siècle, Franz J. Gall a proposé une cartographie des différentes activités mentales, base de la phrénologie. C'est le mythe de la bosse des Maths. Malgré l'échec de sa théorie, il a été le premier à proposer l'étude de l'activité cérébrale basée sur l'hypothèse d'une fragmentation de cette activité en fonctions élémentaires. C'est Broca qui allait apporter la confirmation partielle des hypothèses de Gall, en 1861, avec l'étude anatomique post-mortem de certains patients. Il découvre le centre du langage (maintenant appelé aire de Broca) dans l'hémisphère gauche dont la lésion provoque une aphasie motrice (le patient parle un charabia incompréhensible, mais il comprend ce qu'on lui dit). Les thèses localisationnistes devaient, par la suite, être largement confirmées. Par exemple, un autre centre du langage (aire de Wernicke), celui de la compréhension cette fois a été décrit (aphasie de Wernicke : langage volubile avec des mots mais pas de phrases compréhensibles). On connaît au niveau du cortex les aires des systèmes sensoriels, des aires d'association, les aires motrices. Au niveau sous-cortical, on a localisé les zones de relais afférentes sensorielles et motrices. La parcellisation s'accroît, on connaît 32 zones dans le cortex visuel. Le système sensori-moteur est également un bon exemple de cette

régionalisation par les relations étroites entre certaines régions du cortex cérébral et du corps (homoculus de W. Penfield). En réalité, les processus complexes ne sont pas seulement localisés mais répartis en systèmes qui interagissent. Le système visuel comprendrait 12 étages successifs et approximativement 180 connexions entre aires visuelles ! Cette parcellisation est tellement imbriquée qu'une théorie d'équipotentialité a été proposée où toutes les zones du cerveau coopèrent pour une activité donnée et où l'ensemble des processus liés à des fonctions très intégrées comme la mémoire ou les représentations conscientes n'a pas trouvé de substrats localisés précisément. En fait, comme souvent lorsque plusieurs théories biologiques s'affrontent, c'est par le compromis que l'on trouve les meilleures explications. Nous en sommes arrivés à l'hypothèse connexionniste où un ensemble de réseaux de zones interconnectés sont responsables des différentes activités du cerveau. C'est à ce niveau qu'agissent les systèmes régulateurs tels que les systèmes DAergiques et cholinergiques qui vont moduler l'efficacité du transfert de l'information ou pondérer l'influence de telle ou telle information. L'étude approfondie des mécanismes de régulations qui régissent ces systèmes semble donc de la première importance. Le travail présenté ici a été effectué dans ce sens et nous espérons avoir apporté un supplément d'information permettant d'approfondir cette compréhension.

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes limités à l'étude des régulations du système DAergique. En particulier, à une sous population de neurones des noyaux DAergiques. Ces neurones libèrent de l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) un neurotransmetteur qui possède généralement un rôle inhibiteur. Ils peuvent activer des récepteurs canaux  $GABA_A$  qui sont perméables aux ions  $Cl^-$ . Comme nous en discuterons plus avant, ces neurones GABAergiques influencent fortement l'activité des neurones DAergique et la connaissance des mécanismes qui les régulent semble primordiale. Pourtant, peu d'études ont été effectuées sur ces cellules et l'immense majorité des études liées au système DAergique se sont concentrées exclusivement sur les propriétés des neurones DAergiques. Nous avons choisi de porter notre attention sur les neurones GABAergiques du mésencéphale ventral et sur leurs régulations par le système

cholinergique et les antipsychotiques. Nous allons donc présenter différents aspects du système DAergique, tant du point de vue physiologique que pathologique. Nous présenterons également quelques éléments sur le système cholinergique du tronc cérébral. Enfin, nous discuterons dans cette introduction des différentes techniques qui ont permis l'élaboration de ce travail. Cette première partie se poursuivra par trois articles de recherche qui rassemblent l'ensemble des résultats obtenus lors de cette thèse. Puis, nous finiront par une discussion générale sur ces articles et les implications fonctionnelles des résultats qui y sont présentés.

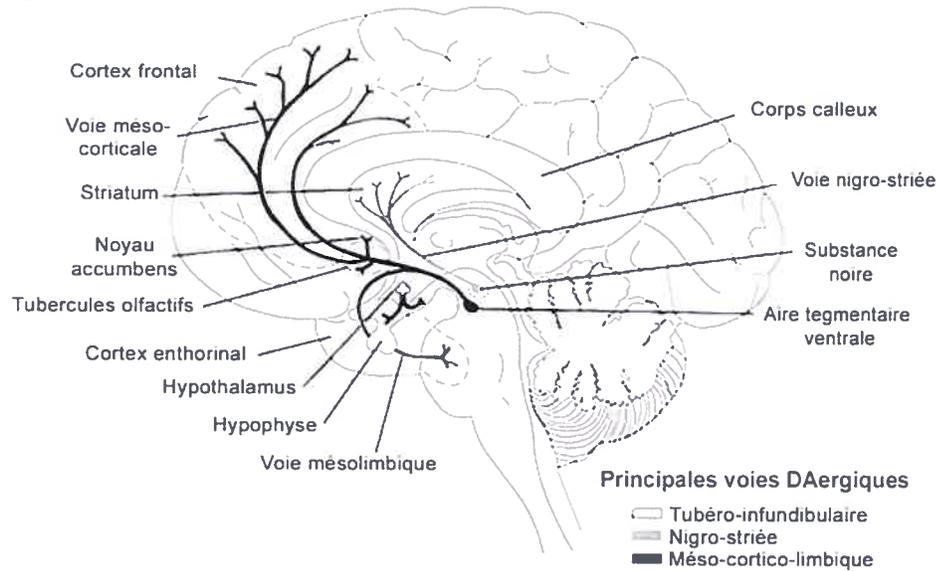
# Chapitre 1. Système dopaminergique du mésencéphale ventral

## 1. Organisation anatomique

Le système DAergique central regroupe principalement deux noyaux profondément intégrés à la base du système nerveux central. Ces noyaux sont l'aire tegmentaire ventrale (ATV), également appelée aire A10 et la substance noire (SN ; A9). A eux deux, ils regroupent la majeure partie des corps cellulaires des neurones DAergiques. D'autres populations de neurones DAergiques, le système tubéro-infundibulaire (A12) situé à la base de l'hypothalamus, et les neurones rétro-rubraux (proche du noyau rouge : A8) sont présents dans le SNC mais nous ne parlerons pas de ces populations dans le reste de ce manuscrit. En effet, bien qu'ils sous-tendent des fonctions importantes, ces neurones ne représentent qu'une faible minorité des neurones DAergiques du SNC (Figure 1) (Björklund et Lindvall 1984).

Le système DAergique forme un réseau en étroite interrelation dont le rôle est de contrôler harmonieusement l'intervention des systèmes intégrateurs qui traitent plusieurs modalités sensorielles et motrices (systèmes préfrontaux, septaux, amygdaliens et ganglions de la base) dans les processus cognitifs, attentionnels et émotionnels. Il est impliqué dans les conduites adaptées. D'une façon générale, la lésion du système DAergique provoque une perte des capacités d'initiation et d'adaptation. Le réseau DAergique est le site d'action primaire de nombreux agents psychoactifs : antipsychotiques, stupéfiants... Il reçoit de nombreuses afférences et agit comme système intégrateur.

A



B

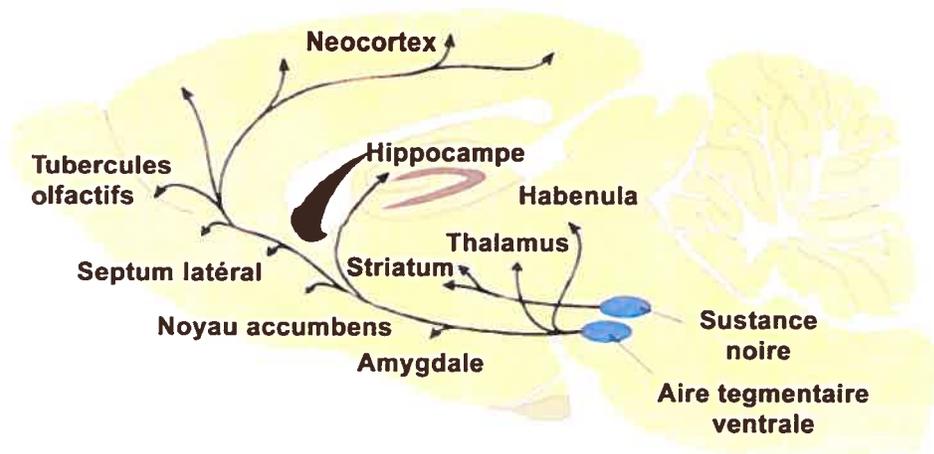


Figure 1 : Voies DAergiques chez l'homme et le rat

Les noyaux dopaminergiques du mésencéphale projettent leurs axones vers des structures rostrales par les voies : Nigro-striée, méso-limbique et méso-corticale. La première est impliquée dans la régulation motrice alors que les dernières influencent plutôt des processus cognitifs. Pour information, la voie tubéro-infundibulaire est indiquée chez l'homme (A). On peut voir que l'anatomie du système DAergique est très similaire entre ces deux espèces de mammifères malgré l'éloignement phylogénétique confirmant le rôle primordial de ce système dans le fonctionnement cérébral (A : Modifié de Crocker 1994 ; B : Modifié de Baer et al. 1997).

## 1.1 Aire tegmentaire ventrale

Initialement décrite chez l'opossum (Tsai 1925), l'ATV est située au centre de la partie ventrale du mésencéphale. Cette dernière est localisée dorsalement au noyau interpeduncularis et latéralement à la substance noire (Dahlström et Fuxe 1964). L'ATV se subdivise en deux compartiments, le noyau parabrachialis pigmentosus et le noyau paranigralis (Phillipson 1979). Les principales efférences de l'ATV innervent le noyau accumbens (NAc ou striatum ventral), le tubercule olfactif, le noyau septal, l'amygdale ainsi que d'autres régions associées au système limbique (Dahlström et Fuxe 1964; Ungerstedt 1971). Comme l'ATV innerve également le cortex préfrontal pour former la voie mésocorticale (Lindvall et al. 1974), ces deux systèmes sont souvent regroupés en système DAergique mésocorticolimbique, terme fréquemment utilisé pour décrire l'ensemble des voies DAergiques ascendantes issues de l'ATV (figure 1).

On retrouve deux populations de neurones dans l'ATV. En se basant sur des critères électrophysiologiques, on a tout d'abord fait référence à ces deux types de neurones comme étant les cellules principales et secondaires (Johnson et North 1992a). Les cellules du premier groupe correspondent aux neurones DAergiques. Elles sont hyperpolarisées par la DA, déchargent régulièrement autour de 1,7 Hz et la durée du potentiel d'action est de 0,9 ms. Lorsqu'ils sont hyperpolarisés expérimentalement, ces neurones développent un courant  $I_H$ . C'est un courant cationique entrant à cinétique lente qui va contribuer à repolariser les neurones DAergiques. Les cellules secondaires sont plutôt hyperpolarisées par la Met-Enkephaline et non par la DA. Elles développent des potentiels d'actions plus courts (0,5 ms) et n'expriment pas de courant  $I_H$ . L'identité des cellules du second groupe a été moins bien caractérisée, mais plusieurs études convergent vers un phénotype GABAergique. Ces neurones utiliseraient le GABA comme neurotransmetteur. En effet, il a été montré qu'une certaine proportion des cellules dans l'ATV sont immunoréactives pour le GABA (Bayer et Pickel 1991), la GABA transaminase, qui est l'enzyme qui métabolise le GABA (Nagai et al. 1983), ainsi que pour la décarboxylase de l'acide glutamique (GAD), qui est l'enzyme de synthèse du GABA (Fonnum et al. 1977; Mugnaini

et Oertel 1985). De plus, des études électrophysiologiques sur tranches d'ATV ont également démontré la présence de courants spontanés post-synaptiques GABAergiques sur les cellules DAergiques de l'ATV (Sugita et al. 1992; Johnson et North 1992a; Johnson et North 1992b), suggérant la présence de neurones GABAergiques intrinsèques à la tranche. Des études anatomiques suggèrent que les cellules GABAergiques constituent environ 15 à 20 % de la population totale des neurones de l'ATV (Mugnaini et Oertel 1985; Kalivas 1993) et ceux-ci seraient des neurones de projection et/ou des interneurones. En effet, des études récentes ont démontré que des neurones GABAergiques de l'ATV envoient des projections au niveau du NAc (Van Bockstaele et Pickel 1995) ainsi que du cortex préfrontal (Carr et Sesack 2000). Par contre, des données suggèrent également qu'un certain pourcentage de la population de neurones GABAergiques de l'ATV serait composé d'interneurones intrinsèques à cette structure (Johnson et North 1992a; Johnson et North 1992b). Il n'est pas exclu que ce soient les mêmes cellules qui émettent des branchements collatéraux et innervent les neurones DAergiques locaux et les cibles striato-corticales (Mailly et al. 2003). Nous pouvons donc voir que les neurones GABAergiques du mésencéphale ventral ne forment pas forcément une population homogène. En plus d'une régulation par des neurones intrinsèques, l'activité des neurones de l'ATV est également modulée par de nombreuses afférences provenant d'autres structures. Parmi celles-ci, on retrouve des afférences provenant de régions elles-mêmes innervées par l'ATV, entraînant la formation de boucle de rétro-contrôle, mais aussi des afférences de structures ne recevant pas de projections de l'ATV.

Des afférences excitatrices sur l'ATV proviennent principalement du cortex préfrontal (Beckstead 1979; Christie et al. 1985), de l'amygdale (Wallace 1989) et de l'habenula (Matsuda et Fujimura 1992). En ce qui concerne les afférences inhibitrices, celles-ci proviennent principalement du NAc (Walaas et Fonnum 1980; Yim et Mogenson 1980; Kalivas 1993), du pallidum ventral (Zahm 1989; Kalivas 1993), du septum latéral et de la bande diagonale de Broca (Kalivas 1993). Via ces projections, le GABA pourrait donc directement inhiber les cellules DAergiques de l'ATV, ou les exciter indirectement via une désinhibition des interneurones GABAergiques intrinsèques. Des études suggèrent que les

afférences GABAergiques externes à l'ATV effectueraient leurs actions inhibitrices via les récepteurs GABA<sub>B</sub>, tandis que les récepteurs GABA<sub>A</sub> médieraient l'action des interneurons GABAergiques intrinsèques à l'ATV (Sugita et al. 1992; Johnson et North 1992b). Bayer et Pickel (1991) ainsi que Smith et Bolam (1990) ont montré que les cellules DAergiques constituent les cibles principales des terminaisons immunoréactives pour le GABA dans l'ATV (50 à 70 % de tous les boutons synaptiques aboutissant sur les neurones DAergiques). D'un point de vue fonctionnel, un certain nombre de données suggèrent que les neurones DAergiques subissent une inhibition GABAergique tonique principalement à travers les récepteurs GABA<sub>A</sub> (Wolf et al. 1978; Steffensen et al. 1998; Westerink et al. 1998). Les interneurons GABAergiques intrinsèques à l'ATV auraient donc une action inhibitrice privilégiée sur les cellules DAergiques. Considérant le rôle important des synapses GABAergiques dans la régulation de l'activité des neurones DAergiques et l'implication probable de ces neurones dans la schizophrénie (Fuxe et al. 1975; Grace 1991), une meilleure compréhension de la modulation de ces interneurons serait donc particulièrement intéressante. Malheureusement, il n'y a qu'un très faible nombre de travaux publiés dans ce sens (Bonci et Williams 1997; Cameron et Williams 1993; 1994 et 1995; Wu et al. 1995) et aucun ne s'est concentré sur la modulation des synapses qu'établissent les interneurons GABAergiques sur les neurones DAergiques. Une raison possible de ce manque de données pourrait être d'ordre technique. En effets, il est très difficile de distinguer les courants synaptiques GABAergiques issus de l'activation d'afférences extrinsèques et intrinsèques au niveau d'une tranche de cerveau et encore plus *in vivo*. Ceci est particulièrement problématique dans un noyau comme l'ATV, qui n'est pas organisé en couches cellulaires comme le cortex ou l'hippocampe. L'étude électrophysiologique des neurones intrinsèques nécessite des enregistrements pairés de neurones. Il faut enregistrer deux neurones dont l'un au moins doit être GABAergique ce qui n'est pas trivial (voir considérations méthodologiques page 48). Notre modèle de culture primaire de neurones du mésencéphale ventral nous a permis de passer outre ces problèmes et d'étudier efficacement les neurones GABAergiques de cette partie du cerveau.

Enfin, l'activité des neurones de l'ATV est également influencée par des afférences sérotoninergiques provenant du noyau raphé (Vertes 1992), des afférences noradrénergiques provenant du locus cœruleus (Grenhoff et al. 1993), ainsi que des afférences cholinergiques provenant du noyau latérodorsal tegmentaire (LDT) et du noyau tegmentaire pédonculopontin (PPT) (Oakman et al. 1995). La description de ce dernier type d'innervation sera développée plus loin.

## 1.2 Substance noire

L'autre noyau DAergique principal est la substance noire (SN également nommée locus niger, substantia nigra ou aire mésencéphalique A9). L'ATV et la SN forment un continuum au sein du mésencéphale ventral. Il n'y a d'ailleurs pas de frontière nette entre ces deux noyaux et seules leurs innervations et leurs projections les différencient véritablement. Les neurones de la SN émettent des axones principalement vers le striatum dorsal (noyaux caudé et putamen) et participent au contrôle de la locomotion. Les voies issues de l'ATV et de la SN sont en partie parallèles et suivent une certaine continuité dorso-ventrale, du moins aux niveaux méso-striatal et méso-thalamique. Les drogues qui modifient le niveau de libération de DA dans le striatum affectent la motricité. Les neurones de la SN interviennent également dans les processus d'attention, d'intention et du contrôle de la motricité extra-pyramidale. Les signaux excitateurs d'origines corticale périlimbique, sensori-motrice et thalamique y convergent, sont intégrés et redistribués vers d'autres noyaux constituant un ensemble fonctionnel nommé ganglions de la base. Les ganglions de la base rassemblent différents noyaux sous-corticaux impliqués dans le contrôle de la locomotion, dont les principaux sont le striatum, le globus pallidus, le thalamus, le noyau sous-thalamique et la SN (voir section 4 : fonction motrices page 32). La régulation de la motricité est due à un équilibre entre des stimulations (glutamate et DA) et des inhibitions (GABA) qu'exercent les différents noyaux les uns sur les autres (Björklund et Lindvall 1984). Comme l'ATV, la SN reçoit des afférences GABAergiques intrinsèques et extrinsèques, glutamatergiques, sérotoninergiques, noradrénergiques et cholinergiques (Mereu et al. 1991 ; Lacey 1993). Les neurones GABAergiques intrinsèques

de la SN sont principalement regroupés dans la partie réticulée de la SN (SNr) alors que les neurones DAergiques sont, à l'inverse, surtout localisés dans la SN compacte (SNc). Cette séparation anatomique a été clairement décrite par Gonzalez-Hernandez et Rodriguez (2000). De plus, ces auteurs ont également démontré une certaine hétérogénéité dans ces populations puisque pas moins de 5 catégories différentes de neurones DAergiques et de neurones GABAergiques semblent coexister. Ces distinctions sont basées sur des marqueurs biochimiques comme l'expression de neuropeptides ou de protéines liant le  $Ca^{2+}$ . Cette hétérogénéité est à mettre en parallèle avec celle retrouvée dans l'ATV. Malgré cela, dans de nombreuses études fonctionnelles sur les neurones du mésencéphale ventral, les données en provenance de l'ATV et de la SN n'étaient pas significativement différentes et ont été rassemblées pour les analyses. Entre autres, leurs propriétés électrophysiologiques sont identiques tant pour les neurones DAergiques que pour les neurones GABAergiques (Lacey et al. 1989 ; Grace et Onn 1989 ; Yung et al 1991 ; Johnson et North 1992a). Les neurones DAergiques des deux structures sont hyperpolarisées par l'activation du récepteur D2 et sont insensibles aux agonistes opiacés alors que c'est l'inverse pour les neurones GABAergiques de la SN et de l'ATV (Lacey et al. 1989 ; Johnson et North 1992a). Finalement, d'autres études se sont concentrés sur la réactivité des neurones DAergiques aux antipsychotiques et ont tout de même réussi à démontrer des différences entre les neurones de la SN et de l'ATV (Chiodo et Bunney 1983 ; Hand et al. 1987). En fait, les antipsychotiques atypiques (la clozapine par exemple) injectés chez des rats de façon chronique ou aigue entraîne une baisse de l'activité des neurones de l'ATV exclusivement alors que les antipsychotiques classiques (halopéridol ou chlorpromazine) induisent cette baisse chez les neurones de l'ATV mais aussi de la SN.

Une caractéristique propre aux neurones de la SNr est leur implication dans des phénomènes de développement et de propagation de crises épileptiformes (Mc Namara 1984). L'injection de muscimol (un agonistes  $GABA_A$ ) au niveau de la SN à un effet anticonvulsivant et retarde la propagation de certaines crises épileptiformes (Okada et al. 1987)

## 2. Dopamine et récepteurs

### 2.1 La Dopamine

La DA est un neurotransmetteur de la famille des catécholamines. Comme toutes les catécholamines, le précurseur de la DA est la L-tyrosine qui est transportée à travers la barrière hémato-encéphalique. La première étape qui conduit à la synthèse de DA est la conversion de la tyrosine en L-dihydroxyphénylalanine (L-DOPA) par l'enzyme tyrosine hydroxylase (TH). Cette étape est primordiale et est très régulée car la TH est l'enzyme limitante dans la biosynthèse des catécholamines. L'activité de l'enzyme va donc refléter la vitesse de production de DA. La L-DOPA est ensuite rapidement décarboxylée en DA par la DOPA décarboxylase. A la suite de cette réaction, la DA peut être transformée en noradrénaline par la dopamine  $\beta$ -hydroxylase dans les cellules qui l'expriment (neurones noradrénergiques du Locus Cœruleus, par exemple) (Kuhar et al. 1999).

La libération de la DA peut s'effectuer au niveau des terminaisons synaptiques par le processus classique d'exocytose dépendant de l'activation des canaux calciques par les potentiels d'action ou bien au niveau somato-dendritique par un mécanisme qui reste à préciser mais qui impliquerait peut-être en partie le transporteur de la DA (DAT). Le mode de décharge des neurones DAergiques est, dans ce contexte, particulièrement important pour la régulation de la concentration de DA extracellulaire. L'inactivation du message DAergique se fera principalement par la recapture de la DA ambiante par le DAT. Après sa capture, la DA pourra être réutilisée ou bien dégradée. Le catabolisme de la DA est assuré par la monoamine oxydase et la catéchol-O-méthyltransférase. Ces enzymes conduisent à la formation d'acide homovanillique (HVA). Une mesure de l'activité DAergique centrale consiste à doser l'HVA dans des échantillons de liquide céphalo-rachidien ou *in situ* par microdialyse (Kuhar et al. 1999).

La VTA innerve l'ensemble du circuit de récompense. De ce fait, la DA s'est vue attribuer, à tort, le titre de neurotransmetteur du plaisir. Mais aujourd'hui, il est admis que la DA n'est qu'un élément, certes central, mais seulement un élément de la médiation de

l'affect positif. Elle ne pourrait être, en effet, la seule origine des sensations plaisantes parce qu'on sait que sa libération survient face à plusieurs types de stimulus, aussi bien positifs que négatifs (Rolls 2000). Elle ne peut donc expliquer à elle seule le plaisir puisqu'elle intervient même dans le contexte d'événements déplaisants. On pense actuellement que les neurones de l'ATV représentent plutôt une interface entre le système limbique et les systèmes moteurs. Ils opèrent dans les phénomènes de motivation et leur bon fonctionnement contribue à un comportement flexible.

## 2.2 Récepteurs dopaminergiques

La DA agit sur deux classes de récepteurs tous métabotropes : "D1-like" et "D2-like". Les D1-like (D1 et D5) sont couplés positivement à l'adényl cyclase via les protéines  $G_s$ . Ils induisent donc la production d'AMPc et l'activation subséquente de la protéine kinase A qui va déclencher la phosphorylation de ces nombreuses cibles potentielles. A l'inverse, les D2-like (D2, D3 et D4) sont couplés aux protéines  $G_{i/o}$  et inhibent la synthèse d'AMPc. Par ailleurs, ils facilitent l'ouverture de canaux  $K^+$  de type GIRK (canal  $K^+$  à rectification entrante activé par les protéines G) et entraînent donc une hyperpolarisation de la cellule (Kuhar et al 1999).

### 3. Fonctions cognitives

L'implication des neurones DAergiques dans différentes fonctions cognitives et motrices a été démontrée grâce à l'étude des pathologies mentales. En fait, et c'est valable pour les autres systèmes de neurotransmission, c'est par la compréhension des dérèglements pathologiques et leur traitements que l'on a le mieux compris le fonctionnement du système DAergique. Nous allons donc décrire les principales neuropathologies impliquant ce système. Nous verrons que, pour chacune, les neurones GABAergiques peuvent participer aux processus pathologiques ou pourraient intervenir dans leurs traitements.

#### 3.1 La schizophrénie

*Nous avons pensé qu'une présentation relativement exhaustive de cette pathologie est nécessaire à la bonne compréhension de ce travail de doctorat. En effet, le troisième article porte sur une étude de la clozapine, un antipsychotique atypique, alors que les deux autres articles portent sur la régulation cholinergique des neurones GABAergiques du mésencéphale ventral. Or celui-ci est le siège des neurones DAergiques qui ont été impliqués de longue date dans l'étiologie de la schizophrénie. Par ailleurs, il semble que le système cholinergique ait également un rôle dans certains symptômes de la maladie.*

Le terme *schizophrénie*, introduit la première fois par Bleuler en 1911, signifie littéralement conscience brisée. Des descriptions de cette maladie remontent aux premiers pas de la médecine et toutes les civilisations humaines ont comporté des "fous" et des "aliénés". La vision moderne de la schizophrénie correspond à un état pathologique caractérisé par une rupture de contact avec le monde ambiant et le retrait de la réalité. On y inclut un ensemble de syndromes psychopathologiques décrits dans le DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders - Fourth Edition) (Pearlson 2000). Le DSM-IV est le manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux utilisé par tous les médecins appelés à traiter des troubles mentaux et nerveux. Il contient pour chaque affection un code

et des critères diagnostiques qui favorisent le consensus et la communication entre les médecins, les chercheurs et les divers autres professionnels de la santé. L'absence de marqueurs biologiques fiables implique un diagnostic entièrement basé sur l'observation du comportement du sujet et sur le rapport d'expériences "anormales".

La maladie touche 1 % de la population mondiale. Il y a généralement une crise aiguë ouvertement psychotique à l'entrée dans la maladie. Elle apparaît avec l'adolescence et les premières années de l'âge adulte (15-25 ans) chez les hommes ; plus tardivement chez les femmes. La moyenne d'âge du premier épisode psychotique est de 20 ans. Le risque n'est pas influencé par le sexe et 50 % des patients schizophrènes vont faire une tentative de suicide (10 % vont la réussir). L'abus de stupéfiants est très fréquent chez les schizophrènes (Lewis et Lieberman 2000).

### **3.1.1 Symptômes**

Afin de confirmer un diagnostic de schizophrénie, les symptômes doivent être présents depuis plus de 6 mois, entraînant des dysfonctions sociales ou professionnelles, et présentant au moins 2 des critères suivants (DSM-IV) :

- Délires
- Hallucinations
- Langage désorganisé (déraillement ou incohérence)
- Comportement désorganisé (moteur et/ou social) ou catatonique (stupeur ou excitation)
- Symptômes négatifs (émoussement affectif, apathie, anhédonie, troubles de l'attention)
- Absence d'affections médicales ou de prise de substance pouvant expliquer les symptômes.

On y retrouve un ensemble de troubles regroupés en symptômes positifs, négatifs et discordants. Les patients ont généralement un mélange de symptômes positifs et négatifs. L'aspect clinique peut varier au cours du temps (épisodique ou continu, avec des symptômes entre les crises ou non) et, souvent, la maladie n'est pas reconnue par le patient (agnosognosie).

### 3.1.1.1 *Symptômes positifs*

Les symptômes positifs ont pour particularité d'être généralement évidents (pathologie psychotique grave), très variables en intensité et inconstants en durée et en terme de fréquence. Ils sont caractérisés par (Meltzer et Deutch 1999 ; Pearlson 2000) :

- des idées délirantes : il s'agit de convictions erronées constantes que le patient continue à considérer comme réelles même en présence de preuves démontrant le contraire. Par exemple des délires de persécution, mystique, paranoïaque... ;
- des hallucinations : ce sont des perceptions sensorielles qui ont leur source dans le cerveau de la personne plutôt qu'à l'extérieur. Plus fréquemment auditives, les hallucinations peuvent toucher toutes les modalités sensitives. Les idées délirantes et les hallucinations sont réelles pour le patient. C'est pourquoi ses comportements et sa conduite sont souvent incompréhensibles aux personnes saines ;
- d'autres troubles "positifs" : les personnes souffrant de schizophrénie peuvent être incapables de penser ou de communiquer de manière logique, avoir un affect inadapté (éclats de rire immotivés, variations brusques de l'humeur...) ou présenter des symptômes psychomoteurs (mimiques, paramimies...).

### 3.1.1.2 *Symptômes "négatifs"*

Les symptômes "négatifs" ont pour particularité d'être permanents, plus ou moins marqués, mais varient peu une fois installés. Ils sont caractérisés par (Meltzer et Deutch 1999 ; Pearlson 2000) :

- des troubles de l'attention et de la concentration ;
- des troubles de l'abstraction, du langage et du jugement ;
- des troubles de l'affectivité : désintérêt, défaut d'empathie ;
- des troubles de l'initiative : apathie, indécision ;
- des difficultés de communication sociale ;
- la pauvreté de la pensée voir même une absence d'idée.

Bien qu'elle ne touche pas à l'intelligence proprement dite de la personne, la schizophrénie occasionne souvent un certain nombre de déficits intellectuels qui perturbent notamment l'attention, la mémoire, l'apprentissage et le traitement de l'information. Ces déficits appelés "cognitifs" sont souvent présents dès le début de la maladie et diminuent la capacité de la personne à réagir avec son milieu de manière appropriée.

### 3.1.2 Étiologie

Les causes de la schizophrénie ne sont pas encore élucidées. Plusieurs facteurs jouent un rôle dans son apparition et son évolution. En général, on considère la schizophrénie comme un trouble résultant d'une interaction complexe entre une vulnérabilité biologique et psychologique d'une personne et le stress associé à son environnement (Mc Donald et Murray 2000).

La composante génétique de la schizophrénie est supportée par un ensemble d'études concernant l'hérédité. Si un membre d'une famille souffre de schizophrénie, les parents de premier degré (parents, frères, sœurs, enfants) présentent un risque de 6 à 17 % de développer la maladie, risque qui diminue avec l'éloignement filial. Les jumeaux dizygotes présentent une incidence de 15 à 17 %, tandis que cette dernière atteint presque 50 % chez les jumeaux monozygotes. Cette transmission n'obéit cependant pas aux règles de transmission mendélienne (des jumeaux monozygotes devraient avoir 100 % de concordance) ni au sexe, ce qui permet de conclure à une probable implication polygénique autosomale (Lewis et Lieberman 2000 ; Pearlson 2000). Ces données ont été largement confortées par des études d'adoption et montrent une influence primordiale des facteurs génétiques sur les facteurs environnementaux (chiffrés à environ 80 % pour l'hérédité et 20 % pour des causes extérieures) (Cannon et al. 2000). Cependant, l'hérédité n'est qu'un facteur prédisposant parmi toutes les causes possibles. La maladie peut survenir de manière sporadique. Certaines données semblent indiquer que des facteurs intra-utérins ou périnataux, comme des infections virales ou des complications lors de l'accouchement, pourraient accroître le risque que le fœtus développe un jour une schizophrénie. Ces facteurs sont reconnus pour perturber les fonctions cérébrales normales parce qu'ils peuvent nuire au processus de développement neurologique (Geddes et al. 1999 ; Tsuang et Owen 2002).

Il est établi que plusieurs régions du cerveau jouent un rôle dans la schizophrénie, notamment les lobes frontaux et temporaux ainsi que plusieurs centres sous-corticaux.

Deux théories principales ont été mises en avant : la théorie neurodéveloppementale et la théorie moléculaire. Ces deux types de théories ne s'excluent pas mutuellement.

### **3.1.3 Théorie neurodéveloppementale**

Elle postule que la schizophrénie est due à un ou plusieurs défauts dans le développement et/ou la maturation du SNC. Formuler cette hypothèse implique de mettre en évidence des lésions cérébrales dans la schizophrénie et si possible de les mettre en évidence avant le début de la psychose. La théorie neurodéveloppementale est basée sur des observations obtenues par les nouvelles techniques d'imagerie cérébrale (IRM, CT-scan, PET-scan...) histologiques et biochimiques. Les anomalies les plus fréquentes sont :

- une augmentation de la taille des ventricules cérébraux. Résultat répliqué de nombreuses fois et dont la mesure du rapport des volumes ventricule/cerveau est la plus pertinente,
- des atrophies préfrontales, temporo-lobiques, du corps calleux ou des structures sous-corticales qui témoignent de l'action de processus pathogéniques diffus et non focalisés,
- Les analyses microscopiques de coupes cérébrales mettent en évidence différents types d'altération dans la structure de l'architecture neuronale. Le cortex préfrontal et d'autres zones du cortex montrent une densité neuronale diminuée, se manifestant par une diminution de la taille des neurones, leur nombre restant inchangé, ainsi que des anomalies dans les couches cellulaires de ces mêmes régions (défaut de migration neuronale). Bien que significatifs dans différentes études, ces résultats sont peu généralisables car les effectifs sont faibles et les affections très disparates. Le caractère polygénique de la maladie a poussé certains chercheurs à suggérer que des mutations dans certains gènes importants pour le développement du SNC pourraient causer le problème développemental associé à la schizophrénie. D'autres pensent que la diminution du volume de l'hippocampe serait secondaire à une hypoxie ou une ischémie pré ou périnatale plutôt qu'une prédisposition génétique.

L'âge d'apparition des symptômes (fin de l'adolescence, début de l'âge adulte) et le délai d'apparition chez la femme confortent cette hypothèse neurodéveloppementale. La fin de l'adolescence correspond à une période importante de la maturation cérébrale. Le cerveau perd graduellement 40 % de ses connexions synaptiques (pruning) depuis l'enfance jusqu'au milieu de l'adolescence (Huttenlocher 1979; Huttenlocher et Dabholkar 1997 ; Huttenlocher et al 1982 ; pour revue voir Monk et al 2001). Les dernières aires cérébrales à subir ce pruning sont les aires préfrontales et associatives. Ce phénomène est plus tardif de quelques années chez la femme grâce au rôle protecteur des œstrogènes. Le schizophrène pourrait subir un pruning excessif ou aurait au départ un capital neuronal plus faible que la normale. Finalement, l'absence de gliose réactionnelle à la mort cellulaire (fibrose provenant de la réaction des astrocytes et d'autres cellules gliales), suggère l'implication d'un processus physiopathologique différent des maladies neurodégénératives comme les maladies d'Alzheimer ou de Parkinson, et plaide en faveur de la théorie neurodéveloppementale (Lewis et Lieberman 2000).

### **3.1.4 Théorie neurochimique**

Le premier modèle neurochimique fut proposé avec l'apparition des premiers traitements anti-psychotiques efficaces (chlorpromazine, 1952). Depuis lors, de nombreuses autres molécules sont apparues sur le marché pharmaceutique et ont permis l'élaboration de nouvelles théories. Les techniques d'analyses moléculaires et d'imageries ont fait avancer à grands pas les recherches concernant les neurotransmetteurs impliqués dans les dysfonctionnements cérébraux. La théorie DAergique, avancée depuis longtemps grâce aux premiers traitements neuroleptiques (neuroleptiques classiques) et confirmée, du moins partiellement par les recherches ultérieures, postule que la schizophrénie résulte d'un déséquilibre entre la DA corticale et sous-corticale (striatale). Les interactions entre le système glutamatergique et le système DAergique, ainsi que la réponse à certaines drogues antagonistes du récepteurs NMDA, comme la phencyclidine (induisant une psychose transitoire semblable à celle retrouvé dans la schizophrénie), ont conduit les chercheurs à envisager une seconde hypothèse: la théorie glutamatergique. D'autres théories impliquent l'ACh, la sérotonine...

### 3.1.4.1 Hypothèse dopaminergique

L'hypothèse DAergique a beaucoup évolué au cours de son histoire. Elle stipule que la schizophrénie résulte d'un dérèglement de l'activité DAergique (Carlsson et Lindqvist 1963). Très tôt, les chercheurs et cliniciens ont bien vu que l'efficacité et la puissance des antipsychotiques sont corrélées à leur capacité d'agir comme antagonistes des récepteurs D2 (Seeman et al. 1976). D'autre part, les drogues qui augmentent l'activité DAergique (comme les amphétamines) sont psychotomimétiques et certains malades ont un fort taux de récepteurs D2 occupés par la DA de façon continue (Laruelle et al. 1999 ; Abi-Dargham et al. 2000). La mesure de l'HVA plasmatique qui donne une indication des concentrations de DA dans le SNC. Ces dernières semblent reliées à la sévérité des symptômes et à la réponse aux traitements. Ce qui confirmerait une libération excessive de DA. Grace (1991) a proposé l'existence d'une hypofonction des terminaisons DAergiques corticales concomitante à une hyperfonction sous-corticale (striatale). Nous savons également qu'un faible lien génétique entre la maladie et le récepteur D3 à la DA a été établi (Griffon et al. 1996). Les récepteurs D1 pourraient aussi être impliqués dans les symptômes négatifs. En fait, tous les récepteurs à la DA (D1 à D5) sont susceptibles de jouer un rôle. La théorie DAergique est l'hypothèse neurochimique dominante mais trois problèmes majeurs peuvent être signalés : *i*) Les antagonistes de la DA sont efficaces dans le traitement de tous les patients psychotiques peu importe le diagnostic. On ne peut conclure que l'hyperactivité DAergique est spécifique à la schizophrénie. *ii*) Certains antipsychotiques atypiques ont plus d'affinité pour d'autres récepteurs que les DAergiques et sont plus efficaces dans leurs effets thérapeutiques (mais voir aussi la section dédiée aux antipsychotiques atypiques). *iii*) Les antagonistes DAergiques n'ont pas ou très peu d'effets sur les symptômes négatifs de la maladie.

En fait, l'implication du système DAergique mésocorticolimbique ne fait aucun doute mais les études effectuées à ce jour ne permettent pas de montrer si les dérèglements DAergiques sont secondaires ou bien s'ils sont le point de départ de la maladie. Il semble que ce soit la première hypothèse qui soit la plus probable (voir le modèle neurodéveloppemental). En tout état de cause, il est fort peu probable que nous trouvions

un traitement curatif de la schizophrénie, il faut donc développer des stratégies symptomatiques et le système DAergique reste une cible de choix.

#### 3.1.4.2 *Hypothèse cholinergique*

Moins populaire, cette hypothèse est intéressante car elle permet de mettre en évidence les relations privilégiés qui existent entre les systèmes DAergiques et cholinergiques. Principalement développée par Rajiv Tandon (Tandon et Greden 1989, Tandon et al. 1991, Tandon 1999 ; voir aussi Bymaster et al. 1999 et Yeomans 1995), elle a été remise de l'avant par la synthèse de nouvelles molécules touchant sélectivement les récepteurs muscariniques et ayant un fort potentiel antipsychotique. Les systèmes DAergiques et cholinergiques sont en interaction à différents niveaux : mésencéphale ventral, striatum et cortex préfrontal. Il n'est pas étonnant qu'un dérèglement de ces neurones soit proposé pour participer à certains aspects de la schizophrénie. Un déséquilibre entre les concentrations de DA et ACh serait à l'origine de certains des symptômes de la schizophrénie. Au niveau striatal, les interneurons cholinergiques participent au contrôle moteur et on traite souvent les effets extrapyramidaux par des médicaments anticholinergiques. L'activité des enzymes du métabolisme de l'acétylcholine semble altérée (Meltzer et Deutch 1999). Une étude a aussi montré que le nombre de neurones cholinergiques dans les noyaux du tronc cérébral est plus élevé chez les malades (Garcia-Rill et al. 1995). Finalement, des arguments pharmacologiques appuient également l'implication possible du système cholinergique dans la maladie. La clozapine a une très forte affinité pour les récepteurs muscariniques (de l'ordre du nanomolaire). De nouvelles molécules cholinergiques sont à l'étude, par exemple, le PTAC ((5R,6R)6-(3-propylthio-1,2,5-thiadiazol-4-yl)-1-azabicyclo[3.2.1]octane) qui est un agoniste partiel des récepteurs M2 et M4 et un antagoniste des récepteurs M1, 3 et 5. Cette drogue montre de nombreuses caractéristiques fonctionnelles proche des antipsychotiques dans les modèles animaux comportementaux pertinents pour la schizophrénie. Par exemple, le PTAC inhibe les réponses motrices induites par l'apomorphine (un agoniste DAergique) et inhibe la réponse de conditionnement d'évitement (Shannon et al. 1999 ; Rasmussen et al. 2000). Le PTAC active la décharge des neurones DAergiques de l'ATV mais pas de la substance noire

comme le fait la clozapine et enfin inhibe la production du gène précoce Fos induite par l'amphétamine (Bymaster et al. 1998 et 1999). Tous ces tests permettent d'évaluer la capacité à réguler les effets d'une fonction DAergique exacerbée. La spécificité du PTAC a été testée par l'ajout d'un antagoniste cholinergique qui annule complètement les effets de la molécule pour chaque série d'expériences.

Une partie des schizophrènes développent des REM (rapid eyes movements) très tôt dans leur sommeil (dans le premier quart d'heure) alors que ce phénomène est caractéristique du sommeil paradoxal et arrive plus tardivement dans la population générale. Ces patients ont habituellement des troubles sévères. Il a été démontré que les REM sont sous la dépendance des noyaux cholinergiques du tronc cérébral (Ch5 et Ch6). On pourrait donc faire un lien entre une sous-population de schizophrènes particulièrement atteints et une altération de ces noyaux cholinergiques. Enfin, des études anatomiques ont montré que les noyaux cholinergiques Ch5 et Ch6 innervent largement l'ATV et la SN (Oakman et al. 1995). De même, l'ajout de molécules qui agissent sur les récepteurs cholinergiques (nicotiniques et muscariniques) au niveau du mésencéphale ventral affecte l'activité des neurones DAergiques (Calabresi et al. 1989 ; Lacey et al. 1990). Ces interactions seront développées plus loin dans cette introduction. Nous pouvons d'ores et déjà conclure qu'au moins chez certains schizophrènes, le système cholinergique aurait une influence dans certains symptômes de la maladie.

L'ensemble des travaux de recherche exposés dans cette thèse porte sur les régulations des neurones GABAergiques du mésencéphale, et plus particulièrement sur les effets de l'activation des récepteurs muscariniques à l'ACh sur ces neurones. Nous pouvons voir que ces recherches, bien que fondamentales, pourraient apporter de nouveaux éléments dans la compréhension de la régulation du système DAergique et par la même de la schizophrénie.

Cette implication du système cholinergique en plus des systèmes DAergiques, sérotoninergiques ou glutamatergiques nous montre bien que la schizophrénie implique de

multiplés parties du cerveau et supporte une théorie d'un dérèglement global comme le suppose la théorie neurodéveloppementale.

#### *3.1.4.3 Théorie globale*

Weinberger (1987, 1995) propose un modèle explicatif global, qui prend en compte différentes observations (début chez le jeune adulte; sensibilité au stress; sensibilité aux neuroleptiques) et se décline en trois points :

- la maturation cérébrale joue un rôle critique ;
- les lésions prédominent aux niveaux préfrontal et temporo-limbique ;
- le système dopaminergique est impliqué.

Les lésions cérébrales sont un élément nécessaire mais non suffisant. Elles doivent donc se combiner avec les processus normaux de maturation du cerveau. Les deuxième et troisième décades de vie sont une période critique, elles correspondent à la maturation des fonctions préfrontales et au pic maximal d'activité DAergique. Les structures préfrontales seraient donc modulées par les projections DAergiques et inhibent en retour les noyaux DAergiques sous-corticaux (équilibre DAergique cortico-sous-cortical). Cet équilibre pourrait être perturbé dans la schizophrénie menant à une hyperactivité des neurones DAergiques sous-corticaux qui sous-tendrait les symptômes positifs et une hypoactivité des neurones corticaux qui sous-tendrait les symptômes négatifs. Le stress entraîne une demande accrue au cortex préfrontal et au système DAergique ce qui résulte en une accentuation du déséquilibre cortico-sous-cortical.

### 3.1.5 Traitement

#### 3.1.5.1 Antipsychotiques "classiques"

Les meilleurs résultats sont obtenus par la combinaison d'un traitement médicamenteux (antipsychotiques) et d'un traitement psychosocial. L'action des antipsychotiques a été mise en évidence en France et en Suisse dans les années 50 par Laborit, Delay et Denicker. Il s'agissait d'une véritable révolution car avant cela aucun traitement satisfaisant pour les schizophrènes n'était connu. En général, les antipsychotiques, s'avèrent efficaces pour contrôler les symptômes positifs de la schizophrénie mais sont quasiment inopérant contre les symptômes négatifs. Comme chaque patient réagit différemment aux antipsychotiques (et il en existe beaucoup), il est indispensable de trouver le médicament et la posologie adéquats pour chacun. En moyenne, l'amélioration d'un épisode aigu nécessite de quatre à six semaines. Il faudra encore une période de trois mois au moins pour ajuster la posologie et éventuellement modifier la médication. Après un premier épisode, il est préférable de poursuivre le traitement médicamenteux pendant un ou deux ans. A partir du second épisode, on continuera le traitement pendant au moins 5 ans. La durée du traitement dépend de l'analyse risques/avantages pour les patients. La décision de continuer ou d'arrêter le traitement devrait être basée sur une évaluation soigneuse et une discussion entre le médecin et son patient concernant la gravité et l'évolution de la maladie, les risques liés à une rechute (qui restent élevés) et les effets secondaires du traitement médicamenteux.

Les effets extrapyramidaux sont les effets secondaires les plus handicapants. Ils sont répartis en deux types : i) Les symptômes extrapyramidaux précoces qui apparaissent dans les premières semaines du traitement. Il s'agit essentiellement des dyskinésies aiguës (spasmes ou contractions involontaires des muscles de la face, du cou ou du tronc), de l'akathisie (envie incessante de bouger, de se balancer...), du parkinsonisme (engendrant tremblements et rigidité). ii) Les dyskinésies tardives qui se manifestent au plus tôt trois mois après le début du traitement. Elles sont heureusement plus rares car on a pu observer qu'elles pouvaient être irréversibles. Ces dyskinésies tardives sont caractérisées par des

mouvements hyperkinétiques involontaires et répétitifs qui touchent surtout la bouche et la langue, parfois le tronc et les membres. Dans tous ces cas, l'importance des symptômes est liée aux doses de neuroleptiques. Les effets secondaires les plus fréquents sont plutôt d'ordre moteur ou végétatif (production anormale de prolactine, prise de poids, dysfonctionnement sexuel, sécheresse de bouche...) et tous peuvent être améliorés par une diminution des doses, un changement de la molécule en cours ou par des traitements subséquents de type anticholinergiques. A long terme, les patients développent plus de symptômes négatifs et moins de symptômes positifs ; cela permet de diminuer les doses et donc les effets secondaires.

### *3.1.5.2 Antipsychotiques atypiques*

Les antipsychotiques atypiques rassemblent une classe hétérogène de molécules (amisulpride, clozapine, rispéridone, loxapine, zotépine...) efficaces dans le traitement de la schizophrénie. Leur appellation d'atypique vient du fait qu'ils génèrent peu d'effets extrapyramidaux. On pense que cette caractéristique pourrait venir du fait que ces molécules n'induisent pas de blocage par dépolarisation au niveau de la SN à l'inverse des antipsychotiques classiques (Chiodo et Bunney 1983 ; Hand et al. 1987 ; voir discussion). Le deuxième intérêt de ces molécules est leur efficacité générale. Bien qu'encore sujette à débat, on estime généralement que les antipsychotiques atypiques sont plus efficaces que les antipsychotiques classiques puisqu'ils ont la même efficacité sur les symptômes positifs et qu'ils sont souvent au moins aussi efficaces sinon plus que les antipsychotiques classiques dans le traitement des symptômes négatifs. On pense que ces caractéristiques viennent du fait que antipsychotiques atypiques bloquent les récepteurs 5HT<sub>2A</sub> avec une affinité nettement supérieure au blocage qu'ils exercent sur les récepteurs DAergiques D2. On peut voir cependant que ce n'est pas le cas de toutes ces molécules (par exemple l'amisulpride) et que, par ailleurs, les bloqueurs des récepteurs à la sérotonine n'ont aucun effet antipsychotique. Cependant, ces molécules sont encore trop récentes (et trop chères) pour être généralisées comme traitement en première intention sans risques. C'est pour cela qu'elles sont plutôt administrées à des patients qui répondent mal aux antipsychotiques

classiques (30 % des malades) ou dont les effets secondaires du traitement sont devenus insupportables.

Le cas de la clozapine est intéressant. Synthétisée en 1960, les essais cliniques commencent en 1972 aux États-Unis et sont arrêtés en 1975 car plusieurs cas d'agranulocytose se sont déclarés et mèneront au décès de huit personnes. L'agranulocytose est une diminution importante du nombre des globules blancs de l'organisme qui rend la personne vulnérable aux infections même bénignes. La reprise contrôlée des études cliniques en 1985 permet une mise sur le marché début 1990. Du fait des complications hématologiques potentielles, le traitement doit être accompagné de prise de sang hebdomadaire. D'autres effets secondaires sont également à noter comme les risques légèrement accrus de convulsions, une accélération du rythme cardiaque ou une augmentation de la salivation. Malgré cela, le ratio bénéfice/risque est très en faveur de cette molécule si le traitement est bien encadré et si le dosage est régulièrement ré-évalué. La dose thérapeutique se situe autour de 400 mg par jour (jusqu'à 900 mg) soit une concentration plasmatique au plateau de l'ordre de 350 µg/L (soit 1 µM). Cette concentration peut être plus élevée dans le SNC (jusqu'à 24 fois plus dans le cerveau de rat (Baldessarini et al. 1993) par phénomène d'accumulation comme nous en discutons dans le troisième article. Le profil pharmacologique de la clozapine est très particulier pour un agent thérapeutique puisque cette molécule a une forte affinité pour de nombreux récepteurs couplés aux protéines G : les récepteurs DAergiques (D4 en particulier) mais plus encore pour les récepteurs à la noradrénaline ( $\alpha 1$ ), les récepteurs muscariniques à l'ACh (M1) et à la sérotonine (5HT2 et 6) (Brunello et al. 1995). Chacune de ces cibles pourrait être impliquée dans les effets, bénéfiques ou non, de la clozapine. La complexité de ce profil complique l'étude du mode d'action de la clozapine. Lors de ce doctorat, nous avons testé les effets potentiels de la clozapine sur les neurones GABAergiques de l'ATV en culture. Nous sommes arrivés à la conclusion que ce médicament agit également comme un antagoniste des récepteurs GABA<sub>A</sub>.

Les derniers développements mis en avant par Kapur et Seeman (2001) suggèrent de façon très convaincante que les paramètres les plus importants pour qu'un

antipsychotique soit atypique sont le taux d'occupation des récepteurs D2 et la vitesse de dissociation de la molécule pour ce récepteur. Une molécule avec une constante de dissociation élevée va libérer le site de fixation de la DA rapidement. Ceci entraîne la possibilité pour la DA endogène d'activer le récepteur D2 pour maintenir une certaine fonctionnalité atténuée, de conserver ainsi un minimum d'activité DAergique et donc d'éviter les effets secondaires extrapyramidaux.

### **3.1.6 Conclusions**

La schizophrénie est une maladie psychiatrique invalidante qui touche au moins 1 % de la population générale dont 10 % se suicideront. L'étiologie de cette pathologie reste inconnue bien que plusieurs mécanismes soient proposés. L'aspect multifactoriel reste une des seules certitudes, la maladie implique des facteurs génétiques et environnementaux. Le modèle neurodéveloppemental est le plus intéressant car il permet d'intégrer la grande majorité des observations faites par le passé, en particulier l'implication du système DAergique et les changements morphologiques macro et microscopiques. Cependant, tant que nous n'aurons pas une meilleure vision de l'étiologie de la schizophrénie il sera très difficile d'améliorer le traitement de cette maladie de façon substantielle et rationnelle. La connaissance du mode d'action des antipsychotiques en général et de la clozapine en particulier est un préliminaire à fort potentiel pour mieux comprendre cette maladie. C'est dans ce contexte que nous avons testé les effets de la clozapine sur les neurones GABAergique du mésencéphale ventral. Les résultats de cette étude sont présentés dans le troisième article de cette thèse. L'implication du système DAergique dans l'étiologie ou les symptômes de la maladie n'est plus remise en doute. Des éclaircissements sur les modalités de régulation des neurones DAergiques pourraient également nous donner de nouvelles avenues thérapeutiques et il semble que la piste cholinergique soit prometteuse. Les travaux présentés dans les deux premiers articles de cette thèse donnent des résultats intéressants dans ce sens.

### 3.2 Dépendances aux drogues

Comme nous l'avons vu précédemment, le système DAergique fait partie intégrante du système de récompense. C'est ce système qui est affecté lorsqu'il y a dépendance. Les drogues d'abus comme la cocaïne, les opiacés, les amphétamines, le cannabis, le tabac et l'alcool stimulent la libération de DA ce qui induirait, au moins en partie, la dépendance. Toutes les étapes de la neurotransmission DAergique peut être affectées et conduire à l'hyperfonction DAergique. De façon intéressante, l'implication des neurones GABAergiques du mésencéphale dans les phénomènes de dépendance aux opiacés a été clairement démontrée.

D'après la définition de l'OMS, la dépendance est un syndrome où la consommation d'un produit devient une exigence supérieure à celle d'autres comportements auparavant d'importance maximale. La dépendance s'installe avec la répétition des prises de drogues et se caractérise par un besoin impérieux de la drogue qui conduit à sa recherche compulsive. La dépendance a deux facettes : physique et psychique. *i)* La composante physique impose au toxicomane de consommer de la drogue sous peine de ressentir des douleurs spécifiques du syndrome de manque (qui, sauf cas exceptionnel, n'est pas mortel malgré l'amplitude des douleurs ressenties). Elle peut disparaître après quelques jours. *ii)* La composante psychique est l'envie du toxicomane de recommencer à consommer. Elle est associée à une forte stimulation de l'encéphale par le système de renforcement/récompense et elle ne doit pas être négligée car elle est la cause de nombreuses rechutes dans la toxicomanie. Elle persiste pendant plusieurs années. Il est à noter que les hallucinogènes qui n'affectent pas le NAc n'ont pas de pouvoir addictif évident.

Au niveau neurologique, on sait que les dépendances impliquent l'ATV et le NAc qui sont au cœur du système de renforcement/récompense. En effet, des études de stimulation électrique intracrânienne effectuées chez le rat ont montré depuis longtemps que l'ATV et le NAc sont des structures du cerveau associées aux effets de récompense les plus forts (Olds et Olds 1963). Il n'est donc pas étonnant de constater que le système mésolimbique soit lié au phénomène de dépendance aux drogues d'abus (Wise 1996; Koob

et Le Moal 1997). Le mécanisme d'action de chacune des drogues d'abus n'est pas complètement élucidé. Par contre, les phénomènes menant à la dépendance aux opiacés ont en grande partie été décrits. En effet, Johnson et North (1992b) ont montré, à l'aide d'expériences d'électrophysiologie effectuées sur une préparation de tranches d'ATV, que les agonistes  $\mu$ -opioïdes inhibent l'activité des neurones GABAergiques de l'ATV. Des études de microdialyse *in vivo* ont également montré que l'injection de morphine dans l'ATV de rats conscients provoque une diminution de la concentration extracellulaire de GABA dans cette structure (Klitenick et al 1992). L'ensemble des modalités exactes de cette inhibition GABAergiques par les opiacés nécessite encore quelques éclaircissement. L'implication de canaux potassiques hyperpolarisants est établie mais d'autres mécanismes semblent également intervenir comme une altération de l'appareil sécrétoire en aval de l'activation des canaux calciques dépendant du voltage (Bergevin et al. 2002). Suite à ces observations, il a été établi que l'effet des opioïdes sur les neurones GABAergiques intrinsèques à l'ATV résulte en une désinhibition des neurones DAergiques, provoquant ainsi une augmentation de la transmission DAergique mésocorticolimbique (Gysling et Wang 1983; Johnson et North 1992b). Dernièrement, Laviolette et Van Der Kooy (2001) ont proposé un mécanisme de récompense indépendant des neurones DAergiques bien que situé au sein de l'ATV. Les neurones GABAergiques de l'ATV joueraient un rôle central dans ce nouveau circuit (Nader et al. 1997).

Ces mécanismes illustrent bien le fort potentiel régulateur des neurones GABAergiques du mésencéphale ventral et expliquent l'intérêt porté à ces neurones.

### **3.3 Autres pathologies mentales**

Beaucoup d'arguments plaident en faveur d'une neurobiologie propre de la dépression, fondée sur les systèmes noradrénergique et sérotoninergique. La biologie de la dépression n'est pas simple et tous les mécanismes d'action des antidépresseurs ne sont pas encore élucidés. En particulier, le rôle d'un dysfonctionnement DAergique a été négligé, ce qui peut paraître surprenant quand on examine le rôle central des voies DAergiques dans l'élaboration des comportements motivés. Un certain nombre d'états dépressifs s'accompagne d'un hypofonctionnement de la neurotransmission DAergique chez l'humain. La facilitation de la transmission DAergique a des effets antidépresseurs sur certains symptômes liés à l'élan vital ou la sensation de plaisir de vivre. L'argument le plus solide reste pharmacologique par l'efficacité bien établie des "antidépresseurs DAergiques" tels que l'amineptine et la nomifensine.

Divers autres syndrômes impliquent également des dérèglements du système DAergique. Par exemple, les troubles obsessionnels compulsifs, le trouble déficitaire de l'attention et de l'hyperactivité ou bien le syndrome Gilles de La Tourette, qui est un trouble neurologique où le sujet présente un désordre du mouvement caractérisé principalement par des tics moteurs et vocaux involontaires. Ici encore, une meilleure compréhension du système DAergique pourrait permettre de mieux préciser les cibles thérapeutiques potentielles et de développer des médicaments plus spécifiques pour ces pathologies.

## 4. Fonctions motrices

### 4.1 Ganglions de la base

Comme nous l'avons vu précédemment, la substance noire fait partie des ganglions de la base également nommés noyaux gris centraux (figure 2), qui regroupent des noyaux de neurones impliqués dans le contrôle extrapyramidal de la motricité : striatum (putamen, noyau caudé), le globus pallidus (séparé en globus pallidus médian et latéral : GPm et GPI respectivement), la SN et le noyau sous-thalamique. Certains auteurs y incluent également le thalamus. Les neurones GABAergiques, qu'ils soient intrinsèques (SNr) ou extrinsèques (Globus pallidus), ont une influence déterminante sur ce contrôle moteur et agissent à chaque niveau du circuit (figure 2). On peut aussi observer que le système cholinergique intervient dans ce circuit à plusieurs niveaux. Le striatum est densément peuplé d'interneurones cholinergiques et les noyaux ponto-mésencéphaliques innervent le thalamus et la SN (voir aussi figure 4 page 42). Les connexions reliant les différents noyaux des ganglions de la base sont très complexes et leur description est loin d'être définitive (Parent et al 2000).

Il y aurait une séparation fonctionnelle entre la SNc (DAergique) et la SNr (GABAergique). La SNr et le globus pallidus médian (GPm) se ressemblent beaucoup par leur cytologie, leurs connexions et leurs fonctions. Ils sont fréquemment considérés comme une seule et même structure (le GPm-SNr) coupée par la capsule interne. Le striatum reçoit la majeure partie des afférences vers les ganglions de la base, et en constitue donc la porte d'entrée. Il représente la cible de multiples projections en provenance des différentes aires motrices, pré-motrices et somato-sensorielles du cortex, mais aussi de divers noyaux sous-corticaux tels que la SNc et le thalamus.

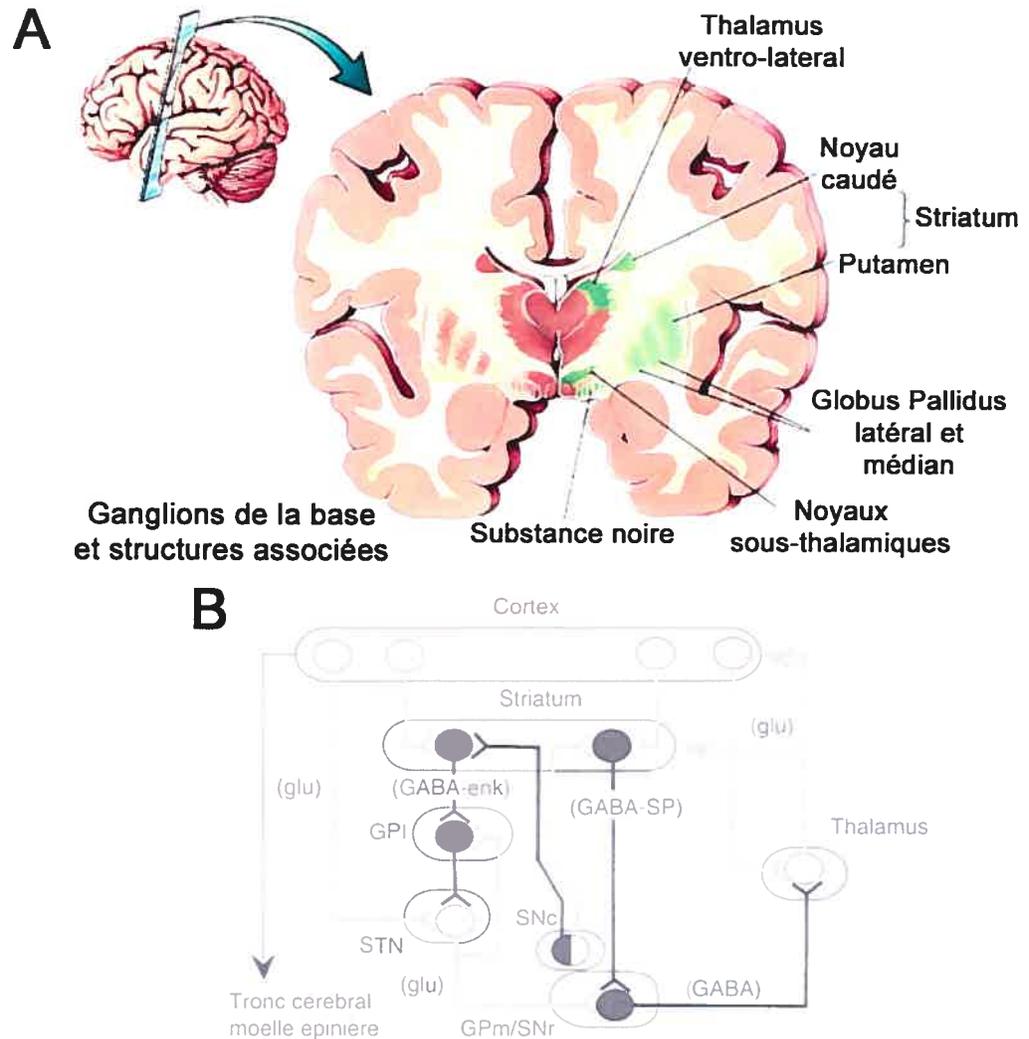


Figure 2 : Ganglions de la base

- A) Anatomie des ganglions de la base. Dessin d'une coupe frontale de cerveau humain passant par les noyaux constitutifs des ganglions de la base (en vert) (modifié de Bear et al. 1997).
- B) Schéma de la circuiterie des ganglions de la base : en noir les voies inhibitrices et en gris les voies excitatrices (glu : glutamate, enk : enképhaline, SP : substance P, STN : noyaux sous-thalamique, GPI et GPM : globus pallidus latéral et médian, SNr et SNc : substance noire réticulée et compacte) (modifié de Richard et Orsal 1994).

Les afférences corticales sont excitatrices et utilisent le glutamate comme neurotransmetteur. Le striatum projette quant à lui principalement vers le globus pallidus et de retour vers la SNr. Ces deux structures sont responsables de la majeure partie des efférences sortant des ganglions de la base. Les fibres partant du striatum sont presque toutes GABAergiques. Deux voies relient le striatum au globus pallidus : la voie directe et la voie indirecte. La première relie directement le striatum au GPM-SNr, alors que la seconde relie d'abord le GPI puis le GPM-SNr. Comme la transmission est dans les deux cas purement GABAergique, la voie directe inhibe le GPM-SNr et la voie indirecte active celui-ci. Comme l'action du GPM-SNr sur le thalamus est inhibitrice, l'activation de la voie directe facilite le mouvement (désinhibition du thalamus), tandis que l'activation de la voie indirecte inhibe le mouvement (facilitation de l'activité inhibitrice du GPM-SNr sur le thalamus). Notons finalement que la dopamine libérée par les neurones de la substance noire dans le striatum a pour effet de faciliter le mouvement, en activant la voie directe (via le récepteur D1 exprimé par des neurones qui libèrent du GABA et de la substance P) et en inhibant la voie indirecte (via le récepteur D2 par des neurones qui libèrent du GABA et de l'enképhaline).

Les dysfonctionnements des ganglions de la base se traduisent cliniquement par des troubles de la motricité. En particulier, la maladie de Parkinson est un de ces troubles le plus répandu. Son étude a permis des progrès considérables dans la compréhension du système moteur et des régulations extrapyramidales.

## 4.2 Maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative décrite en 1817 par le médecin londonien James Parkinson, qui touche les neurones DAergiques de la SN. Le déficit en DA qui caractérise cette maladie est responsable des trois symptômes fondamentaux qui la définissent : la *bradykinésie* (lenteur des mouvements, diminution de l'activité générale, démarche à petits pas, perte de la mimique du visage) est le symptôme fondamental, le *tremblement de repos*, la *rigidité* des membres. Le pronostic de cette maladie a été grandement amélioré par l'apport des thérapeutiques de substitution DAergique via l'utilisation de substances qui peuvent traverser la barrière hémato-encéphalique (comme la L-DOPA, le précurseur de la DA). Au fil du temps, l'effet de la L-DOPA s'estompe, car le processus dégénératif continue à détruire les structures nerveuses. Actuellement, les médecins évitent de prescrire la L-DOPA en première intention tant que l'akinésie est tolérable, pour éviter l'épuisement trop précoce de l'effet thérapeutique. En fait, les travaux récents montrent que d'autres centres nerveux sont lésés et qu'il existe des déficits d'autres neurotransmetteurs (ACh, autres monoamines, acides aminés excitateurs, GABA, neuropeptides : substance P, Met-enképhaline...). Si l'altération DAergique reste l'élément fondamental, d'autres altérations des neurotransmetteurs et neuromodulateurs centraux jouent un rôle certain. Les interneurons cholinergiques du striatum interviennent dans les symptômes et il semble que ceux-ci soient surtout dus à un déséquilibre entre DA et ACh : l'hypofonctionnement DAergique entraîne une hyperactivité cholinergique relative. Le traitement cherche donc à rétablir l'équilibre DA/ACh perturbé au niveau striatal en réduisant l'hypercholinergie centrale par les anticholinergiques atropiniques ou les antiparkinsoniens de synthèse qui vont rehausser le niveau de DA.

Une nouvelle fois, nous pouvons voir une interrelation importante entre les systèmes DAergique et cholinergique.

## 5. Conclusions

Le système DAergique est un système régulateur impliqué dans un nombre important de fonctions du SNC, tant cognitives que sensori-motrices. Les pathologies associées nous donnent de nombreuses indications sur son fonctionnement et sur les influences qu'il exerce. Le rôle des neurones GABAergiques intrinsèques aux noyaux DAergiques a longtemps été sous-estimé car l'ensemble des études sur ce système se focalisait exclusivement sur l'étude des caractéristiques propres aux neurones DAergiques (fort complexe par ailleurs). Les neurones inhibiteurs occupent une position privilégiée au sein des noyaux DAergiques qui leur permet de réguler le taux de décharge des neurones DAergiques. Or, nous savons que ce paramètre est fondamental pour la régulation de la concentration de DA extracellulaire au niveau somatique et dans les zones de projections. Nous avons profité de notre modèle de neurones en culture primaire de mésencéphale ventral pour étudier ces neurones tout en évitant les problèmes inhérents aux études *in vivo* ou en tranche qui permettent difficilement de s'affranchir des influences externes au noyau étudié (voir méthodes). D'autre part, nous avons vu que le système cholinergique est en étroite relation avec le système DAergique. Nous nous sommes concentrés sur l'étude des effets cholinergiques sur les neurones GABAergiques et plus particulièrement sur les effets muscariniques car très peu de données sont disponibles à ce sujet.

## **Chapitre 2. Système cholinergique du tronc cérébral**

### **1. Centres cholinergiques**

Six différents groupes de neurones cholinergiques ont été identifiés au sein du SNC par Mesulam et collaborateurs (1983). Ces auteurs ont défini les groupes Ch1 et Ch2, localisés dans la région septale médiane, qui fournissent l'essentiel des afférences cholinergiques de la formation hippocampique. Le groupe Ch3 (noyaux de la bande diagonale de Broca) se projette sur les bulbes olfactifs. Les neurones du groupe Ch4 (noyau basal magnocellulaire pour les rongeurs et noyau basal de Meynert pour l'homme) sont répartis de façon très diffuse au pied du pallidum et se projettent sur l'ensemble du néocortex. Enfin les groupes Ch5 et Ch6 sont localisés respectivement dans les noyaux pédonculopontin (PPT) et tegmentaire latérodorsal (LDT). Ceux-ci se projettent sur les noyaux du thalamus, l'hypothalamus latéral, les colliculi supérieurs, la région septale, le corps mamillaires (noyaux limbiques), le noyau interpédonculaire, le noyau raphé médian, le cortex préfrontal médian et les noyaux DAergiques du mésencéphale ventral (Mesulam 1988) (figure 3).

### **2. Fonctions cognitives**

L'ACh joue un rôle important dans l'activation cérébrale et la vigilance, les processus d'apprentissage et la mémorisation. La maladie d'Alzheimer, dont le symptôme principal est une altération des capacités cognitives et de mémorisation, est une démence sénile associée à un dysfonctionnement des groupes cholinergiques en début de pathologie. Les premiers neurones atteints se situent dans les groupes Ch4, Ch1 et Ch2 pour entraîner un déficit cortical et hippocampique en ACh. La baisse des marqueurs cholinergiques est corrélée avec le degré de la démence et le nombre de plaque séniles. Par la suite, de

nombreuses autres parties du SNC vont être affectées pour arriver au tableau clinique de la démence.

Les noyaux cholinergiques du tronc cérébral (PPT et le LDT) provoquent l'éveil cortical. Ces noyaux se projettent en grande partie sur le thalamus (noyaux intra-laminaires non spécifiques et noyau réticulaire thalamique) et le cortex. Ils excitent les neurones thalamo-corticaux des noyaux intra-laminaires et donc, par ces voies, les neurones corticaux. Ils inhibent dans le même temps les neurones inhibiteurs GABAergiques du noyau réticulaire thalamique ce qui conduit à une désinhibition corticale. Cette excitation des neurones corticaux, directe et indirecte, provoque la désynchronisation corticale observée pendant l'éveil lors de l'activation corticale du sommeil paradoxal. On a vu précédemment que ces neurones sont impliqués dans les REM qui caractérisent le sommeil paradoxal. Les niveaux d'ACh corticale sont équivalents lors de l'éveil et du sommeil paradoxal et sont deux à trois fois moindres pendant le sommeil profond dit "à ondes lentes" (Marrosu et al. 1995). Le taux de décharge des neurones cholinergiques du tronc cérébral s'accroît substantiellement lors du sommeil paradoxal. De même, l'administration de physostigmine (un inhibiteur de la cholinestérase, l'enzyme de dégradation de l'ACh) chez des sujets humains endormis entraîne une augmentation des REM et des rêves. La désynchronisation corticale induite par ces neurones est non seulement due aux projections vers le thalamus mais également aux projections vers les autres noyaux cholinergiques de la base du télencéphale. La stimulation électrique des neurones du PPT semble ainsi suffisante pour induire une hausse de l'ACh corticale via ces projections (Rasmusson et al. 1994). Les neurones cholinergiques du tronc cérébral font donc partie intégrante du système réticulé activateur qui est indispensable aux processus attentionnels. Le rôle de l'ACh à cet égard est confirmé par la survenue possible de troubles de type confusionnel chez les sujets prenant des médicaments dits anticholinergiques.

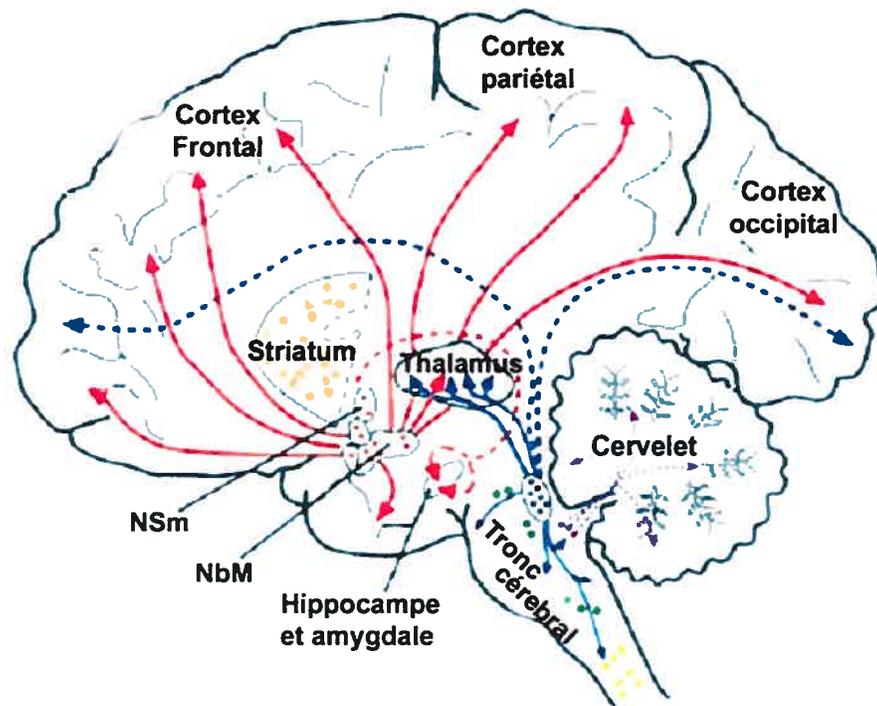


Figure 3 : Système cholinergique central chez l'humain

Deux voies principales innervent les différentes parties du cerveau : Les neurones de la base du télencéphale Ch1 à 4 (en rouge qui incluent : Le noyau basal de Meynert (NbM) et le noyau septal médian (NSm) et les noyaux mésopontins Ch5 et 6 (en bleu : le PPT et le LDT) sont également indiqués les interneurons striataux (en orange), les motoneurons des nerfs crâniens (en vert), le noyaux vestibulaire (en violet) et enfin les motoneurons et les neurones pré-ganglionnaires spinaux (en jaune) (tiré de Perry et al. 1999).

### 3. Noyaux mésopontins cholinergiques et mésencéphale ventral

L'innervation cholinergique des neurones du mésencéphale ventral est issue des noyaux mésopontins. Le PPT est constitué de neurones disséminés autour du centre du noyau et mélangés à d'autres types neuronaux principalement glutamatergiques. Pour sa part, le LDT est un noyau plus densément peuplé en neurones cholinergiques et plus distinct morphologiquement. Cependant, la délimitation entre ces deux noyaux est assez floue car ils ont tendance à s'imbriquer l'un dans l'autre (à l'image des noyaux DAergiques mésencéphaliques). Le PPT se projette sur la partie dorsale de la SN alors que l'ATV et la partie médiane de la SN sont plutôt innervées par les neurones du LDT. Ces noyaux sont mixtes et contiennent des neurones cholinergiques et glutamatergiques qui suivent les mêmes voies anatomiques (Futami et al. 1995). Garzon et collaborateurs (1999) ont démontré que les terminaisons cholinergiques situées au niveau des noyaux DAergiques font majoritairement (65 %) synapse sur des neurones n'exprimant pas le DAT et que l'on suppose donc être en grande partie GABAergiques. Les terminaisons glutamatergiques auraient plutôt tendance à faire synapse sur les neurones DAergiques. Ces projections sont impliquées dans les effets de récompense des drogues d'abus et des "renforçants" naturels (Yeomans et Baptista 1997, Yeomans et al. 2000). En effet, on sait entre autres grâce aux travaux de Blaha et collaborateurs, que la concentration de DA dans le striatum (ventral et dorsal) est fortement influencée par la stimulation des neurones cholinergiques du tronc cérébral (Forster et Blaha 2000, 2003 ; Forster et al. 2002 ; Miller et al. 2002 ; Blaha et al. 1996). Ces travaux ont démontré le lien fonctionnel entre le LDT et l'ATV ainsi qu'entre le PPT et la SN. La stimulation électrique des noyaux cholinergiques du tronc cérébral induit une hausse importante de la DA striatale mesurée *in situ* par électrochimie. Cet effet se divise en trois phases successives. Une première phase rapide (avec un pic de concentration 2 min après la stimulation) est dépendante de l'activation de récepteurs nicotiques et au glutamate. La seconde phase est inhibitrice et entraîne une baisse de la DA ambiante 5 min après la stimulation électrique. Cette phase inhibitrice est due à l'activation d'autorécepteurs muscariniques de type M2 situés sur le soma des neurones cholinergiques et diminue leur taux de décharge. Enfin, la troisième phase, excitatrice, dure plus de 30 min et se

caractérisée par une augmentation massive et soutenue de la DA striatale. Cette phase nécessite l'activation de récepteurs muscariniques de type M5 au niveau des noyaux DAergiques. Cette dernière conclusion est tirée d'expériences effectuées sur des souris transgéniques dont le gène pour ce récepteur a été inactivé. Cette série d'expériences confirme donc le lien fonctionnel entre les neurones cholinergiques du tronc cérébral et les neurones DAergiques (illustré à la figure 4). Cependant, nous avons vu qu'une bonne partie des synapses cholinergiques innerve des neurones GABAergiques, alors que les études effectuées par l'équipe du Dr Blaha ont été effectuées *in vivo*, où il est très difficile de déterminer si des interneurons GABAergiques interviennent dans les phénomènes observés.

Nous savons également que l'efficacité de la transmission GABAergique au sein du mésencéphale ventral est inhibée par les récepteurs muscariniques M3 (Grillner et al. 2000). Ceci confirme à nouveau l'existence d'un lien fonctionnel entre les projections cholinergiques et les neurones du mésencéphale ventral. Ici encore, l'étude effectuée sur des tranches de cerveau ne permet pas de distinguer entre des effets imputables aux afférences GABAergiques intrinsèques ou extrinsèques. L'utilisation de notre modèle de culture primaire nous a permis de nous affranchir de ce problème car les neurones mis en culture sont exclusivement issus de l'ATV et de la SN. Les effets observés dans ces conditions peuvent être uniquement dûs à des neurones intrinsèques. Comme nous le verrons au cours des deux premiers articles, l'activation des récepteurs cholinergiques augmente le taux de décharge des neurones GABAergiques du mésencéphale ventral. Nous nous sommes particulièrement intéressés aux mécanismes qui sous-tendent cette hausse, notamment par l'intermédiaire des récepteurs muscariniques.

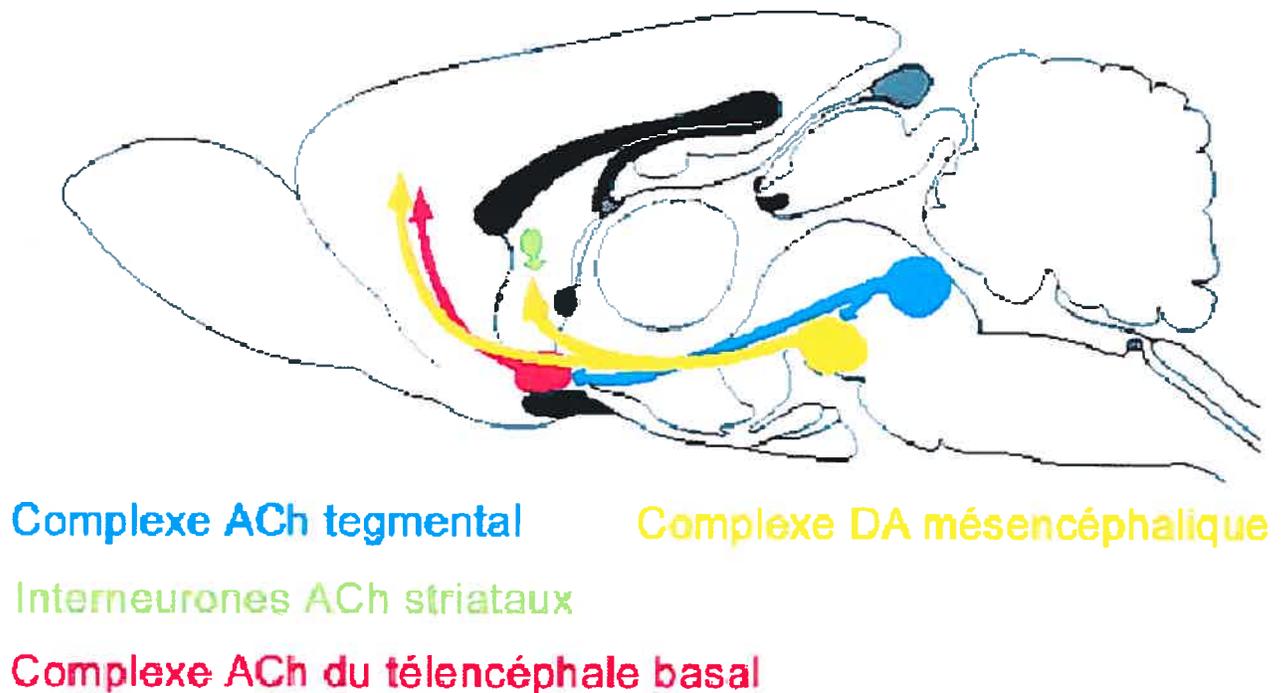


Figure 4 : Schéma des interactions cholinergico-DAergiques

Le système DAergique (en jaune) est innervé par les neurones cholinergiques du tronc cérébral (bleus) et les cibles DAergiques sont également visées par les projections cholinergiques (striatum en vert et cortex en rouge).

## 4. Récepteurs cholinergiques

Dès le début du XX<sup>ème</sup> siècle les chercheurs ont défini deux classes de récepteurs pour l'ACh sur la base de réponses pharmacologiques (Dale 1914). Les récepteurs nicotiniques sont activés par la nicotine et bloqués par la d- tubocurarine (utilisée par les amérindiens d'Amazonie pour la chasse afin de paralyser les proies). L'autre famille, les récepteurs muscariniques, est activée par la muscarine, un alcaloïde dérivé du champignon vénéneux *Amanita muscaria* et bloquée par l'atropine, un autre alcaloïde dérivé d'*Atropa belladonna*. Un alcaloïde est une substance organique azotée d'origine végétale, ayant des propriétés thérapeutiques ou toxiques et présentant une structure chimique complexe. Par exemple, l'atropine induit une action antagoniste sur le système nerveux parasympathique. Les cibles principales sont, entre autres, cardiaque (tachycardie), sécrétoire (assèchement de toutes les muqueuses), musculaire (relâchement des fibres musculaires lisses) ou visuelle (mydriase ou dilatation de la pupille). Cette dernière propriété est connue au moins depuis l'Égypte Ancienne, où les femmes s'instillaient dans les yeux des préparations à base de Belladone pour rendre leur regard plus éclatant. Cette pratique est aussi à l'origine du nom de cette plante (*bella donna* = belle femme).

### 4.1 Récepteurs nicotiniques

Les récepteurs nicotiniques ont été purifiés au début des années 1960 à partir de l'organe électrique du poisson torpille. Ils font partie de la famille des récepteurs-canaux ou ionotropes et sont constitués de 5 sous-unités protéiques transmembranaires. Le récepteur nicotinique de la jonction neuromusculaire est l'un des récepteurs les mieux connus; ses sous-unités protéiques sont de 4 types différents ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$  dans les proportions 2/1/1/1). Les récepteurs centraux sont constitués seulement de sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ . Lorsque l'ACh, ou la nicotine, se lie au récepteur (sur les 2 sous-unités  $\alpha$ ), celui-ci change de conformation, ce qui ouvre le canal ionique et laisse entrer du sodium à l'intérieur de la cellule, provoquant la dépolarisation de la cellule. Plus récemment, on a aussi découvert que certains de ces récepteurs étaient perméables au calcium, facilitant la libération de certains

neurotransmetteurs pour lesquels l'ACh jouerait le rôle de modulateur. Cette sous-famille n'est composée que de sous-unités  $\alpha$ . La pharmacologie des récepteurs nicotiniques a principalement été décrite par les équipes de J.-P. Changeux et E.X. Albuquerque (Alkondon et al. 1997 ; Changeux et al. 1998 ; Lu et al. 1998). Il y aurait quatre types de courants induits par l'activation de récepteurs nicotiniques :

*Type I* : Bloqués par la méthyllycaconitine (MLA) ou l' $\alpha$ -bungarotoxine ; ces courants impliqueraient un récepteur homomérique constitué de 5 sous-unités  $\alpha 7$ .

*Type II* : Ces courants seraient supportés par des récepteurs contenant la sous-unité  $\beta 2$  combinée généralement avec  $\alpha 4$  (mais pas exclusivement). Des souris knock-out pour le gène de la sous-unité  $\beta 2$  n'expriment plus ce type de courant (Zoli et al. 1998). Ces récepteurs sont les plus exprimés dans le SNC. Ils ont la plus forte affinité pour la nicotine parmi les 4 types décrits ici. Les courants de types II sont bloqués de façon équivalente par la mécamylamine et la dihydro- $\beta$ -érythroïdine (DH $\beta$ E). La sous-unité  $\beta 2$  pourrait interagir avec d'autres sous-unités que  $\alpha 4$  dans les noyaux catécholaminergiques, telles que  $\alpha 6$  et  $\beta 3$ , comme proposé par Le Novère et Changeux (Le Novère et al. 1996).

*Type III* : Les récepteurs qui sous-tendent ces courants ne comportent pas de sous-unité  $\beta 2$ , mais plutôt,  $\beta 4$  et  $\alpha 3$ . Ils sont principalement inhibés par la DH $\beta$ E et plus faiblement par la mécamylamine. Par contre, ils ne sont pas sensibles à la MLA.

*Type IV* : Composés des sous-unités  $\beta 4$  et  $\alpha 4$  (et/ou  $\alpha 2$ ), la pharmacologie de ces récepteurs est proche du type III. En effet, seules les propriétés de liaison aux différents ligands nicotiniques (comme la cytosine, la nicotine ou la MLA) nous permettent de distinguer ces deux types de courants. Il semble cependant que la vitesse de désensibilisation du type IV soit plus élevée que celle du type III.

L'étude de la localisation des ARN messagers des différentes sous-unités des récepteurs nicotiniques a montré que les neurones GABAergiques mésencéphaliques

expriment les sous-unités  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$ ,  $\beta_2$  et  $\beta_3$  alors que les neurones DAergiques expriment les sous-unités  $\alpha_3$  à  $\alpha_7$  et  $\beta_2$  à  $\beta_4$  (Charpantier et al. 1998 ; Klink et al. 2001).

## 4.2 Les récepteurs muscariniques

Les récepteurs muscariniques sont largement exprimés. Ils régulent divers types de réponses physiologiques dans de nombreux tissus (cardiaques, muscles lisses, glandes exocrines et dans les systèmes nerveux central et périphérique). Ils régulent la libération des neurotransmetteurs tant aux niveaux synaptique que somato-dendritique (Raiteri et al. 1990). Les récepteurs muscariniques sont des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Au nombre de 5, ils ont la structure classique à 7 domaines transmembranaires. Ces récepteurs sont divisés en deux sous familles M1, M3 et M5 d'un côté et M2 et M4 de l'autre. Cette division a une justification fonctionnelle et génétique. En effet, d'un point de vue phylogénétique M2 et M4 sont plus proches entre eux que les M1, M3 et M5 (et inversement). M2 et M4 sont couplés à une protéine  $G_i$  et donc inhibent la formation de l'AMPc par l'adényl cyclase. Ils peuvent ouvrir des canaux potassiques de type GIRK par l'intermédiaire des sous-unités  $\beta\gamma$  des protéines G. Par contre, M1, M3 et M5 sont couplés à des protéines G de type  $G_{q/11}$  qui vont activer la phospholipase C (PLC) pour produire du diacylglycérol (DAG) et de l'inositol triphosphate (IP3) à partir des phosphatidylinositides. Ces mécanismes biochimiques vont entraîner l'activation de cascades de seconds messagers et diverses réponses cellulaires. Par exemple, l'activation de la PLC et la création de DAG entraînent l'activation de la protéine kinase C et la phosphorylation subséquente des cibles de la PKC incluant de nombreuses protéines et canaux ioniques. Cette voie métabolique est retrouvée dans de nombreux types cellulaires. Les éléments qui la composent sont souvent liés à la membrane plasmique par des résidus lipophiles (protéine G, PLC, PKC...) ou parce que ce sont des molécules qui font partie de la membrane comme les phosphatidylinositol ou le DAG. La libération d'IP3 dans le cytoplasme va activer les récepteurs à l'IP3 localisés au sein de la membrane du réticulum endoplasmique qui fait office de réservoir d'ions  $Ca^{2+}$  dans la cellule. Les récepteurs à l'IP3 sont des récepteurs canaux perméables au  $Ca^{2+}$  et leur

activation va donc conduire à la hausse de concentration cytoplasmastique d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ . Le  $\text{Ca}^{2+}$  est un second messager très important dont la régulation fine est fondamentale pour la cellule. Il est impliqué dans de nombreux processus cellulaires dont, entre autres, la libération des neurotransmetteurs, l'activation de cascades de kinase, le couplage excitation/contraction, etc. La localisation cellulaire et la provenance du  $\text{Ca}^{2+}$  dans la signalisation des récepteurs va influencer sur les effets de ceux-ci. Par exemple, l'activation de canaux calciques dépendant du voltage au niveau de la terminaison synaptique n'a pas le même effet que l'activation des mêmes canaux au niveau somatique (exocytose du neurotransmetteur dans le premier cas et dépolarisation membranaire dans le second). Le fait que tous les acteurs de la voie de transduction des protéines  $G_{q/11}$  soient physiquement proches est important dans ce contexte. Les différentes étapes sont effectuées dans un microenvironnement qui comprend la PLC, la PKC et des canaux ioniques. En effet, plusieurs études ont démontré que les récepteurs canaux à l' $\text{IP}_3$ , les canaux TRP (pour *transient receptor potential*, qui sont des canaux perméables aux calcium que nous décrirons en détail dans la discussion) et la PLC ont des interactions directes ou par l'intermédiaire de petites protéines de liaisons (Kiselyov et Muallem 1999 ; Taylor 2002 ; Zitt et al. 2002). L'efficacité du couplage entre les RCPG et les effecteurs est ainsi grandement augmentée alors que la spécificité spatiale reste entière. D'autres acteurs semblent également prendre part à cette voie de transduction comme des dérivés acides gras du DAG (dont l'acide arachidonique) ou le  $\text{PIP}_2$  précurseur de l' $\text{IP}_3$ , qui sont capables par eux-mêmes de réguler des canaux ioniques perméables aux  $\text{Ca}^{2+}$  comme les canaux TRP (Montell et al. 2002 ; Runnels et al. 2002).

Du point de vue de la pharmacologie, on estime qu'un composé est sélectif pour un type de récepteur si son affinité est 10 fois supérieure à celle des autres récepteurs. Selon cette définition, très peu de molécules remplissent ces conditions pour les récepteurs muscariniques (l'AF-DX116 pour le M2, par exemple). Toutes les molécules disponibles ont une forte affinité pour au moins deux récepteurs muscariniques (Bolden et al. 1992 ; Eglén et al. 1999). Faire un catalogue exhaustif des drogues muscariniques sort du contexte de cet exposé. Dans le cadre de ce travail, nous avons cependant utilisé certaines molécules

(les plus pertinentes disponibles) afin de définir quels sont les récepteurs muscariniques fonctionnels sur les neurones GABAergiques du mésencéphale ventral. Ces drogues et leurs affinités pour les différents récepteurs muscariniques sont résumées dans le tableau 1. Les affinités ont été déterminées à partir de différentes études de liaison à l'équilibre, réalisées sur des préparations de cellules transfectées exprimant les récepteurs à un haut niveau, ce qui peut entraîner une hausse de l'efficacité des molécules (Kenakin 1984). Ces valeurs sont donc des affinités apparentes, mesurées dans les conditions les plus favorables, et représentent donc une surestimation par rapport aux conditions dans lesquelles nous les avons utilisées (voir discussion page 194).

|             | M1      | M2      | M3     | M4      | M5     | Concentrations utilisées dans nos expériences |
|-------------|---------|---------|--------|---------|--------|---|
| Atropine    | 0,2-1   | 0,5-1   | 0,2-1  | 0,3-0,8 | 0,2-1  | 1000  |
| pirenzepine | 3-15    | 200-500 | 75-200 | 7-80    | 66-630 | 100   |
| AF-DX116    | 26300   | 160     | 25700  | 3890    | 12300  | 500   |
| 4-DAMP      | 0,6-2   | 3-15    | 0,4-1  | 0,4-3   | 0,6-1  | 100   |
| Tropicamide | 104     | 23      | 112    | 28      | 57     | 100   |
| oxybutynine | 3,2-6,3 | 16-32   | 2-5    | 3,2-8   | 20-25  | 10 et 100                                     |

Tableau 1 : Affinité des récepteurs muscariniques pour les molécules utilisées (en nM)

(Tiré de : Eglen et al. 1999 ; Moriya et al. 1999 ; Dong et al. 1995 ; Caulfield et Birdsall 1998).

## Chapitre 3. Considérations méthodologiques

### 1. Modèles d'études neuropharmacologiques

L'ensemble des expériences réalisées lors de ce travail de doctorat a été effectué sur un modèle de culture primaire de neurones du mésencéphale ventral. Plusieurs modèles expérimentaux sont disponibles pour l'étude des mécanismes d'action des drogues au niveau du SNC. Parmi ceux-ci, on retrouve à la fois des modèles *in vivo* et *in vitro*. Ces modèles couvrent un large spectre de paramètres de l'animal entier à la molécule. Chacun a des avantages et des inconvénients. Le choix d'un modèle est important et se fait en fonction des questions que l'on se pose et des meilleures façons d'y répondre. La problématique de ce travail est centrée sur l'étude des propriétés intrinsèques des neurones GABAergiques de l'ATV. Ceci entraîne certaines contraintes : Nous devons tenir compte du phénotype des cellules et de leurs propriétés qui doivent être le plus proche possible de celles retrouvées *in vivo*. Le modèle le plus approprié doit donc permettre de différencier le type de cellule étudié ce qui exclue les modèles les plus simplifiés comme les synaptosomes. Sont aussi exclus les modèles trop généralistes de l'animal entier car ils ne permettent pas l'étude individualisée des neurones par plusieurs techniques comme le patch-clamp et l'imagerie calcique. L'avantage des études en cultures primaires par rapport aux tranches de cerveau est moins évident, car la plupart des expériences effectuées durant cette thèse auraient pu être réalisées sur des tranches de cerveau. Cependant, le choix de la culture cellulaire nous a permis d'effectuer des études sur neurone isolé et d'en déterminer les propriétés intrinsèques (voir culture micro-gouttes). Les cultures nous ont permis également de simplifier les expériences et d'avoir les résultats dans un temps raisonnable. En effet, rappelons que les neurones GABAergiques sont fortement minoritaires dans le mésencéphale ventral. Le modèle de culture primaire offre un accès beaucoup plus facile (et rapide) aux cellules que la tranche, ce qui permet de multiplier les expériences et ainsi d'avancer dans la description physiologique de ces neurones. Ce modèle est également avantageux pour les techniques d'imagerie cellulaire. Nous présentons dans la suite de cette

section les modèles de neuropharmacologie disponibles et donnons plus en détail les limites et avantages de chacun.

### **1.1 Animaux intacts**

L'étude de l'animal entier permet de prendre en compte la complexité des organismes et les aspects centraux et périphériques qui peuvent influencer les résultats des expériences. Généralement, les animaux les plus utilisés en neuropharmacologie sont des rongeurs car ce sont des mammifères dont le coût d'entretien est faible, qui se multiplient rapidement et pour qui une multitude d'outils d'observation ont été développés. Un des intérêts majeurs de l'utilisation des rongeurs, et en particulier des souris, vient de la possibilité de construire des lignées d'animaux transgéniques chez qui un ou plusieurs gènes peuvent être manipulés (invalidé, ajouté, muté...). Cet intérêt est également valable pour tous les modèles issus de ces animaux (tranches, cultures...). Les effets des drogues peuvent être observés de façons chroniques ou aiguës. Des paramètres comportementaux et physiologiques, comme la mémoire, la motricité, la thermorégulation, l'état d'éveil, l'appétit, le stress, etc. peuvent être mesurés. Il est possible d'effectuer des études électrophysiologiques par l'implantation de microélectrodes *in situ* dans les structures qui nous intéressent, grâce à un appareil de stéréotaxie, et de faire des enregistrements intra ou extracellulaire. L'intérêt évident de ce type d'expérience est que les mesures sont effectuées dans un organe qui a conservé son intégrité et évolue dans des conditions physiologiques (exception faite d'expériences nécessitant l'utilisation d'anesthésiques). Les limitations de cette technique sont l'identification des cellules étudiées et l'accès très restreint des molécules pharmacologiques au cerveau ce qui limite le contrôle des concentrations. L'utilisation du modèle de l'animal intact limite également l'utilisation de certaines techniques électrophysiologiques tels les enregistrements intracellulaires et la technique du patch-clamp. Finalement, les enregistrements *in vivo* ne sont pas toujours possibles. En effet, ceux-ci peuvent s'avérer compliqués dans des structures du cerveau difficiles d'accès. Dans le cas où les enregistrements *in vivo* s'avèrent difficiles ou peu informatifs quant au

mécanisme d'action d'une drogue, on peut faire appel à des modèles *in vitro* généralement plus simples à mettre en œuvre.

## 1.2 Tranches de cerveau

Les tranches de cerveau constituent un modèle biologique intermédiaire entre l'expérimentation *in vivo* et la culture primaire. Leur utilisation pour l'étude de l'action des drogues dans le SNC est très répandue. Depuis les premiers travaux effectués par Yamamoto et McIlwain (1966), montrant que les tranches corticales maintenaient la plupart des propriétés électrophysiologiques du cortex observées *in vivo*, ce modèle a été utilisé pour étudier la quasi totalité des structures du SNC (Suter et al. 1999). Pour préparer les tranches, le cerveau est extrait du crâne de l'animal puis immergé dans du salin refroidi. Il est ensuite coupé à l'aide d'un vibratome et on obtient alors des tranches de cerveau d'environ 100 à 300  $\mu\text{m}$  d'épaisseur qui peuvent être placées dans une chambre d'enregistrement dans laquelle circule du salin chauffé et oxygéné (Gibb et Edwards 1994).

L'utilisation de tranches de cerveau permet de remédier à plusieurs problèmes encourus chez l'animal entier. Premièrement, l'accès des drogues aux structures étudiées est facilité et les effets indirects que pourraient avoir les drogues en périphérie ou dans d'autres régions du cerveau sont évités. Aucun anesthésiant n'est présent dans le tissu lors de l'expérimentation. Les enregistrements électrophysiologiques sont plus stables étant donné l'absence de pulsations dues à la circulation sanguine ou à la respiration de l'animal. De plus, les structures étudiées sont plus facilement accessibles et on peut observer le tissu à l'aide d'un microscope, ce qui permet de visualiser les neurones, facilitant ainsi leur identification. Un des principaux avantages du modèle de tranche par rapport au modèle *in vivo* est qu'il facilite les enregistrements intracellulaires et permet d'utiliser la technique du patch-clamp. L'intérêt de l'utilisation de ces techniques est qu'elles permettent de mesurer plus précisément les propriétés électrophysiologiques des cellules enregistrées et également de mesurer des réponses membranaires individuelles évoquées par la libération synaptique de neurotransmetteurs, ce qui est plus difficile et moins précis avec les enregistrements extracellulaires. Finalement, bien que l'intégrité du tissu ne soit pas totalement préservée

dans ce modèle expérimental, une partie des réseaux neuronaux est maintenue, les afférences toujours présentes sont au moins partiellement fonctionnelles, et les neurones conservent la maturité qui était la leur au moment de la préparation de la tranche.

Bien que le modèle de tranche comporte plusieurs avantages, certains inconvénients sont toutefois associés à son utilisation. Tout d'abord, le tissu est maintenu en vie en milieu artificiel et non pas en milieu naturel. Il faut également signaler que la préparation de la tranche implique nécessairement la lésion massive de multiples afférences et efférences en relation avec la région d'intérêt. Le tissu étudié est un tissu endommagé. Par ailleurs, malgré le fait que l'accès des drogues soit facilité par rapport au modèle *in vivo*, celui-ci demeure tout de même limité. En effet, la concentration de la drogue atteignant les neurones enregistrés est souvent plus faible que celle du milieu d'incubation. L'utilisation des tranches de cerveau comporte aussi des inconvénients en ce qui concerne l'étude des mécanismes cellulaires et moléculaires de l'action des drogues. Par exemple, les techniques d'imagerie en fluorescence sont difficiles d'application sur cette préparation. En effet, l'épaisseur des tranches peut entraîner des problèmes de résolution spatiale et de bruit de fond important lors des enregistrements, et seule l'utilisation de très coûteux systèmes de microscopie confocale permet de remédier en partie à ces problèmes. Le modèle de tranche est également peu pratique pour l'utilisation de certaines techniques de biologie moléculaire qui nécessitent du temps pour s'exprimer. Finalement, il peut être difficile d'utiliser les tranches de cerveau pour étudier certains aspects de la transmission synaptique. En effet, ce genre d'étude nécessite souvent d'effectuer des enregistrements pairés qui consistent en l'enregistrement simultané de deux neurones connectés synaptiquement à l'aide de deux microélectrodes d'enregistrement. Comme les probabilités de trouver deux neurones connectés sur une tranche sont relativement faibles, cette technique, bien que possible, s'avère difficile à mettre en œuvre avec ce genre de préparation. On remarquera aussi que les structures afférentes et efférentes peuvent être trop éloignées pour pouvoir obtenir des paires de neurones dans la même tranche (par exemple la VTA et le NAc) (Miles et Poncer 1996).

Pour remédier aux problèmes encourus avec la préparation de tranches de cerveau et si l'expérimentation n'exige pas de tenir compte des réseaux neuronaux, l'utilisation de modèles *in vitro* plus simplifiés peut s'avérer utile.

### 1.3 Cultures primaires

La culture primaire est un autre modèle utilisé pour l'étude de l'action des drogues sur les neurones. En effet, des neurones provenant de plusieurs régions du SNC ont été mis en culture avec succès (Shahar et al. 1989). Dans ce type de modèle, la partie du cerveau que l'on désire étudier est prélevée directement chez l'animal. Le tissu est ensuite dissocié de manière enzymatique par des protéases. Cette étape est habituellement suivie d'une dissociation mécanique (Buchhalter et al. 1992). Les cellules sont ensuite mises en culture et peuvent être maintenues en vie dans un incubateur. Celles-ci vont alors se développer morphologiquement et établir de nouvelles connexions synaptiques, habituellement à l'intérieur d'une période d'une semaine.

Le principal inconvénient de la culture cellulaire par rapport aux tranches de cerveau est que dans cette préparation, les réseaux neuronaux présents *in vivo* ne sont pas préservés. Un autre inconvénient tient à la survie des neurones pendant l'expérience. En effet, l'environnement direct de la cellule est bien moins favorable que le milieu naturel où celle-ci est entourée d'autres neurones mais surtout de cellules gliales, qui la protègent et lui donnent un soutien métabolique efficace ainsi que des facteurs de croissance. La technique du patch-clamp en cellule entière qui a été utilisée lors de ce travail est particulièrement intrusive pour les cellules ce qui les fragilise fortement. Par contre, la culture de neurones comporte plusieurs avantages. Tout d'abord, lors de l'utilisation de cultures neuronales, la concentration de la drogue qui atteint les récepteurs est connue. En effet, celle-ci correspond directement à la concentration dans la solution extracellulaire. Ceci constitue un avantage important pour effectuer des études pharmacologiques. L'utilisation des techniques d'électrophysiologie s'avère grandement facilitée sur des neurones en culture. Ceci est dû au fait qu'il est beaucoup plus facile de visualiser les neurones individuellement à l'aide d'un microscope lorsque ceux-ci sont en culture. De plus, lorsque les neurones sont

disposés en monocouche, la microélectrode n'a pas à traverser de tissu pour atteindre les cellules. Ceci est particulièrement avantageux pour la technique du patch-clamp, qui nécessite que le bout de la microélectrode de verre soit le plus propre possible. L'utilisation des cultures facilite également les enregistrements pairés, décrits à la section précédente. En effet, la probabilité d'enregistrer simultanément deux neurones connectés en culture est beaucoup plus élevée qu'en tranche. L'utilisation de techniques d'imagerie en fluorescence est également facilitée sur le modèle de culture neuronale. En effet, les problèmes associés à l'utilisation des tranches pour ce type d'expérience ne sont pas présents lorsque les neurones sont isolés et disposés en monocouche. Ainsi, la diffraction due à l'épaisseur du tissu est négligeable par rapport à la tranche. La quantité de photons reçue par le neurone est plus importante pour une même illumination ce qui permet de diminuer la puissance du faisceau excitateur et donc de diminuer la perte d'efficacité des marqueurs fluorescents par "photo-bleaching" (voir aussi la section sur l'imagerie calcique page 73). La puissance de la fluorescence qui arrive aux détecteurs (caméra CCD) est également plus importante car il n'y a presque pas d'obstacle à la lumière émise par le marqueur ce qui permet d'avoir un meilleur signal. Les neurones en culture possèdent l'avantage important de permettre l'utilisation de techniques de biologie moléculaire ne pouvant être utilisées sur des modèles plus complexes. Par exemple, nous utilisons en routine, au laboratoire, les techniques de transfection de plasmides dans les cellules en culture primaire. Cette technique nous permet de connaître, a priori, le phénotype des cellules grâce à une protéine fluorescente encodée par le plasmide et dont l'expression est sélective du type cellulaire (voir identification de cellules page 79). La culture cellulaire représente donc un modèle de choix pour étudier les mécanismes d'action cellulaires et moléculaires des drogues sur les neurones du SNC.

En conclusion, bien que les réseaux neuronaux ne soient pas maintenus dans ce modèle expérimental, les avantages que comporte la culture cellulaire fait de celle-ci un excellent modèle pour l'étude du mécanisme d'action des drogues sur les neurones. L'étude de certains types de mécanismes et de certaines approches biochimiques nécessite toutefois un modèle encore plus simplifié. On peut alors faire appel au modèle du synaptosome.

## 1.4 Les synaptosomes

Les synaptosomes constituent un modèle *in vitro* très utile pour étudier différents aspects de la transmission synaptique ainsi que l'action des drogues au niveau des terminaisons synaptiques. Les synaptosomes sont obtenus suite à une homogénéisation du tissu nerveux et peuvent être isolés en utilisant certaines méthodes de centrifugation différentielle (Whittaker 1968). Les synaptosomes sont des "sacs" issus de la membrane des terminaisons neuronales contenant des vésicules synaptiques et quelques mitochondries (Gray et Whittaker 1960). Ceux-ci sont plutôt stables, c'est-à-dire qu'ils sont fonctionnels durant au moins six heures suivant leur préparation. Ce modèle simplifié ne convient pas à l'étude du mécanisme d'action de drogues agissant au niveau postsynaptique ou sur un phénotype de neurone en particulier. Ce modèle ne permet également pas de mesurer la libération de neurotransmetteurs en temps réel. Part contre, il a facilité la dissection biochimique des processus d'exocytose propre à la transmission synaptique.

## 2. Neurones du mésencéphale ventral en culture primaire

Dans le cadre de cette thèse, les expériences ont été effectuées à l'aide d'une préparation de neurones de l'ATV et de la SN en culture primaire. Deux types de cultures cellulaires ont été utilisés : la culture dite "standard" et la culture dite "micro-goutte" décrite plus tard. Les cultures primaires ont été préparées suivant un protocole inspiré de ceux de Cardozo (1993) et Sulzer et collaborateurs (1998). Pour les deux types de cultures, les neurones dissociés sont ensemencés sur des lamelles de verres recouvertes de substrat et sur lesquelles on a préalablement étalé des astrocytes provenant du mésencéphale. Les astrocytes, disposés en monocouche sur les lamelles, facilitent l'adhérence des neurones ainsi que leur croissance. Les détails de la mise en culture sont exposés dans les méthodes des articles contenus dans cette thèse.

### 2.1 Culture standard

On retrouve dans la culture standard les différents types cellulaires présents *in vivo* dans l'ATV et la SN, cellules gliales (astrocytes) et neurones DAergiques et GABAergiques. Les conditions nécessaires pour l'établissement de multiples connexions synaptiques entre les neurones sont présentes dans ce type de cultures (figure 5A et B).

Pour résumer, les cultures sont effectuées à partir de rats nouveaux-nés (P0-P1) qui sont anesthésiés sur glace (5 min). Nous avons initialement utilisé l'halothane comme anesthésiant (voir article 3) mais la cryoanesthésie permet une meilleure survie des cellules. La survie des neurones mésencéphaliques en culture primaire a également été améliorée par l'ajout d'une monocouche astrocytaire avant le dépôt des neurones. Pour ce faire, le cerveau des rats est extrait de la boîte crânienne puis une tranche contenant le mésencéphale est effectuée dans du milieu de dissection froid. Des cubes de 2 mm<sup>3</sup> sont prélevés au niveau de l'ATV et de la SN et sont incubés (30 min) dans une solution de papaïne (une protéase) afin d'effectuer une digestion enzymatique de la matrice extracellulaire. Les cellules sont ensuite dissociées mécaniquement en les passant par des pipettes de verre de diamètre décroissant. La suspension de cellules (neurones + cellules gliales) est déposée en flasque

et mise en incubateur. Les neurones sont éliminés 24 heures après par un passage à froid où le milieu de culture est entre 0 et 5 °C. Les astrocytes les plus résistants qui vont survivre à ce traitement vont se multiplier et seront transférés sur lamelles de verre. Un nouveau dépôt de neurones s'effectue sur le tapis glial après une mise en suspension cellulaire identique. Les neurones sont comptés et dilués pour avoir une densité de neurones optimale pour les différentes expériences prévues. La multiplication des astrocytes est arrêtée par l'ajout de FUDR et l'excitotoxicité neuronale est inhibée par l'ajout d'acide kynurénique (0.5 mM) (un inhibiteur des canaux AMPA/kainate au glutamate). La proportion de neurones GABAergiques dans ces cultures varie de 25 à 40 % (une moyenne estimée de l'ordre de 30 %), celle des neurones DAergiques est de 15 à 40 % (20-25 % en moyenne) et un troisième type de neurones excitateurs non-DAergiques complète la population neuronale (figures 5A et B).

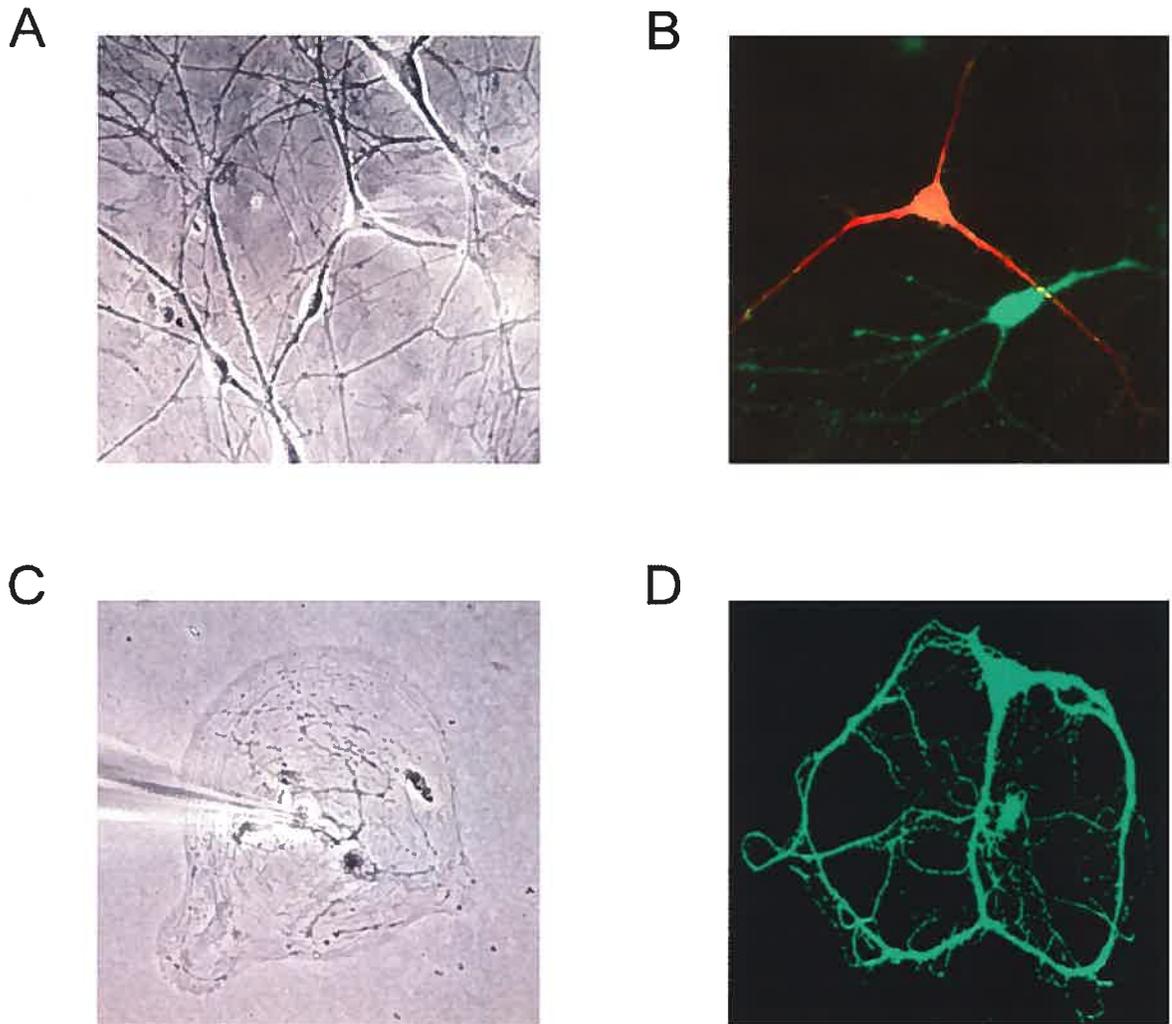


Figure 5 : Photographies de cultures primaires de neurones du mésencéphale ventral

A) Photographie de cellules en culture standard en contraste de phase. B) Photographie de neurones en culture standard après marquage immunocytochimique contre le GABA (en vert) et la tyrosine hydroxylase (neurones DAergiques, en rouge) (épifluorescence). C) Photographie d'un neurone en culture micro-goutte (contraste de phase). Noter la présence de la pipette de patch à gauche. D) Photographie d'un neurone en culture micro-goutte après marquage immunocytochimique contre le GABA (épifluorescence).

## 2.2 Culture micro-goutte

### 2.2.1 Neurones isolés

Ce type particulier de culture est très utile et sert de base à la majorité des expériences d'électrophysiologie présentées dans ce travail. En effet, il permet de connaître le phénotype de la cellule que l'on enregistre avant de commencer un protocole qui peut être parfois assez long. Il nous permet également de travailler sur des neurones isolés de toutes influences extérieures sans ajouter d'inhibiteurs pharmacologiques. Dans nos conditions de culture, la proportion de neurones GABAergiques varie de 25 à 40 %. Dans ces conditions, il est très rentable de connaître le phénotype de la cellule étudiée pour ne pas avoir à rejeter les deux tiers des expériences effectuées. Pour ce second type de culture, des micro-gouttes de substrat sont pulvérisées sur les lamelles puis des astrocytes y sont déposés. Finalement, des neurones sontensemencés à une dilution cellulaire favorisant l'obtention de gouttes qui possèdent des neurones individuels sur certaines gouttes. Dans ce cas, ces derniers émettent des prolongements axonaux et établissent des synapses sur eux-mêmes. On désigne alors ces contacts synaptiques d'"autapses" (figures 5C et D).

### 2.2.2 Courants autaptiques

Pour étudier les propriétés des neurones isolés nous faisons des enregistrements électrophysiologiques de la cellule (voir chapitre 12 et plus particulièrement 12.3.2.4 pour le détail de cette technique). Le patch-clamp nous permet de mesurer le potentiel ou les courants transmembranaires. Nous pouvons également injecter du courant dans la cellule et déclencher un potentiel d'action. Celui-ci va se propager tout au long de l'axone et aboutir à la libération du neurotransmetteur par les terminaisons. Cette libération va entraîner l'activation des récepteurs canaux postsynaptiques et induire des courants postsynaptiques inhibiteurs dans le cas de neurones GABAergiques (le récepteur canal  $GABA_A$  est perméable au ions  $Cl^-$ ) ou bien des courants excitateurs dans le cas de neurones glutamatergiques. Les récepteurs canaux du glutamate (AMPA/kainate) sont principalement perméables aux cations  $Na^+$  et  $K^+$  (voir figure 8 page 66). Ces courants

autaptiques sont mesurés et analysés ce qui nous permet de détecter des modulations de l'efficacité synaptique des neurones. La nature de ces courants postsynaptiques nous renseigne sur le phénotype du neurone étudié.

### 2.2.3 Identification électrophysiologique des cellules

Les expériences effectuées pour déterminer le phénotype du neurone en microgouttes sont simples et très rapides. Après avoir "patché" la cellule, il suffit d'évoquer des courants autaptiques et d'évaluer leur potentiel d'inversion. Le potentiel d'inversion d'un courant dépend du type d'ions qui passent aux travers des canaux qui sous-tendent ce courant et de la concentration d'ions de part et d'autre de la membrane plasmique. Ainsi, dans nos conditions expérimentales, les courants GABAergiques s'inversent autour de -50 mV. Cela signifie que le courant  $\text{Cl}^-$  est entrant (par convention, en fait les ions  $\text{Cl}^-$  sortent de la cellule) à des potentiels plus hyperpolarisés que -50 mV; il est nul ou très faible autour de -50 mV, et il est sortant (ions  $\text{Cl}^-$  entrent dans la cellule) à des potentiels plus dépolarisés que -50 mV. Les courants excitateurs exprimés par les neurones glutamatergiques dans nos cultures s'inversent autour de 0 mV. L'enregistrement des courants à trois voltages successifs (-60 ; -40 et -20 mV) suffit pour déterminer si les neurones sont GABAergiques ou glutamatergiques. La cinétique des courants autaptiques est également un bon indicateur du phénotype de la cellule. En effet, les courants GABAergiques sont plus lents à s'activer et à s'inactiver que les courants glutamatergiques (durée des courants GABAergiques de l'ordre de 100 à 200 ms, courants glutamatergiques de l'ordre de 10 à 50 ms). Malgré cela, si un doute persiste, il est possible de confirmer le phénotype de la cellule par l'ajout d'inhibiteurs comme le SR 95531 et le CNQX qui vont bloquer les récepteurs  $\text{GABA}_A$  et AMPA/Kaïnate, respectivement.

A contrario, il est plus difficile de déterminer le phénotype de cellules lors d'expériences effectuées en culture standard. En effet, nous sommes alors obligés de faire une détection *post hoc* du phénotype des cellules, ce qui peut être délicat. Il faut faire un marquage immunocytochimique puis retrouver la cellule qui a été enregistrée. Cela implique qu'à la fin de la période d'enregistrement, il faut retirer la pipette de patch qui était accolée à la

membrane tout en conservant l'intégrité de la cellule. Il faut également que la molécule qui sera marquée ne diffuse pas en dehors de la cellule dans la pipette de patch. Par exemple, le GABA qui nous sert de marqueur pour nos cellules est un acide aminé de très petite taille ; il peut donc passer dans la pipette par diffusion et se diluer dans le milieu intrapipette qui a un volume bien plus important que la cellule. Il est nécessaire ensuite de repérer la région de la lamelle où se trouve la cellule d'intérêt. Nous effectuons ceci grâce au dépôt de micro-billes fluorescentes. En effet, il est très difficile de retrouver une cellule précise sur une lamelle de verre qui en contient quelquefois des milliers. Les billes utilisées sont déposées par l'intermédiaire d'une pipette de patch montée sur le micro-manipulateur. Lorsque la pointe de la pipette qui contient les billes est à la bonne place (pas trop près car les billes pourraient abîmer la cellule, ni trop loin car on ne la retrouve plus parmi toutes celles environnantes) on brise le bout de la pipette, ce qui va libérer les billes. Celles-ci vont s'accrocher au substrat et former une plage fluorescente (visible en bleu lors d'une excitation en lumière UV) qu'il sera aisé de repérer. Après avoir réalisé le marquage immunocytochimique il faut retrouver le neurone et en déterminer visuellement le phénotype. Cette procédure est longue et comporte certains risques car il est possible de faire une fausse manœuvre à chacune de ces étapes et de détruire ainsi le neurone et donc l'expérience.

## 3. Patch-clamp

### 3.1 Principe de la technique de patch-clamp

La technique de patch-clamp a été mise au point par Sakmann et Neher à la fin des années 70 (Neher et Sakmann 1976). Elle permet d'étudier le comportement des canaux ioniques, à l'échelon élémentaire ou de la cellule entière, en isolant électriquement la portion de membrane considérée. Cette isolation est réalisée par la formation d'une zone de forte résistance électrique entre la pointe d'une pipette d'enregistrement et la membrane de la cellule. Cette résistance, appelée résistance de scellement ou "seal", est le point clef de la technique ; sa valeur dépasse le gigaohm (gigaseal). Le diamètre de la pointe de la pipette est de l'ordre du micromètre (figure 7); il est le plus souvent exprimé en terme de résistance électrique une fois la micropipette remplie de la solution d'expérience (de l'ordre du megaohm). La pipette est approchée de la membrane de la cellule à l'aide d'un micromanipulateur. Une pression positive est appliquée dans la pipette pendant ce temps afin d'éviter la contamination de sa pointe par des débris ou par le milieu extracellulaire. La pointe est alors appuyée délicatement sur la membrane de la cellule et une pression négative (aspiration) est appliquée qui permet de "sceller" la membrane. La qualité du scellement est estimée par la mesure de la résistance lors de l'application d'une brève dépolarisation

( $R_{\text{Seal}} = V_{\text{appliqué}} / I_{\text{mesuré}}$ ). Cette première configuration est dite "cellule attachée". A partir de celle-ci, plusieurs configurations de patch-clamp sont possibles. Les configurations cellule attachée, "inside out" et "outside out" sont utilisées pour enregistrer l'activité des canaux ioniques à l'échelon élémentaire. Au cours de ce travail de thèse, seule la configuration "cellule entière", qui permet d'enregistrer des courants globaux, a été utilisée (figure 6).

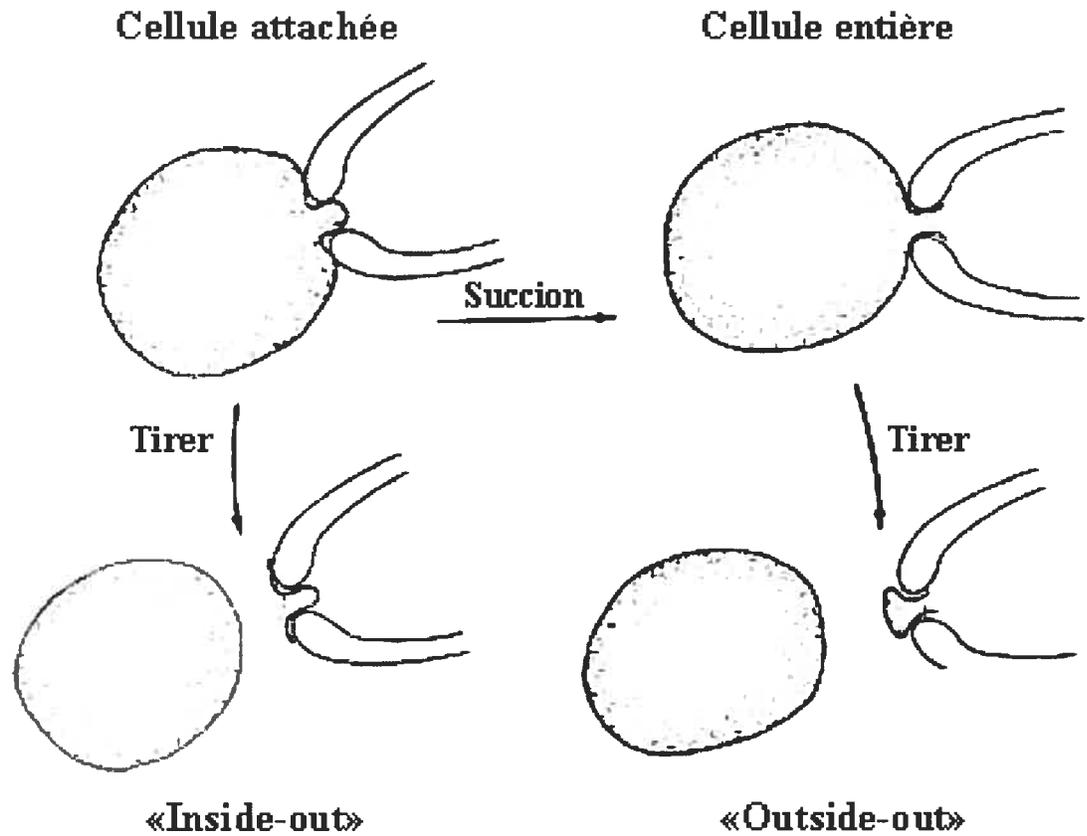


Figure 6 : Configurations pour les enregistrements de patch-clamp

Les différentes configurations sont issues de la position cellule attachée, lorsque le "seal" est suffisant (voir texte). Il est possible de passer aux autres configurations par étirement de la membrane ou par succion, ce qui va briser le "patch" de membrane inclus dans la pipette. Les enregistrements effectués pour ce travail ont tous été fait en configuration cellule entière. (Modifié de Hille 1992).

### 3.2 Patch clamp des neurones GABAergiques

Les micropipettes de patch clamp sont étirées à partir de verre de type borosilicate (figure 7) puis remplies de solution intrapipette (dont les compositions sont présentées dans les différents articles) et gardées sur glace. Leur résistance est comprise entre  $4,5 \text{ M}\Omega$  et  $6 \text{ M}\Omega$  une fois remplies. La configuration cellule entière est obtenue à partir de la configuration cellule attachée. Lorsque la résistance de scellement est supérieure à  $5 \text{ G}\Omega$ , une pression négative plus forte est appliquée dans la pipette et provoque la rupture de la portion de membrane isolée sous la pointe.

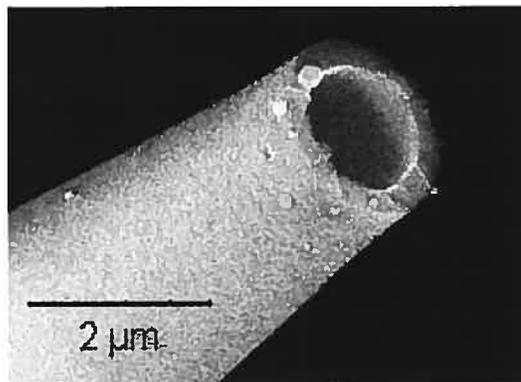


Figure 7 : Photographie d'une pipette de patch-clamp

Microscopie électronique à balayage de la pointe d'une pipette de patch-clamp. Tiré du site internet de Nanion Technologie (avec autorisation des auteurs)

L'expérimentateur a alors accès à deux paramètres. D'une part, la composition du milieu intracellulaire va, par diffusion, être progressivement remplacée par celle du milieu intrapipette. Ceci permet de contrôler la composition du milieu intracellulaire et également d'y appliquer des agents pharmacologiques. D'autre part, la configuration cellule entière permet de mesurer l'activité de l'ensemble des canaux ioniques présents sur la membrane de

la cellule. Cette configuration permet d'enregistrer des variations de potentiel (condition de courant imposé), mais également des courants ioniques dits "macroscopiques" qui résultent de l'ouverture de tous les canaux activés à un instant donné (t) et à un potentiel défini (v) (en condition de voltage imposé). La relation s'établit alors :  $I = N \times P_{o(t, v)} \times I$ , où : I est le courant macroscopique ; N, le nombre de canaux ;  $P_o$ , la probabilité d'ouverture d'un canal ionique à un instant t et à un potentiel V et i le courant élémentaire qui traverse un seul canal ionique. Cette configuration présente toutefois certains inconvénients. Le processus de "rundown" en particulier peut se révéler un facteur très limitant. Il consiste en la diminution progressive de l'amplitude des courants ioniques au cours du temps d'expérimentation. Le "rundown" est principalement dû au phénomène de "wash-out", c'est-à-dire à la dilution par le milieu intrapipette de composants du milieu intracellulaire indispensables au bon fonctionnement du canal ionique considéré.

Certaines impuretés dans le milieu extracellulaire ou des organites comme le noyau ou des fragments de membrane créent ce qu'on appelle la résistance d'accès. De plus, les compositions des milieux intrapipette et intracellulaire sont différentes et créent une zone de résistance à leur interface, ce qui participe aussi à la résistance d'accès. La résistance d'accès additionnée à la résistance de la pipette forment la résistance de série, qui est susceptible de limiter la qualité du potentiel imposé en particulier lors de l'étude de courants de grande amplitude. On compense partiellement (autour de 80 %) cet effet pour chaque enregistrement à l'aide d'un circuit électronique présent sur l'amplificateur de patch-clamp.

### **3.3 Dispositif expérimental**

Les lamelles de culture contenant les neurones sont placées sur la platine d'un microscope inversé. Elles sont perfusées en permanence par du liquide physiologique à température de la pièce. La pipette de patch-clamp est maintenue par un support fixé à la tête de l'amplificateur. L'ensemble (pipette.+ tête de l'amplificateur) est déplacé au moyen d'un micromanipulateur. Le dispositif repose sur une table antivibratoire et est intégré dans une cage de Faraday.

Les courants membranaires enregistrés au cours de cette thèse ont été mesurés selon deux modalités : Le courant et le voltage imposés. Les deux types de culture (standard et micro-goutte) présentés précédemment ont été exploités (figure 8).

#### **3.3.1 Application des solutions**

Les solutions baignant les cellules sont appliquées au moyen d'un système de perfusion gravimétrique multi-canaux. Le flux est réglé pour chaque canal à une valeur constante proche d'un millilitre par minute. Un système d'aspiration assure le renouvellement régulier du liquide et maintient un volume constant dans la chambre d'enregistrement. Les agents pharmacologiques sont dilués dans une solution saline physiologique et le renouvellement du milieu au niveau de la platine s'effectue en moins de 30 secondes.

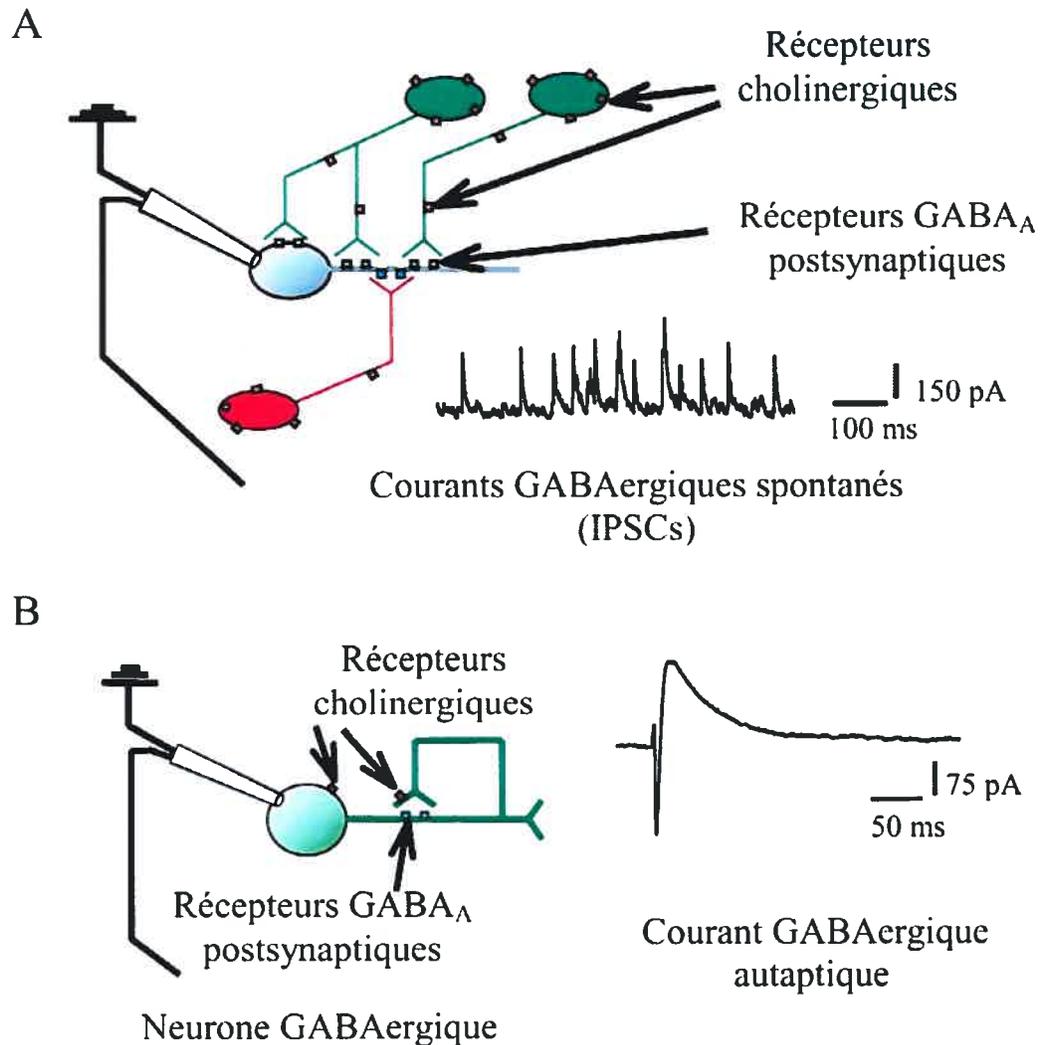


Figure 8 : Schéma du dispositif expérimental d'enregistrement en patch-clamp

- A) En culture standard, le neurone patché qui est de phénotype inconnu reçoit de multiples afférences excitatrices (rouge) et inhibitrices (vert). On peut isoler l'une ou l'autre par des agents pharmacologiques. A droite, on peut voir un enregistrement de courants postsynaptiques inhibiteurs spontanés.
- B) En culture micro-goutte, le phénotype de la cellule est connu. On peut induire des courants postsynaptiques autaptiques. On peut également étudier la régulation du taux de décharge de la cellule indépendamment de toute influence extérieure et donc évaluer certaines propriétés intrinsèques.

### 3.3.2 Le voltage imposé

Lors d'expériences en voltage imposé, on enregistre les courants qui passent à travers la membrane d'une cellule pendant que le potentiel de membrane ( $V_m$ ) est maintenu à une valeur fixe par l'expérimentateur. Le potentiel de membrane doit donc être constamment ajusté pour correspondre au potentiel choisi par l'expérimentateur ( $V_{cmd}$ ). Pour ce faire,  $V_m$  est continuellement mesuré et comparé à  $V_{cmd}$  à l'aide d'un système de rétrocontrôle électronique. Un courant est alors injecté à travers la membrane pour maintenir  $V_m$  au potentiel  $V_{cmd}$  désiré. La mesure de ce courant (généralement en picoampères) nous donne la valeur des courants qui passent par les canaux de la cellule enregistrée.

#### 3.3.2.1 *Courants post-synaptiques spontanés*

Cette configuration permet l'enregistrement de courants spontanés inhibiteurs (IPSCs en anglais) dans des cellules en culture primaire. Ces courants reflètent l'activation de récepteurs  $GABA_A$  postsynaptiques par suite de la libération synaptique du GABA par des neurones qui émettent des potentiels d'action spontanés. La fréquence de ces courants donne des informations sur le taux de décharge des neurones afférents.

#### 3.3.2.2 *Courants miniatures*

Si on ajoute de la tétródotoxine (TTX) au milieu de perfusion, les canaux sodiques dépendants du voltage sont inhibés, ce qui empêche la genèse des potentiels d'action et la libération massive et concertée de neurotransmetteur. Dans ces conditions, les terminaisons libèrent encore du neurotransmetteur de façon spontanée sans l'apport de calcium. Cette libération à partir de vésicules individuelles active un faible nombre de canaux post-synaptiques et évoque des courants dits "miniatures" ou minis (mIPSCs en anglais). L'amplitude de ces courants dépend des concentrations ioniques intra et extracellulaire et, dans nos conditions, était comprise entre 5 et 30 pA. La qualité du montage électrique du

poste d'enregistrement est cruciale lors de l'enregistrement de minis, car le bruit électrique ambiant capté par l'électrode d'enregistrement et l'ensemble du dispositif peut facilement dépasser 5 pA si la cage de Faraday n'est pas bien mise à la terre et/ou fait antenne. Le rapport signal/bruit doit donc être maximisé afin d'enregistrer des signaux le plus proche possible de la réalité sans distorsion due aux bruits électriques. Le signal électrique est filtré pour éliminer les parasites de haute fréquence (2 kHz et plus). L'amplitude des minis reflète la valeur des courants évoqués par la libération à partir de vésicules individuelles. La théorie quantique de la transmission synaptique suppose que la quantité de neurotransmetteur par vésicule est constante. Ce postulat autorise une statistique conforme à la loi de Poisson, de sorte qu'il est donc nécessaire de disposer d'un effectif d'événements suffisamment grand (une centaine est un nombre minimal raisonnable) pour appliquer la théorie. Celle-ci prévoit que l'amplitude des minis sera dépendante de l'état des récepteurs postsynaptiques puisque l'élément présynaptique (la quantité de neurotransmetteur libéré) est statistiquement constant. Comme nous le verrons dans l'article 3, cette caractéristique nous a permis de montrer que la clozapine inhibe les récepteurs canaux au GABA<sub>A</sub> postsynaptiques. Une variation de la fréquence des événements miniatures correspondra par contre à une modification de la quantité de vésicules libérées et donc à un phénomène présynaptique. Cependant, une telle interprétation des données de fréquence et d'amplitude des courants miniatures n'est pas toujours vraie, en raison de l'existence de synapses "silencieuses". Les synapses silencieuses sont définies comme étant des synapses qui apparaissent normales morphologiquement, mais appartiennent à des terminaisons non fonctionnelles, soit parce que leur neurotransmetteur n'est pas libéré lors de l'arrivée d'un potentiel d'action, soit parce que la membrane postsynaptique ne répond pas suite à la libération du neurotransmetteur (Malenka et Nicoll 1997). Ce type de synapse est impliqué par exemple dans le phénomène de potentialisation à long terme (LTP) dans l'hippocampe.

### 3.3.2.3 *Courant évoqué par libération exogène de GABA*

Une autre façon d'évaluer l'origine pré ou postsynaptique des variations de courant consiste à libérer localement un agoniste des récepteurs étudiés. Dans notre cas, nous avons libéré du GABA directement sur la cellule enregistrée grâce à un micro-injecteur

pneumatique qui éjecte la molécule à travers une pipette de patch remplie de GABA (500  $\mu\text{M}$ ). Pour éviter la dilution du contenu de la pipette, une légère pression positive est appliquée en permanence. L'amplitude des courants induits est, là encore, directement proportionnelle à l'état des canaux post-synaptiques, puisque la quantité d'agoniste libérée est constante au cours du temps. Ce type d'expériences nous a permis de conclure à la nature post-synaptique de la régulation induite par la clozapine (article 3), mais également d'impliquer un mécanisme présynaptique pour la régulation muscarinique des courants GABAergiques (article 1).

#### 3.3.2.4 *Courants autaptiques*

Le modèle de culture en micro-goutte permet de mesurer des courants autaptiques qui nous renseignent sur la régulation de la transmission synaptique. Les courants autaptiques évoqués sont induits par une courte dépolarisation du neurone, ce qui induit un potentiel d'action qui échappera au voltage imposé. Celui-ci se propage le long de l'axone et entraîne la libération du neurotransmetteur au niveau des synapses que forme le neurone avec ses propres prolongements. Cette libération de transmetteur va induire l'ouverture de récepteurs canaux et ainsi entraîner la genèse de courants post-synaptiques qui seront enregistrés et analysés subséquemment. La mesure de l'amplitude de ces courants autaptiques nous indique une variation de l'efficacité synaptique. L'étude de ces courants est complémentaire de celle des courants miniatures, car les minis nous renseignent sur les processus de régulation au niveau synaptique en aval de l'arrivée du potentiel d'action. En effet, la libération spontanée responsable des minis est en général indépendante du calcium. Une régulation présynaptique au niveau des canaux calciques voltage dépendants ou en amont sera mieux détectée par l'étude des courants autaptiques. Ceci constitue un avantage expérimental majeur puisqu'en culture standard il serait nécessaire d'enregistrer simultanément deux neurones connectés pour obtenir le même résultat (ce qui serait beaucoup plus difficile). De plus, les courants autaptiques ont des amplitudes supérieures aux courants pairs, car la connectivité (nombre de synapse) est plus grande étant donné l'unicité de la cible innervée.

### 3.3.2.5 *Courants calciques*

L'étude des courants calciques dépendants du voltage (VDCC) nécessite d'isoler ces courants par un cocktail pharmacologique incluant TTX (blocage des canaux  $\text{Na}^+$ ), le tetraethyl ammonium (TEA) et le  $\text{Cs}^+$  (blocage des canaux  $\text{K}^+$ ). Toutes les expériences sur les VDCC ont été réalisées sur des neurones en culture micro-goutte afin d'être sûr du phénotype de la cellule. Juste après avoir patché la cellule, nous avons appliqué du SR95531, qui bloque les canaux  $\text{GABA}_A$  et vérifié si la molécule avait un effet sur les courants autaptiques pour éliminer les neurones excitateurs. Nous avons ensuite appliqué la solution externe contenant les inhibiteurs cités plus haut. Des sauts de potentiels croissants successifs ont été induits par la suite pour construire des courbes montrant les courants évoqués en fonction du voltage (courbes I/V). Nous avons ensuite évalué l'effet des drogues cholinergiques sur l'amplitude des courants et le seuil d'ouverture des canaux calciques (voir article 2).

### 3.3.3 **Courant imposé**

Le courant imposé est une autre modalité d'enregistrement électrophysiologique. Le nom de courant imposé est donné en opposition à "voltage imposé" même s'il n'est pas réellement possible d'imposer un courant à travers les canaux ioniques de la cellule. Cette technique permet de mesurer la différence de potentiel de part et d'autre de la membrane plasmique. Cette valeur est exprimée en mV. Il est possible d'injecter en permanence un courant positif ou négatif afin de dépolariser ou d'hyperpolariser la cellule.

#### 3.3.3.1 *Mesure des potentiels d'actions*

Les enregistrements en courant imposé permettent de mesurer la fréquence et l'amplitude des potentiels d'action émis par la cellule. Ce phénomène étant de type "tout ou rien" une variation de l'amplitude des potentiels d'action traduit généralement une perte de signal due à la dégradation du seal et des conditions d'enregistrement (le noyau peut boucher la pipette, la cellule peut être endommagée, une dérive de la position de la pipette a entraîné une rupture totale ou partiel du seal...). Par contre, une variation de la fréquence

des potentiels d'action nous renseigne sur l'excitabilité de la cellule enregistrée. Là encore, le modèle de culture micro-goutte est fort utile, car il est possible de mesurer l'effet des agents pharmacologiques sur des cellules déjà identifiées comme étant GABAergiques.

### 3.3.3.2 *Mesure de $R_m$*

Les enregistrements en courant imposé permettent également de mesurer la résistance membranaire ( $R_m$ ) de la cellule, un paramètre qui reflète la capacité des ions à passer à travers la membrane. En admettant que le seal entre la pipette et la membrane est constant, toute ouverture (ou fermeture) de canal ionique va permettre un passage de moindre (ou de plus forte) résistance et une meilleure (moins bonne) circulation ionique. Si on injecte un courant constant dans la cellule, la loi d'Ohm indique que la différence de potentiel transmembranaire sera directement proportionnelle à  $R_m$ . Si  $R_m$  diminue (ouverture de canaux), la différence de potentiel diminuera et l'inverse si  $R_m$  augmente (fermeture de canaux). La cellule sera maintenue en dessous du seuil de déclenchement des potentiels d'action par l'injection de courants adéquats (le potentiel membranaire est généralement maintenu autour de  $-60$  mV), et l'injection de courant négatif (afin de ne pas déclencher l'ouverture de canaux dépendants du voltage) permettra de mesurer la différence de potentiel induite (figure 7). Avec ce type de protocole, il est possible de savoir si une molécule induit un changement du potentiel membranaire.

### 3.3.3.3 *Mesure de l'AHP*

Les enregistrements en courant imposé nous ont aussi permis d'étudier le phénomène d'hyperpolarisation consécutif au potentiel d'action ou after hyperpolarisation en anglais (AHP). Ce phénomène est sous la dépendance de canaux ioniques hyperpolarisants qui sont activés après le potentiel d'action, entre autres par la hausse du calcium intracellulaire induite par l'ouverture des VDCC. La régulation de l'AHP est importante car elle influe directement sur la capacité du neurone à développer un nouveau potentiel d'action (période réfractaire) et donc sur le taux de décharge des neurones. C'est pourquoi nous avons utilisé les enregistrements en courant imposé dans les expériences qui

couplait la mesure de  $R_m$  à celle de l'AHP : Les neurones autaptiques GABAergiques étaient polarisés à un potentiel proche du seuil de déclenchement des potentiels d'action (entre  $-50$  mV et  $-45$  mV), puis le courant hyperpolarisant permettant de mesurer  $R_m$  était injecté. Après un court temps de récupération, une brève dépolarisation membranaire entraînait la genèse d'un potentiel d'action unique. L'amplitude de l'AHP était ensuite mesurée (figure 9).

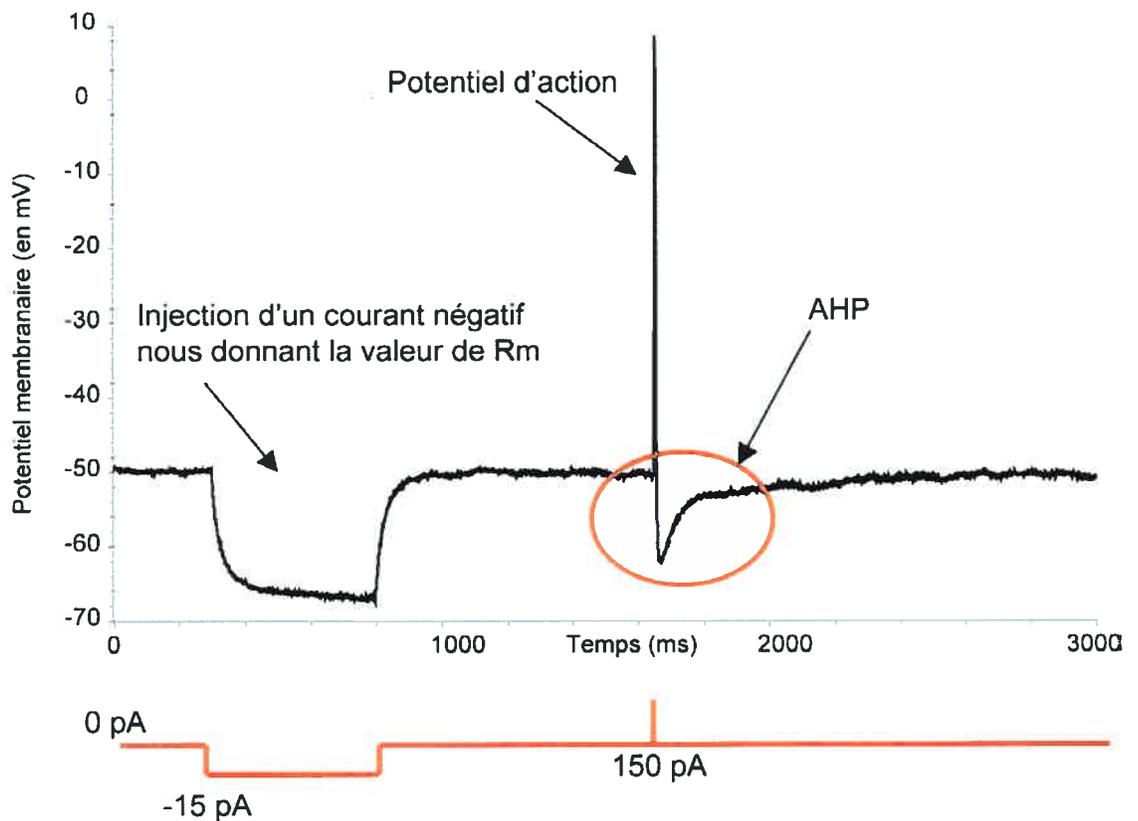


Figure 9 : Exemple de trace du protocole d'enregistrement de l'AHP et de  $R_m$

En rouge : schéma représentant le courant injecté dans la cellule au cours du temps. Les variations de  $R_m$  sont mesurées par l'amplitude de la différence de potentiel évoquée par l'injection d'un courant négatif de  $-15$  pA pendant 0,5 seconde. Le potentiel d'action est déclenché 1,6 seconde après le début de l'enregistrement par l'injection d'un courant positif de 150 pA.

## 4. Mesure de la concentration intracellulaire de calcium

### 4.1 Principe de la technique

Les techniques électrophysiologiques nous permettent d'évaluer le passage de molécules chargées de part et d'autre de la membrane. La mesure des concentrations ioniques intracellulaires n'est cependant pas accessible par ces techniques. Les ions calcium, en particulier, constituent un second messager impliqué dans un grand nombre de fonctions neuronales (Rizzuto 2001). De nombreux indicateurs de la concentration en calcium intracellulaire sont disponibles. Ces indicateurs sont répartis en trois groupes : *i*) Les photoprotéines tel que l'æquorine, qui émettent de la lumière lorsqu'elles sont liées au calcium. *ii*) Les indicateurs fluorescents du calcium tels que l'indo-1 et le Fura-2. *iii*) Les protéines fluorescentes sensibles au calcium, qui fonctionnent par association entre une protéine fluorescente et la calmoduline (Brownlee 2000). Les indicateurs fluorescents sont largement utilisés, en particulier parce qu'ils ne nécessitent pas l'utilisation des techniques de micro-injection ou de transfection des cellules. En effet, ces sondes sont disponibles sous la forme d'acétoxyméthylesters (AM) liposolubles, qui pénètrent dans la cellule et sont clivés par les estérases cellulaires en une forme hydrosoluble séquestrée dans le cytoplasme. Ces sondes sont construites par l'association d'un fluorophore et d'une structure moléculaire analogue à celle des agents chélateurs des ions calcium comme l'EGTA et le BAPTA (figure 10) (Grynkiewicz 1985 ; Brownlee 2000).

Les propriétés optiques de la sonde sont modifiées par la liaison du calcium. Afin de mesurer la concentration réelle en calcium intracellulaire, la sonde doit permettre de distinguer la forme libre de la forme liée au calcium. Les sondes qui permettent ce type de mesure sont dites ratiométriques, c'est le cas notamment de l'indo 1 et du Fura-2. Dans ce cas, la liaison du calcium à la sonde modifie non seulement son intensité de fluorescence mais également ses propriétés spectrales (figure 11).

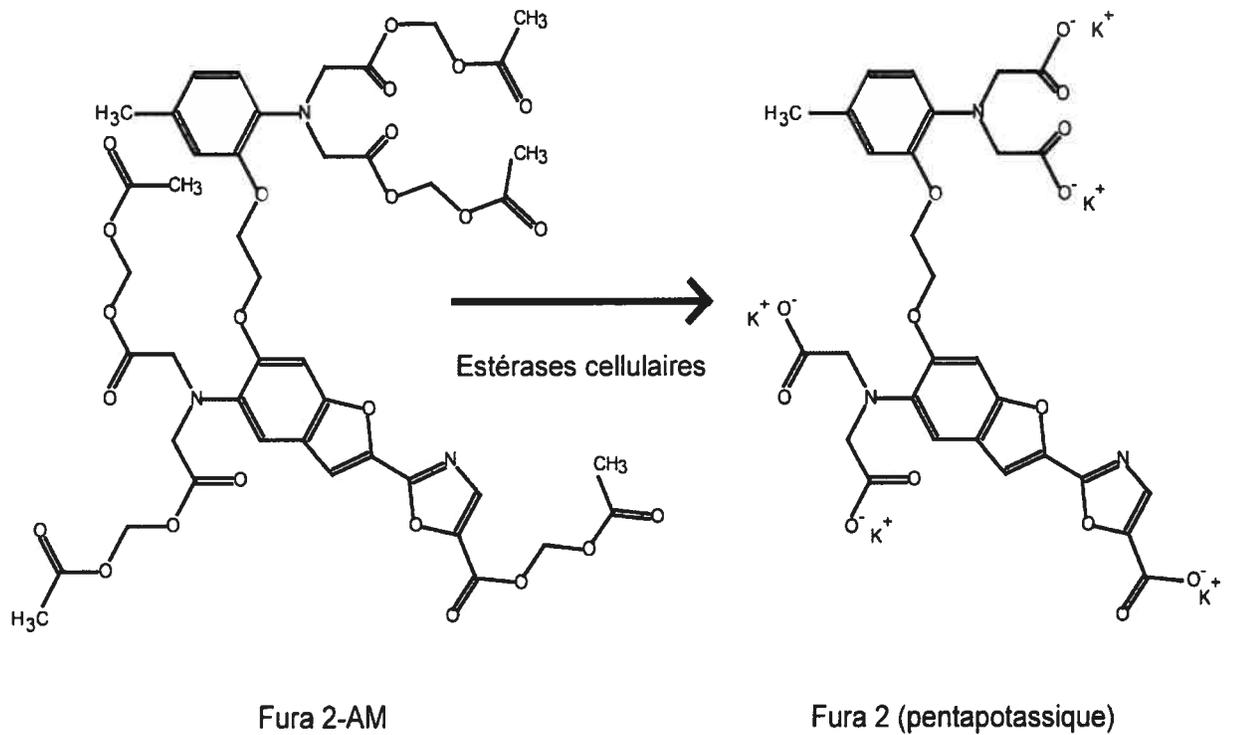


Figure 10: Structures chimiques du Fura-2

Le Fura-2-AM (forme liposoluble ; acétoxyméthylée) et le Fura-2 (forme hydrosoluble). La sonde est rendue hydrosoluble sous l'action des estérases cellulaires (d'après Grynkiewicz 1985).

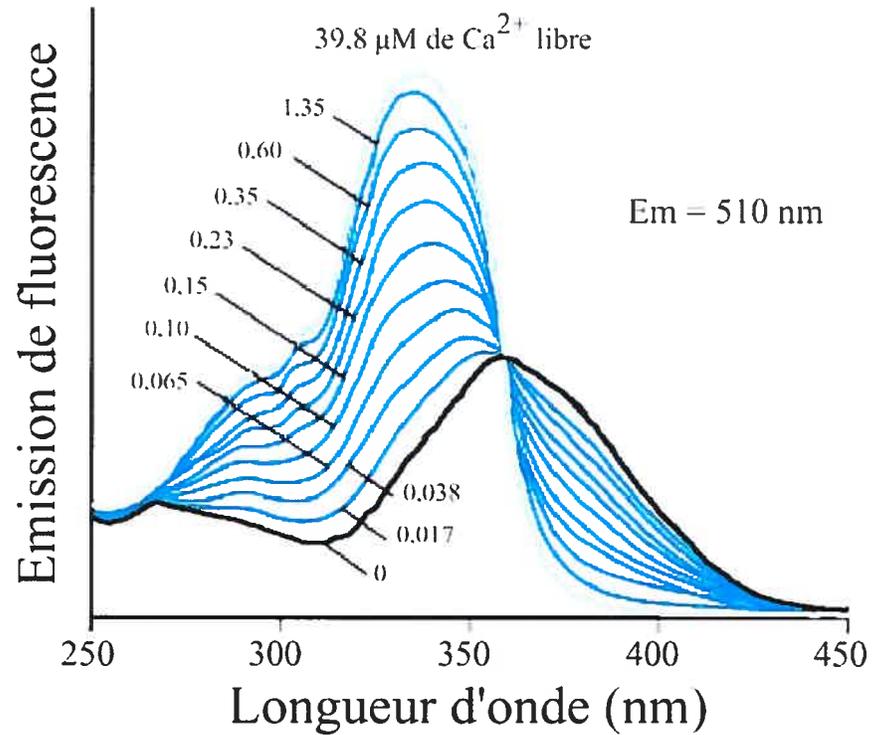


Figure 11 : Spectre d'excitation du Fura-2 en fonction de la  $[Ca^{2+}]_i$

Lorsque la concentration en calcium augmente, la fluorescence émise décroît pour des longueurs d'onde d'excitation supérieures à 360 nm et augmente dans les valeurs inférieures à 360 nm. L'intensité de fluorescence émise est exprimée en unités arbitraires à 510 nm (modifié d'après Grynkiewicz 1985).

## 4.2 Utilisation d'une sonde ratiométrique : le Fura-2

La sonde que nous avons utilisée pour les mesures de calcium intracellulaire sur les neurones en culture standard, le Fura-2, permet les mesures ratiométriques. Cette sonde est dite "double excitation/simple émission". La sonde libre présente un maximum d'émission pour des longueurs d'onde d'excitation supérieures à 360 nm. Inversement, lorsque la sonde est liée au calcium, le maximum d'émission se déplace vers des longueurs d'onde d'excitation inférieures à 360 nm. Deux longueurs d'ondes d'excitation ( $\lambda_{ex}$ ) sont utilisées. Dans les deux cas, la fluorescence est émise dans le visible et enregistrée à une même longueur d'onde centrée autour de 510 nm. Un rapport (R) est alors calculé entre la fluorescence émise lors de l'excitation à 340 nm et à 380 nm. L'évolution de ce rapport permet de quantifier directement les variations de la concentration en  $Ca^{2+}$  intracellulaire. L'utilisation d'une sonde ratiométrique est intéressante car elle permet de s'affranchir des problèmes de "photo-bleaching", c'est-à-dire d'une dégradation de la sonde due à l'excitation lumineuse. Une sonde non-ratiométrique va se dégrader petit à petit et le signal diminuer au cours de l'expérience. Avec le Fura-2, la mesure de concentration de  $Ca^{2+}$  dépend du ratio entre les parties de la molécule, libres et liées au  $Ca^{2+}$  lequel n'est pas affecté par une éventuelle baisse générale du signal fluorescent (figure 12).

Afin de déterminer la concentration réelle en calcium correspondant à R, les propriétés de la sonde dans les conditions expérimentales doivent être déterminées. Le procédé de calibration consiste à mesurer R lorsque toute la sonde est libre ( $R_{min}$ ) ou liée au calcium ( $R_{max}$ ). Pour mesurer  $R_{min}$ , on incube les cellules avec une solution saline sans calcium et on perméabilise les cellules avec l'ionomycine, qui crée des ports sélectifs pour le calcium à travers la membrane. Le calcium intracellulaire diffuse dans le milieu extracellulaire et la sonde devient libre de tout calcium. Pour la mesure de  $R_{max}$ , nous suivons la même procédure mais dans un milieu qui contient une concentration saturante de calcium, de telle sorte que toutes les molécules de Fura-2 sont complexées.

L'équation suivante permet alors de déterminer la concentration en calcium intracellulaire (Grynkiewicz 1985) :

$$[Ca^{2+}] = K_d \times \left( \frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R} \right) \left( \frac{Sf_{380}}{Sb_{380}} \right)$$

où :  $K_d$  est la constante de dissociation de la sonde pour le calcium (225 nM pour le Fura 2);  $R_{\min}$  est la valeur de  $R$  lorsque la sonde est totalement libre,  $R_{\max}$  lorsqu'elle est totalement liée au calcium;  $Sf_{380}$  est la fluorescence mesurée à 380 nm pour la sonde libre et  $Sb_{380}$  pour la sonde liée au calcium. Le rapport  $Sf_{380}/Sb_{380}$  est également noté  $\beta$ .

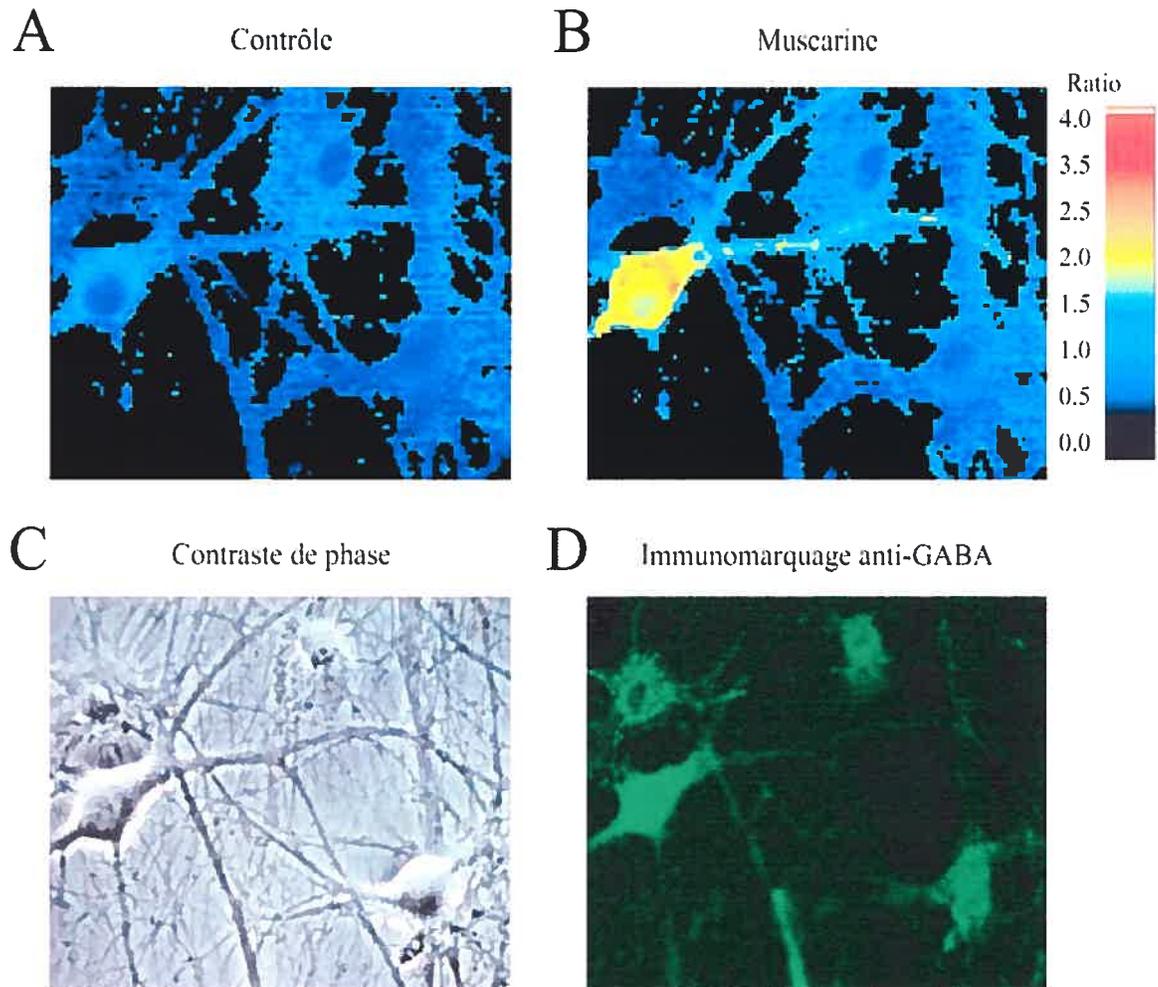


Figure 12: Exemple de l'effet de la muscarine sur la  $[Ca^{2+}]_i$

- A) Champs microscopiques de neurones chargés en Fura-2 en condition contrôle.
- B) Champs identique en présence de muscarine
- C) Champs identique en contraste de phase
- D) Champs identique après marquage immunofluorescent avec un anticorps dirigé contre le GABA révélé par un anticorps secondaire couplé à l'Alexa-488.

### 4.3 Identification des cellules

Notre étude porte sur les neurones GABAergiques du mésencéphale ventral. Or, comme nous l'avons vu précédemment, cette population de neurones est minoritaire tant *in vivo* qu'*in vitro*. Nous avons testé plusieurs techniques afin d'identifier les neurones sur lesquels les expériences ont été effectuées (au début des expériences ou à posteriori).

#### 4.3.1 Électrophysiologie

Nous avons vu que les neurones DAergiques et GABAergiques ont des propriétés électrophysiologiques différentes *in vivo*. Cependant, des expériences préliminaires effectuées dans notre laboratoire par le Dr Patrice Congar ont montré que ces caractéristiques ne permettaient pas de distinguer *in vitro* les deux types de cellules avec un degré suffisant de certitude. Par contre, il est possible de connaître le type de cellule étudié par un protocole de double patch : Il faut patcher deux cellules en même temps et voir le type de réponses postsynaptiques qu'elles évoquent l'une sur l'autre, ce qui permet de différencier les cellules inhibitrices des cellules excitatrices. Les réponses synaptiques sont alors beaucoup plus faibles, lorsqu'elles existent, en culture standard qu'en culture microgoutte. Il faut de plus qu'une des cellules soit GABAergique pour commencer l'expérience. Si, au cours du processus, une cellule est perdue, il faut recommencer depuis le début, ce qui peut être relativement long et peu efficace. L'utilisation de cellules en culture microgoutte permet d'identifier avec certitude le phénotype des cellules patchées en début d'expérience de façon beaucoup plus simple comme nous l'avons déjà expliqué.

### 4.3.2 Transfection

Une autre méthode d'identification développée dans le laboratoire fait appel aux techniques de biologie moléculaire. En effet, on peut tirer avantage de notre modèle de culture primaire pour transfecter les cellules avec un plasmide contenant la séquence d'une protéine facilement détectable (GFP pour green fluorescent protein) sous le contrôle d'un promoteur spécifique du type cellulaire recherché (Jomphe et al. 2001 ; St-Gelais et al., soumis). Pour ce faire, nous avons reçu, de différents laboratoires, des constructions plasmidiques avec la GFP sous le contrôle du promoteur de la tyrosine hydroxylase, du DAT (spécifique des neurones DAergiques) ou de la décarboxylase du glutamate (GAD - spécifique des neurones GABAergiques). J'ai effectué la mise au point et la validation des protocoles d'amplification et de purification des plasmides. Nous les avons ensuite insérés dans les cellules en culture (2 jours après la mise en culture) par la méthode de transfection par précipitation au phosphate de calcium. Les neurones transfectés (généralement entre 1 % et 5 %) expriment la protéine jusqu'à une semaine. Ce procédé fonctionne en routine au laboratoire pour les neurones DAergiques. Hélas, nous n'avons pas réussi à avoir des résultats suffisamment fiables avec les neurones GABAergiques pour l'utiliser efficacement dans notre projet. Les essais ont été effectués par Philippe Martel dans le cadre d'un stage d'été sous ma direction.

### 4.3.3 Immunocytochimie

La dernière modalité d'identification du phénotype des neurones en culture consiste à faire des marquages immunocytochimiques. Pour cela, nous utilisons des anticorps qui sont dirigés contre des protéines (mais il est possible d'avoir des anticorps contre d'autres molécules, comme le GABA, par exemple) et qui vont se lier très sélectivement et de façon quasiment irréversible à la molécule d'intérêt. Ce type d'identification nécessite généralement une fixation chimique des tissus. Nous ne pouvons donc effectuer ces marquages qu'en fin d'expérience. Nous avons également utilisé les marquages immunocytochimiques afin de détecter la présence de diverses protéines dans les cellules en culture.

#### 4.3.3.1 *Types d'anticorps*

Il existe deux types d'anticorps : monoclonaux et polyclonaux

Les anticorps monoclonaux, comme leur nom l'indique, sont issus d'un clone, c'est-à-dire d'une lignée de lymphocytes mise en culture et sélectionnée pour sa capacité à produire des anticorps contre une protéine d'intérêt. Le principal avantage de ce type d'anticorps est sa grande spécificité puisqu'un seul épitope est visé, ce qui entraîne un faible bruit de fond.

Les anticorps polyclonaux proviennent de plusieurs clones de lymphocytes, car ils sont extraits du sérum sanguin d'un animal qui a été immunisé contre la molécule d'intérêt. Le lapin est l'animal le plus utilisé, mais on trouve des anticorps venant de multiples espèces, comme l'âne, le mouton et même le poulet. Ces anticorps sont purifiés par colonne d'affinité à partir du sérum de l'animal qui subit des prises de sang régulièrement. La spécificité du marquage obtenu peut être moins bonne que pour les anticorps monoclonaux et donc induire davantage de bruit de fond. Par contre, la puissance de marquage est supérieure, car plusieurs épitopes sont visés et les chances pour que tous ne soient pas accessibles sont beaucoup plus faibles. Cependant, dans la pratique, nous pouvons constater que ces caractéristiques sont plutôt théoriques : il existe d'excellents anticorps monoclonaux et de mauvais anticorps polyclonaux. Chaque animal et chaque lignés lymphocytaire est unique ; il y a donc aussi des variations selon le lot du produit qui est fourni dans le commerce.

#### 4.3.3.2 Révélation

La fixation de l'anticorps à sa cible ne suffit pas à mettre celle-ci en évidence ; il faut utiliser ensuite un système de révélation. Le plus utilisé au laboratoire est un système d'anticorps secondaires couplés chimiquement à un fluorophore. Un anticorps secondaire est un anticorps créé chez un autre animal que l'hôte du premier anticorps (généralement la chèvre) et qui est dirigé contre les immunoglobulines de ce premier animal. Par exemple, un anticorps anti-lapin produit chez la chèvre couplé à la rhodamine, une molécule fluorescente qui émet dans le rouge quand elle est excitée avec de la lumière verte. Il est possible de coupler l'anticorps secondaire à différents fluorophores qui émettent à différentes longueurs d'onde. Il est donc possible de faire des doubles voir des triples marquages sur la même préparation, en autant que les anticorps soient disponibles et issus d'animaux compatibles. La molécule couplée à l'anticorps secondaire peut également être une enzyme qui va catalyser une réaction chimique aboutissant à la formation d'un précipité coloré. Un exemple très utilisé est un couplage de la peroxydase à l'anticorps secondaire. En présence de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) cette enzyme va produire des radicaux libres qui vont induire un précipité marron de la diamino-benzidine (DAB). Nous avons utilisé cette procédure en double-marquage avec le deuxième anticorps secondaire couplé à la fluoresceine (FITC) qui émet dans le vert (voir figure 10 pour un exemple de double-marquage FITC-Rhodamine).

#### 4.3.3.3 Types d'anticorps utilisés

Lors des diverses séries d'expériences réalisées au cours de ce doctorat, nous avons utilisé différents anticorps dans le but de déterminer le phénotype des cellules sur lesquelles des expériences d'imagerie ou d'électrophysiologie ont été réalisées, mais aussi dans le but de détecter l'expression de différentes protéines d'intérêt (voir tableau 2).

| Cible                            | Type         | Commentaires   |
|----------------------------------|--------------|--|
| Tyrosine hydroxylase (TH)        | Mono et Poly | La TH étant une protéine très exprimée, les marquages ne posent pas de problèmes   |
| GABA                             | Mono et Poly | Le marquage contre le GABA pose plusieurs problèmes : L'anticorps monoclonal disponible dans le commerce est de mauvaise qualité et a longtemps été le seul anticorps disponible. Le GABA est présent à un faible niveau dans tous les types cellulaires ce qui augmente le bruit de fond et les faux positifs. Ceci nécessite une attention particulière dans l'observation et l'interprétation des marquages.  |
| Décarboxylase du glutamate (GAD) | Mono         | L'utilisation d'un anticorps contre la GAD (qui donne de très bon marquage) peut sembler être la réponse aux problèmes évoqués pour le GABA. Cependant, cette enzyme est concentrée dans les prolongements neuronaux et n'est généralement pas détectable au niveau somatique. Il est impossible d'attribuer l'origine des terminaisons marquées à un neurone particulier. Seules les cellules en culture isolée (micro-goutte) permettent de profiter de l'efficacité de cet anticorps. |
| Récepteurs muscariniques M3      | Poly         | Les récepteurs membranaires n'étant pas très exprimés et l'anticorps pas très performant (bruit de fond important), le marquage, bien que positif, a été difficile à obtenir.  |
| Récepteurs muscariniques M5      | Poly         | L'anticorps étant encore moins bon que pour le M3, nous n'avons pas réussi à trouver les conditions qui auraient permis un ratio signal/bruit suffisant pour avoir un marquage convaincant, malgré des données bibliographiques qui indiquent que ce récepteur est exprimé par les neurones VTA/SN.  |
| TRPC1                            | Poly         | Le marquage est distribué sur le soma et les prolongements de tous les neurones.   |
| TRPC3                            | Poly         | Le marquage est purement somatique (voire nucléaire) des neurones et des astrocytes.   |
| TRPC4                            | Poly         | Pas de marquage visible.   |
| TRPC5                            | Poly         | Le marquage est distribué sur le soma et les prolongements de tous les neurones et le corps cellulaire des astrocytes.   |
| TRPC6                            | Poly         | Le marquage est plutôt somatique mais atteint tout de même les prolongements des neurones. Les astrocytes sont également marqués.  |

Tableau 2 : Description des différents anticorps utilisés lors de ce travail

Poly = anticorps polyclonaux (tous sont issus de lapins), Mono = anticorps monoclonaux (souris). TRPC : canaux cationiques activés par des récepteurs ou par une augmentation du calcium cytoplasmique (Transient receptor potentiel C) (voir discussion).

## Problématique

*La description physiologique des neurones GABAergiques du mésencéphale ventral est très succincte. Pourtant, un certain nombre de données anatomiques, physiologiques et biochimiques démontrent un rôle potentiel fondamental de ces interneurons dans la régulation du système DAergique. Nous nous sommes donc proposés d'approfondir les connaissances de ce type de cellule et des systèmes qui les régulent. En particulier, nous avons choisi d'étudier l'influence de l'activation des récepteurs nicotiques et muscariniques. En effet, l'afflux préférentiel de projections cholinergiques sur ces interneurons GABAergiques nous laissait prévoir un rôle régulateur fondamental de ce système. Dans un deuxième temps, étant donné que le système DAergique semble être la cible principale des antipsychotiques et que leur mode d'action est loin d'être élucidé, nous avons exploré la possibilité que la clozapine (un antipsychotique atypique) puisse exercer une partie de ses effets par l'intermédiaire d'une régulation de l'activité GABAergique au sein du mésencéphale ventral.*

## Résultats

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, l'influence des neurones GABAergiques intrinsèques aux noyaux DAergiques a été peu étudiée. Pourtant, de nombreuses données tendent à les impliquer dans les différentes pathologies associées aux dérèglements des noyaux DAergiques. Nous nous sommes concentrés sur le fait que les afférences cholinergiques du tronc cérébral innervent préférentiellement ces neurones GABAergiques. Dans un premier temps, nous avons évalué les effets physiologiques de l'activation des récepteurs nicotiniques et muscariniques sur ces neurones. Cette étude est décrite dans le premier article. Nous y démontrons que l'activation de ces deux types de récepteurs a un effet excitateur et induit une hausse du taux de décharge des neurones GABAergiques.

Dans le deuxième article, nous avons approfondi l'étude des voies de transduction impliquées dans les réponses muscariniques. En particulier, nous avons démontré l'implication du récepteur M3. Au cours de cette étude, nous avons montré que l'activation de ces récepteurs entraîne un influx de calcium issu du milieu extracellulaire par un mécanisme dépendant de la protéine kinase C. La hausse de calcium passe par l'ouverture de canaux perméables au calcium qui font probablement partie de la famille des canaux TRP (*transient receptors potential*). La description des modalités d'action des agonistes muscariniques sur les neurones GABAergiques du mésencéphale ventral révèle autant de cibles potentielles de régulation de l'activité inhibitrice au sein des noyaux DAergiques et par là même de nouvelles avenues thérapeutiques.

Le mode d'action précis de la clozapine est encore inconnu. Cet agent pharmacologique est connu pour sa forte affinité à l'égard de nombreux récepteurs cellulaires. Son affinité pour les récepteurs muscariniques notamment (M1 en particulier) est de l'ordre du nanomolaire. Nous avons donc décidé d'étudier les effets potentiels de cette molécule sur les neurones GABAergiques, tel qu'exposé dans le troisième article. Nous avons prouvé que la clozapine inhibe les courants GABAergiques postsynaptiques de façon dose dépendante. Cet effet inhibiteur est significatif à partir d'une concentration de 10  $\mu$ M, ce qui représente une dose compatible avec celles retrouvées dans le cerveau de patients schizophrènes sous traitement. L'inhibition des canaux GABA<sub>A</sub> par la clozapine pourrait contribuer aux effets secondaires et/ou thérapeutiques de ce médicament.

## Contribution des co-auteurs

En tant que premier auteur de chacun des trois articles présentés dans cette thèse, je suis le principal contributeur de l'ensemble de ces travaux. J'ai ainsi pris en charge l'ensemble des expériences présentées ainsi que leurs analyses et la rédaction des articles. Ces travaux ont été effectués sous la direction du Dr Louis-Eric Trudeau qui m'a beaucoup aidé dans le choix des expériences ainsi que pour leurs modes opérationnels. Il a également contribué à l'interprétation des résultats et à la rédaction des articles. D'autres personnes ont participé à la production du deuxième article présenté ici :

Gabriel Fortin a effectué les immunomarquages avec les anticorps dirigés contre les canaux TRPC ainsi que les images en microscopie confocale se rapportant à ces marquages (Article 2, figure 8). Il a également contribué de manière significative à la correction des manuscrits des deux premiers articles.

Philippe Martel a produit les enregistrements électrophysiologiques des courants calciques (Article 2, figure 6). Ces travaux ont été effectués sous ma direction dans le cadre d'un stage d'été.

Julie Robillard a effectué les expériences impliquant les canaux GIRK dans l'effet de la muscarine en présence de BAPTA, ainsi que celles excluant l'implication de canaux potassiques dépendant du voltage en absence de BAPTA (article 1, fig 5C et 5D).

Le Dr John Yeomans nous a fourni les souris knock-out pour le récepteur M5 et a contribué à la correction des deux premiers manuscrits.

## **Article 1 : Regulation of rat mesencephalic GABAergic neurons through nicotinic and muscarinic receptors**

L'introduction de cette thèse nous a permis de mettre en évidence les interactions entre les systèmes DAergiques et cholinergiques. Les neurones GABAergiques intrinsèques des noyaux DAergiques semblent participer à ces interactions. Nous avons donc étudié l'effet de l'activation des récepteurs cholinergiques sur les propriétés physiologiques des interneurons GABAergiques du mésencéphale ventral en culture. Les résultats de cette étude sont présentés dans l'article 1. Pour résumer, nous y démontrons que l'activation des récepteurs tant nicotiniques (probablement de type  $\alpha 4\beta 2$ ) que muscariniques (probablement de type M3 et M5) a un effet excitateur sur les neurones GABAergiques. En particulier, nous montrons que les récepteurs muscariniques induisent une hausse du taux de décharge des neurones GABAergiques par un mécanisme dépendant de la  $[Ca^{2+}]_i$  et qui est accompagné par une légère dépolarisation membranaire. L'activation des récepteurs muscariniques n'influence pas la résistance membranaire de façon détectable, ce qui implique que la dépolarisation observée est due à l'ouverture de canaux de très faible conductance. L'augmentation du taux de décharge n'est pas due à un changement des propriétés de la dépolarisation consécutive au potentiel d'action (AHP) ni à un effet sur les canaux potassiques dépendants du voltage. Enfin, l'activation des récepteurs muscariniques entraîne une baisse de l'amplitude des courants synaptiques GABAergiques évoqués. Le mécanisme impliqué dans cette inhibition se situe en amont de l'ouverture des canaux calciques dépendants du voltage dans la chaîne d'événements conduisant à l'exocytose du neurotransmetteur comme l'atteste l'absence d'effets de la muscarine sur les courants miniatures inhibiteurs. La faible conductance des canaux impliqués ainsi que l'intervention centrale du calcium dans les phénomènes observés, nous ont conduit à proposer un rôle important des canaux de type TRP, une famille de canaux cationiques activés par les RCPG plutôt sélectifs pour les ion  $Ca^{2+}$ .

**Regulation of rat mesencephalic GABAergic neurones through nicotinic  
and muscarinic receptors.**

François J. Michel, Julie Robillard and Louis-Éric Trudeau\*

Département de Pharmacologie, Centre de Recherche en Sciences Neurologiques, Faculté  
de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7.

\*: to whom correspondence should be addressed at:

Département de Pharmacologie  
Faculté de Médecine  
Université de Montréal  
C.P. 6128, Succursale Centre-Ville  
Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7  
Tel. 1-514-343-5692  
Fax. 1-514-343-2291

Running title: Regulation of mesencephalic GABAergic neurones

Assignment: Cell physiology

## Summary

Central dopamine neurones are involved in regulating cognitive and motor processes. Most of these neurones are located in the ventral mesencephalon where they receive abundant intrinsic and extrinsic GABAergic input. Cholinergic projections, originating from mesopontine nuclei, project profusely in the mesencephalon where they preferentially synapse onto local GABAergic neurones. The physiological role of this cholinergic innervation of GABAergic neurones remains to be determined, but these observations raise the hypothesis that ACh may regulate dopamine neurones indirectly through GABAergic interneurones. Using a mesencephalic primary culture model, we studied the impact of cholinergic agonists on mesencephalic GABAergic neurones. ACh increased the frequency of spontaneous IPSCs ( $151 \pm 49$  %). This effect involved both nicotinic and muscarinic receptors. Selective activation of muscarinic receptors increased the firing rate of isolated GABAergic neurones by  $67 \pm 13$  %. The enhancement in firing rate was  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent because inclusion of BAPTA in the pipette blocked it, actually revealing a decrease in firing rate accompanied by membrane hyperpolarization. In addition to its excitatory somatodendritic effect, activation of muscarinic receptors also acted presynaptically, inhibiting the amplitude of unitary GABAergic synaptic currents. Both the enhancement in spontaneous IPSC frequency and presynaptic inhibition were abolished by 4-DAMP (100 nM) a preferential M3 muscarinic receptor antagonist. The presence of M3-like receptors on mesencephalic GABAergic neurones was confirmed by immunocytochemistry. Taken together, these results demonstrate that mesencephalic GABAergic neurones can be regulated directly through cholinergic receptors. Our findings provide new data that should be helpful to better understand the influence of local GABAergic neurones during cholinergic activation of mesencephalic circuits.

## Key words

Presynaptic, primary culture, dopamine, excitability.

## Introduction

The central dopaminergic system regulates major physiological functions such as motivation, mood, cognition and motor behaviour. It is also implicated in the pathophysiology of schizophrenia, drug dependence and Parkinson's disease (Nestler & Aghajanian, 1997; Grace, 1991; Kalivas, 1993). The fine tuning of the firing rate of dopamine neurones is important in the regulation of dopamine (DA) release in projection areas, namely the nucleus accumbens, dorsal striatum and prefrontal cortex (Suaud-Chagny *et al.*, 1992). Most dopaminergic cell bodies are localized in the substantia nigra (SN) and the ventral tegmental area (VTA), two nuclei located in the ventral part of the mesencephalon (Dahlstrom & Fuxe, 1964). These structures receive monoaminergic, cholinergic, glutamatergic as well as GABAergic afferents (Clarke *et al.*, 1987; Walaas & Fonnum, 1980; Grenhoff *et al.*, 1993). The GABAergic input to dopamine neurones arises from striatal projection neurones but also from GABAergic neurones that are intrinsic to the ventral mesencephalon. The VTA and SN contain about 75-85 % dopamine neurones and 15-25 % GABAergic neurones (Bayer & Pickel, 1991; Johnson & North, 1992b). Although many of these are concentrated in the reticulata part of the SN, others are dispersed amongst the dopamine neurones and are difficult to identify. GABAergic interneurones are in a privileged position to regulate the activity of dopamine neurones. In addition, other evidence suggests that dopamine neurones are under tonic regulation by GABAergic afferents (Westerink *et al.*, 1996; Wolf *et al.*, 1978). The physiological importance of such local GABAergic input to dopamine neurones is well illustrated by the excitatory action of opioids on dopamine neurones. This excitation depends on inhibition of the firing rate of GABAergic interneurones due to the activation of  $\mu$ -type receptors that are expressed selectively on these neurones in VTA/SN region (Johnson & North, 1992a). The regulation of VTA GABAergic neurones by  $\mu$ -opioid receptors has also been observed in a primary culture system (Bergevin *et al.*, 2002), under conditions where direct effects of pharmacological agents on GABAergic neurones are more easily detected.

Cholinergic receptors control GABA release in several structures of the CNS (Baba *et al.*, 1998; Guo & Chiappinelli, 2000; Xu *et al.*, 2001) including the VTA (Erhardt *et al.*, 2002; Mansvelder *et al.*, 2002; Grillner *et al.*, 2000). The majority (65 %) of cholinergic projections from mesopontine nuclei (laterodorsal and pediculopontine tegmentum: LDT and PPT, respectively) impinge on DA transporter-negative neurones (presumed GABAergic neurones) (Garzon *et al.*, 1999). This preferential innervation suggests the hypothesis that acetylcholine (ACh) may exert its action on dopamine neurones at least in part by affecting local GABAergic neurones. ACh can act through nicotinic ionotropic receptors or through muscarinic G-protein coupled receptors. Previous studies using single-cell RT-PCR have shown the expression of various nicotinic receptor subunits in GABAergic ( $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$ ,  $\beta_2$  and  $\beta_3$  subunits) and dopamine ( $\alpha_3$  to  $\alpha_7$  and  $\beta_2$  to  $\beta_4$  subunits) neurones of the VTA (Charpantier *et al.*, 1998; Klink *et al.*, 2001). Of the five cloned muscarinic receptors, only M3 and M5 mRNA have been detected in the ventral midbrain (Vilaro *et al.*, 1990; Weiner *et al.*, 1990). M2, M3, M4 and M5 immunolabelling or binding have also been reported (Levey, 1993; Zubieta & Frey, 1993). The specific cellular localization of muscarinic receptors in the mesencephalon has not yet been explored (Vilaro *et al.*, 1990; Zubieta & Frey, 1993). The activation of cholinergic receptors by the injection of cholinergic agonists in the VTA of living rats leads to an increase in the firing rate of dopamine neurones and to an increase in the concentration of DA in projection areas (Imperato *et al.*, 1986; Blaha & Winn, 1993; Gronier *et al.*, 2000; Gronier & Rasmussen, 1998). Similarly, electrical stimulation of the PPT or LDT induces a significant increase in striatal DA concentration by a mechanism that requires the M5 muscarinic receptor (Forster *et al.*, 2002). The net enhancement in DA release in such *in vivo* experiments is complex and involves three successive phases: a rapid but brief enhancement, a short-lasting decrease and a long-duration elevation. Finally, using extracellular stimulation in a midbrain slice preparation, Grillner *et al.* (2000) demonstrated that muscarine diminishes evoked inhibitory post-synaptic currents (IPSCs) through M3-like muscarinic receptors. These later experiments were done in brain slices, where it is particularly difficult to distinguish between GABAergic synapses originating from intrinsic neurones and GABAergic synapses originating from striatal GABAergic neurones. In summary, although

the net effect of muscarinic activation in the VTA/SN is excitatory and may depend in part on some direct cholinergic projections onto dopamine neurones, new data are required to understand the influence of local GABAergic neurones in this regulation.

To test the hypothesis of a direct regulation of VTA/SN GABAergic neurones by cholinergic receptors, we took advantage of a VTA/SN primary culture model. Our results show that cholinergic drugs increase the firing rate of GABAergic interneurones in a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent manner and decrease the amplitude of unitary IPSCs, at least in part through a M3-like receptor.

## Methods

*Cell culture:* Primary cultures were prepared as previously described (Congar *et al.*, 2002) with protocols derived from Cardozo (Cardozo, 1993) and Sulzer (Sulzer *et al.*, 1998). Two types of cultures were used. In standard cultures, neurones were plated onto coverslips uniformly covered with astrocytes. In micro-dot cultures, neurones were plated on small islands of astrocytes previously plated onto micro-droplets of substrate. This permitted the establishment of single neurone cultures and electrophysiological recordings of GABA-mediated autaptic currents (mediated by synapses established by a neurone onto its own dendrites) (Bekkers & Stevens, 1991; Michel & Trudeau, 2000; Bergevin *et al.*, 2002). This allowed unambiguous identification of GABAergic neurones in cultures that otherwise also contained dopamine neurones.

Prior to plating, coverslips used for standard cultures were coated with collagen/poly-L-lysine. Coverslips used for micro-dot cultures were coated successively with Poly-L-Ornithine, agarose (0.05 %) and micro-droplets of collagen. A monolayer of mesencephalic astrocytes was then applied for both culture types. To prepare astrocyte cultures, neonatal (P0 to P2) Sprague-Dawley rats were cryoanesthetized. Brains were quickly removed from the skull and placed in ice-cold dissociation solution. A 2 mm<sup>3</sup> block of ventral midbrain tissue was rapidly isolated from a 1 mm slice cut at the level of the midbrain flexure. The tissue was then digested with papain (Worthington Biochemical Corp., Lakewood, NJ, USA) for 60 min at 37 °C before being gently triturated using glass pipettes of decreasing diameters until a single-cell suspension was obtained. Cells were plated and grown in culture flasks and maintained in Basal Medium Eagle with Earl's Salts (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) supplemented with penicillin/streptomycin, GlutaMAX-1 (Invitrogen), 10 % foetal calf serum (Invitrogen) and Mito+ serum extender (VWR Canlab, Montréal, QC, Canada). After the first 48 hours, culture flasks were vigorously washed with cold medium to remove most neurones, leaving only tightly adherent astrocytes. After reaching confluence, astrocytes were gently trypsinized, washed,

collected, counted and plated at a concentration of 100 000 (standard cultures) or 60 000 (micro-dot cultures) living cells per millilitre. Twenty-four hours after plating, astrocytes covered most of the available surface and further division was inhibited with 5-fluoro-2-deoxyuridine (FUDR).

To prepare neurones, neonatal (P0 to P2) Sprague-Dawley rats were cryoanesthetized and the ventral mesencephalic part of the slice was rapidly isolated. As for the astrocyte preparation, the tissue was digested with papain for 30 min at 37 °C, before being gently triturated. The dissociated cells were then collected by centrifugation, counted and diluted at a density titrated to optimize neuronal viability in standard culture conditions (240 000 living cells per millilitre) and to maximize the number of single neurones in micro-dot cultures (100 000 living cells per millilitre). Further astrocytic division was inhibited by a second addition of FUDR 24 hours after neurones were plated. Neurone culture were maintained in Neurobasal A / BME (2:1) medium, penicillin/streptomycin, GlutaMAX-1, 10 % foetal calf serum (Hyclone Laboratories, Logan, UT) and B27 serum extender (Invitrogen). Kynurenate (0.5 mM) was added to the culture medium 7 days after neurones were plated in order to prevent excitotoxicity. Cell cultures were incubated at 37 °C in a 5 % CO<sub>2</sub> atmosphere. Experiments were performed on neurones between 10 to 30 days after plating. All procedures were approved by the animal ethics committee of the Université de Montréal.

*Electrophysiology:* All electrophysiological procedures were performed at room temperature using a WARNER PC-505 or PC-501 patch-clamp amplifier (Warner Instrument Corp, Hamden, CT). Signals were filtered at 2 kHz, digitized at 5 kHz, recorded and analysed with Pclamp 8 software (Axon Instruments, Foster City, CA). Patch pipettes were prepared with borosilicate glass and had a resistance of  $5 \pm 1$  MOhm. Cells were perfused with an extracellular solution containing (in mM): NaCl 140, KCl 5, MgCl<sub>2</sub> 2, CaCl<sub>2</sub> 2, N-(2-hydroxyethyl) piperazine-N-(2-ethanesulfonic acid) (HEPES) 10, glucose 10, sucrose 6, (pH 7.35; 295 mOsm). Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX; 10  $\mu$ M)

was added to the extracellular bathing solution while recording spontaneous inhibitory postsynaptic currents (sIPSCs), in order to block glutamatergic (AMPA/Kainate) fast excitatory postsynaptic currents. Tetrodotoxin (TTX; 0.5  $\mu$ M) (Alomone labs, Jerusalem, Israel) was also added to the bathing solution while recording miniature inhibitory postsynaptic currents (mIPSCs). Spontaneous IPSCs and mIPSCs were recorded using a cesium methylsulfate intrapipette solution containing (in mM): CsMeSO<sub>4</sub> 120, CsCl 20, NaCl 5, EGTA 1, ATP (Mg salt) 4, GTP (Tris salt) 0.5, HEPES 10 (pH 7.35; 295 mOsm). Autaptic inhibitory postsynaptic currents (autaptic IPSCs) and action potentials were recorded with a potassium methylsulfate intrapipette solution containing (in mM): KMeSO<sub>4</sub> 120, KCl 20, NaCl 5, phosphocreatine (Tris salt) 10, ATP (Mg salt) 4, GTP (Tris salt) 0.5, HEPES 10, EGTA 0.1, (pH 7.35; 295 mOsm). To evoke autaptic IPSCs, isolated neurones were stimulated every 15 s with a brief (1 ms) voltage command pulse to +20 mV from a holding potential of -50 to -40 mV. To measure outward whole-cell voltage-dependent K<sup>+</sup> currents, identified GABAergic neurones were stepped in 10 mV increments from -70 mV to +50 mV. Experiments were performed in the presence of TTX (0.5  $\mu$ M) to block voltage-dependent Na<sup>+</sup> currents. Evoked postsynaptic currents and voltage-dependent K<sup>+</sup> currents were recorded and analysed with PClamp 8 (Axon instruments). All other electrophysiological events (IPSCs and action potentials) were analyzed with Mini Analysis Software (version 5) by Synaptosoft Inc. (Leonia, NJ, USA). For mIPSCs analysis, a threshold was fixed at  $6 \pm 1$  pA. For sIPSCs analysis, we chose an arbitrary threshold of 25 pA that permitted to exclude most mIPSCs. This procedure prevented the influence of mIPSCs on the quantification of sIPSCs amplitude or frequency. SR 95531 (Gabazine) (5  $\mu$ M), a potent and reversible GABA<sub>A</sub> receptor antagonist was used to confirm the GABAergic nature of synaptic responses in most electrophysiological experiments.

*Immunocytochemistry:* Cells were fixed in paraformaldehyde (4 %), permeabilized with Triton X-100 (0.1 %) and incubated in a blocking solution containing bovine serum albumin (0.5 %), Triton X-100 (0.1 %) and goat serum (5 %). Primary mouse monoclonal (1:100) or rabbit polyclonal (1:500) (Sigma) antibodies raised against GABA were used to

identify GABAergic neurones. Anti-tyrosine-hydroxylase mouse monoclonal (1:1000) (Pelfrez Biological, Ak, USA) or rabbit polyclonal (1:5000) (Sigma) antibodies were used to identify dopamine neurones. The presence of M3 and M5 muscarinic receptors was tested with subtype-specific rabbit polyclonal antibodies from Alomone Labs (1:300). Primary antibodies were detected using Alexa-488 or Alexa-546-labelled secondary antibodies (1:200) (Molecular Probes Inc., Eugene, OR). Images of immunofluorescent labelling were acquired using a Hamamatsu Orca-II digital-cooled CCD camera using Esee and Isee software (Inovision Corporation, Raleigh, NC, USA.).

*Drugs:* All chemicals were obtained from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada) except otherwise indicated. The GIRK-type K<sup>+</sup> channel toxin blocker tertiapin was obtained from Alomone Labs.

*Data processing:* A proportion of neurones were insensitive to cholinergic agonists under our experimental conditions. Because this was essentially all-or-none, analyses were restricted to responsive cells only. To determine objectively if a cell was responsive or not, all neurones were analyzed to determine whether the measured parameter changed by more than two standard deviations away from control value in response to the application of the cholinergic agonist ACh (with or without atropine) or muscarine. A third of all recorded cells were thus discarded.

Data presented in the text are expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical comparisons were performed using Student's paired t-test or a one way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-hoc pairwise comparisons, as appropriate. A probability value of  $p < 0.05$  was considered indicative of a significant difference.

## Results

### **Acetylcholine increases the frequency of spontaneous GABAergic postsynaptic currents (sIPSCs).**

Because mesencephalic neurones receive abundant projections from cholinergic structures, we expected that the activation of cholinergic receptors would affect the physiology of GABAergic VTA/SN neurones. We first recorded spontaneously generated IPSCs to evaluate global effects of cholinergic agonists on the activity of GABAergic neurones. Because GABAergic synapses impinge on essentially all neurones in these cultures, whole-cell voltage-clamp recordings were performed in randomly selected neurones in standard primary dissociated cultures. The natural agonist, acetylcholine (ACh) (10  $\mu$ M) elicited a large increase of sIPSC frequency (Fig. 1A). The effect was rapid and lasted until the washout of ACh. The maximal increase was to  $251 \pm 49$  % (n = 55) of the control period (Fig. 1B). The average basal frequency of sIPSCs increased from  $3.8 \pm 0.5$  Hz to  $6.7 \pm 0.6$  Hz (n = 55; F = 9.85 (DF = 2) p<0.001) in the presence of ACh. The washout was complete 5 minutes later with the sIPSC frequency returning to  $3.7 \pm 0.5$  Hz (Fig. 1C). Note that the increase of sIPSCs frequency did not show any obvious desensitization during the application of ACh. On the other hand, the average amplitude of sIPSCs was not affected by ACh (n = 55; F = 0.729 (DF = 2) p = 0.484) (Fig. 1D).

### **Activation of nicotinic receptors also increases sIPSCs frequency.**

ACh (10  $\mu$ M) was used in the presence of 1  $\mu$ M atropine, a potent and broad-spectrum muscarinic receptor antagonist, to evaluate the overall contribution of nicotinic receptors. Stimulation of nicotinic receptors in this way caused an increase in sIPSCs frequency (Fig. 2A). The basal frequency of sIPSCs increased from  $9.7 \pm 1.4$  Hz to  $16.3 \pm 2.1$  Hz (n = 22; F = 5.01 (DF = 2) p<0.05). The frequency of sIPSCs returned to  $10.3 \pm 1.4$

Hz after a 5 minutes washout, thus showing that the nicotinic effect was fully reversible (Fig. 2B). The average amplitude of sIPSCs had a tendency to decrease during nicotinic receptor stimulation (Fig. 2C), however this effect was not statistically significant ( $n = 22$   $F = 1.629$  ( $DF = 2$ )  $p = 0.204$ ).

Methyllycaconitine (50 nM) and mecamylamine (10  $\mu$ M) were used to characterize the pharmacological profile of the nicotinic enhancement in sIPSC frequency. Only mecamylamine was able to cause a significant reduction in ACh-evoked increase in sIPSC frequency in the presence of atropine (repeated measures ANOVA:  $n = 6$ ;  $F = 6.248$  ( $DF = 2$ )  $p < 0.05$ ). The other antagonist was without significant effect ( $P > 0.05$ ). Washout of these antagonists was complete since a third application of ACh+atropine induced an increase in sIPSC frequency that was similar to the first control application in most experiments (Fig. 2D).

### **Muscarine increases sIPSC frequency in a dose-dependent manner.**

We used muscarine to evaluate the contribution of muscarinic receptors. Muscarine (10  $\mu$ M) increased sIPSCs frequency to  $157.2 \pm 23$  % ( $n = 11$ ) of the control period, with the maximal effect occurring 1 min after the beginning of drug application (Fig. 3A). The effect of muscarine outlasted the duration of drug application by a few minutes (Fig. 3B). Although this was not specifically quantified, the sIPSC pattern was often more regular in the presence of muscarine. This change in pattern disappeared during drug washout. Like in experiments with ACh, muscarine did not significantly affect sIPSC amplitude (Fig. 3B). The dose-response curve (Fig. 3C) demonstrates that the average increase in sIPSC frequency in the presence of muscarine reached a peak at 1  $\mu$ M ( $152.9 \pm 19.2$  % of control) ( $p < 0.01$ ) and that a steady-state was reached at 10  $\mu$ M ( $152.4 \pm 20.6$  % of control) ( $p < 0.001$ ). Considering the paucity of data on muscarinic receptor actions in the mesencephalon, in further experiments, we chose to focus our attention on the regulation of mesencephalic GABAergic neurones by muscarinic receptors. A dose of 10  $\mu$ M muscarine was used to obtain maximal effects.

### **Muscarine regulates action potential firing rate in isolated GABAergic neurones.**

We took advantage of single-cell cultures to investigate more directly the regulation of GABAergic VTA/SN neurones by muscarinic receptors. In such single neurone cultures, individual GABAergic neurones establish autaptic synaptic connections (Bekkers & Stevens, 1991) and can thus be readily identified electrophysiologically (Bergevin *et al.*, 2002; Michel & Trudeau, 2000). This preparation facilitates the detection of direct drug effects. Single GABAergic neurones were patch-clamped and identified physiologically by the ability of SR95531 (5  $\mu$ M), a specific GABA<sub>A</sub> receptor antagonist, to block autaptic currents evoked by single action potentials (see Fig. 6A). Under our experimental conditions, the reversal potential of GABAergic currents was approximately -50 mV, thus providing an additional criterion to rapidly identify GABAergic synaptic events.

In these identified VTA/SN GABAergic neurones, current-clamp experiments demonstrated that muscarine increased action potential firing rate (Fig. 4A). At the beginning of each recording, membrane voltage ( $E_m$ ) was adjusted to stabilize the firing rate (average corrected  $E_m$ :  $-48.1 \pm 0.9$  mV). At this voltage, 14 of 29 cells were depolarized more than 2 standard deviations (see methods) above the resting potential in response to muscarine ( $5.4 \pm 0.6$  mV on average,  $n = 14$ ,  $F = 7.700$  (DF = 2)  $p < 0.001$ ) (Fig. 4B), while 5 were hyperpolarized by more than 2 standard deviations. Finally, 10 of 29 neurones did not show any significant change on  $E_m$ . Pooled results including all 29 recorded cells show that muscarine tended to depolarize single GABAergic neurones, but the variability of responses was such that the overall effect was not significant ( $n = 29$ ,  $F = 0.903$  (DF = 559)  $p = 0.580$ ) (Fig. 4B). A late depolarizing phase was also often noted 5-10 minutes after washout of muscarine (Fig. 4B). This delayed effect was not accompanied by an increase in firing rate and was not further investigated. Finally, of the 17 cells that showed an increased firing rate in the presence of muscarine, 5 did not show any significant change in  $E_m$ . On average, for these 17 responsive neurones, basal firing rate averaged  $1.41 \pm 0.23$  Hz. Muscarine induced an increase to  $167.4 \pm 13.3$  % of control (to  $2.12 \pm 0.30$  Hz)

( $n = 17$ ,  $F = 2.923$  (DF = 2)  $p < 0.001$ ). Washout was almost complete after 5 min ( $1.32 \pm 0.23$  Hz) (Fig. 4 C). Additional experiments were performed to determine whether overall changes in membrane resistance ( $R_m$ ) could be detected. Recordings were performed under current-clamp mode under conditions where  $E_m$  was stabilized at  $-60$  mV to prevent spontaneous firing. In the presence of muscarine, no significant change in  $R_m$  was detected ( $96.9 \pm 3.2$  % of control) ( $n = 8$ ) (data not shown).

### **A rise in internal $Ca^{2+}$ concentration is necessary for the effect of muscarine.**

Previous work has reported the expression of M3 and M5 muscarinic receptors in rodent mesencephalon (Weiner *et al.*, 1990). Considering that a major signal transduction pathway for these receptors involves activation of phospholipase C via  $G_{q/11}$  protein and intracellular  $Ca^{2+}$  elevations, we hypothesized that some of the physiological effects of muscarinic receptor activation in mesencephalic GABA neurones could be  $Ca^{2+}$ -dependent. To investigate the possible inter-relation between firing rate increases and intracellular  $Ca^{2+}$  concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ), we added BAPTA (10 mM) in the intrapipette solution to buffer  $[Ca^{2+}]_i$  and prevent any intracellular increase in the concentration of free  $Ca^{2+}$ . To allow diffusion of BAPTA, we waited for 5-10 min after rupture of the membrane patch to begin the recording. During the first few minutes of recording (before disappearance of synaptic currents due to dialysis of BAPTA in synaptic terminals), we checked the reversal potential of postsynaptic currents in isolated neurones and determined their phenotype. In GABAergic neurones dialysed with BAPTA, the effect of muscarine on action potential firing frequency was not only inhibited but was reversed (Fig. 5). By itself, intrapipette BAPTA induced a shift of the firing threshold. It was necessary to polarize neurones to more positive values to reach stable firing rates ( $-40.2 \pm 2.4$  mV ( $n = 11$ ) vs.  $48.1 \pm 0.9$  mV without BAPTA) (unpaired student t-test:  $p < 0.001$ ). After such an adjustment of  $E_m$ , the basal firing frequency was equivalent to control ( $1.25 \pm 0.40$  Hz vs.  $1.41 \pm 0.23$  Hz for control). Muscarine failed to increase firing rate in all 11 recorded GABAergic neurones. In 8 out of 11 neurones, muscarine actually decreased firing rate to  $54 \pm 11$  % of control level

( $0.43 \pm 0.09$  Hz;  $n = 8$ ,  $F = 2.923$  (DF = 2)  $p < 0.001$ ) (Fig. 5A, 5B, 5C). Washout was almost complete after 5 min ( $1.28 \pm 0.53$  Hz). Overall, across all recorded BAPTA-loaded neurones,  $E_m$  significantly decreased in response to muscarine from  $-40.2 \pm 2.4$  mV to  $-47.1 \pm 3.6$  mV ( $n = 11$ ,  $F = 3.434$  (DF = 2)  $p < 0.001$ ) (Fig. 5D). Taken together, these results identify a major influence of  $[Ca^{2+}]_i$  in the physiological effects of muscarine on GABAergic neurones.

We hypothesized that the membrane hyperpolarization and inhibition of firing rate caused by muscarine in the presence of intracellular BAPTA results from activation of some G-protein-gated inward rectifying  $K^+$  (GIRK) channels. To test this hypothesis, we used the selective GIRK channel blocker tertiapin (Jin & Lu, 1998; Jin & Lu, 1999), a toxin known to block ACh-regulated GIRKs ( $K_{ACh}$ ) (Kitamura *et al.*, 2000). Pre-application of tertiapin (30 nM) caused no major effect by itself but completely prevented both membrane hyperpolarization and firing rate inhibition caused by muscarine in BAPTA-loaded GABAergic neurones (Fig. 5C, 5D).

### **Muscarine does not increase firing rate by affecting the AHP or voltage-dependent $K^+$ currents.**

Considering that activation of muscarinic receptors enhances cell firing together with minimal membrane depolarization, one obvious hypothesis is that the enhanced firing rate induced by muscarine might, at least in part, result from a decrease in the amplitude and/or the kinetics of spike after hyperpolarisations (AHP). To test this hypothesis, we evoked single spikes under whole cell current-clamp mode by injecting a short (1 ms) depolarizing current pulse in single GABAergic neurones. For each neurone,  $E_m$  was set to  $-55$  mV at the beginning of the experiment to prevent spontaneous firing. The amplitude of the AHP was not affected by muscarine. The peak amplitude of the AHP was  $100 \pm 3$  % of the control period ( $n = 10$ ) (not shown).

Variations of AHP amplitude were also examined in the presence of the GABA<sub>A</sub> receptor antagonist SR95531. This was done to control for the fact that all experiments were done on isolated GABAergic neurones that establish autapses, conditions under which autaptic synaptic responses can contribute to the amplitude of AHPs and regulate firing rate (Bacci *et al.*, 2003). Block of GABA<sub>A</sub> receptors induced a significant decrease of  $26.2 \pm 8.6\%$  ( $n = 9$ ,  $p < 0.05$ ) in AHP amplitude compared to the control period. This decrease of the AHP amplitude induced a substantial increase in firing (not shown). However, under these conditions muscarine still induced a significant increase in firing rate and the amplitude of AHPs remained unchanged by muscarine in the presence of SR95531 ( $n = 9$ ,  $F = 6.751$  (DF = 27)  $p = 0.995$ , compared to SR95531 alone).

Finally, we determined whether muscarine caused a change in outward voltage-dependent K<sup>+</sup> currents recorded in whole-cell mode. GABAergic neurones were first identified electrophysiologically and switched to saline containing 0.5 μM TTX to block voltage-dependent Na<sup>+</sup> currents. Current-voltage relationships were established before, during and after muscarine. No significant change in the early or late phase of outward K<sup>+</sup> currents were detected ( $n = 6$ ) (not shown).

### **Muscarine inhibits the synaptic release of GABA in isolated neurones.**

Considering previous work showing that activation of muscarinic M3 receptors depress unidentified GABAergic synapses established onto midbrain dopamine neurones in slices (Grillner *et al.*, 2000), we decided to directly evaluate the capacity of muscarine to regulate the amplitude of GABAergic autaptic currents evoked by single action potentials. Brief depolarizing voltage steps evoked a fast inward sodium current followed by a slow outward GABA<sub>A</sub> receptor-mediated IPSC (autaptic IPSC) in isolated neurones. The GABAergic nature of the evoked autaptic current was confirmed by its reversal potential close to -50 mV and its sensitivity to SR95531 (5 μM) (Fig. 6A). Muscarine (10 μM) inhibited autaptic IPSC amplitude by  $45.9 \pm 3.5\%$  ( $n = 25$ ;  $p < 0.05$ ) (Fig. 6C). Washout of the effect of muscarine was essentially complete after 5 minutes (Fig. 6C) if one takes into

account the habitual run-down of synaptic currents in control experiments (approximately 20 % over 10 min). To confirm the pre-synaptic nature of this effect, we determined the effect of muscarine on membrane currents evoked by rapid puff-application of exogenous GABA (10 ms at 500  $\mu$ M) (Fig. 6B, 6C). Muscarine had no effect on puff-evoked GABA currents ( $104 \pm 2$  % of control,  $n = 4$ ;  $p = 0.122$ ). These results show that muscarine inhibits GABA release through some presynaptic mechanism.

#### **Lack of effect of muscarine on miniature IPSCs.**

To determine whether muscarine inhibits synaptic GABAergic currents through some direct inhibition of the release process, we measured the frequency of spontaneous miniature inhibitory post-synaptic currents (mIPSCs). Recordings were performed on standard VTA/SN cultures in the presence of CNQX (10  $\mu$ M) to block glutamate-mediated synaptic currents and TTX (0.5  $\mu$ M) to isolate impulse-independent GABAergic synaptic events. The holding potential was set between  $-10$  mV and  $10$  mV to yield outward synaptic currents (Fig. 7A). Muscarine affected neither the frequency nor the amplitude of mIPSCs (Fig. 7A), as shown by the absence of a shift in the cumulative probability distribution of mIPSC frequency (Fig. 7B) or amplitude (Fig. 7C). Across all experiments, the average frequency and amplitude of mIPSCs was not significantly changed (Fig. 7D). These results show that presynaptic inhibition mediated by muscarinic receptor activation does not involve a direct inhibition of the secretory process.

#### **Effects of the M3 muscarinic receptor antagonist 4-DAMP.**

To date, only M3 and M5 muscarinic receptor mRNAs have been detected in the mesencephalon (Weiner *et al.*, 1990; Zubieta & Frey, 1993). Although pharmacological tools cannot easily distinguish between M3 and M5, we have used 4-DAMP which is recognized as one of the most selective M3 receptor antagonist available (Michel *et al.*, 1989; Araujo *et al.*, 1991). This antagonist blocked completely the effect of muscarine on

sIPSC frequency (Fig. 8A). In these experiments, muscarine was applied three times. A first application induced an increase in sIPSC frequency to  $157.1 \pm 17.0$  % of control. A second application of muscarine in the presence of 4-DAMP (100 nM) failed to induce a significant change in sIPSC frequency ( $109.6 \pm 12.3$  % of control). Finally, after washout of 4-DAMP, a final application of muscarine increased sIPSC frequency to  $167.7 \pm 38.1$  % of control, showing complete recovery (non-parametric Friedman-ANOVA  $n = 4$  (DF = 2)  $p < 0.05$ ). The ability of muscarine to inhibit autaptic IPSC amplitude was also abolished by 4-DAMP (100 nM) ( $100.7 \pm 4.9$  % of control compared to  $65.0 \pm 9.9$  % with muscarine alone) (Fig. 8B) ( $n = 4$ ,  $p < 0.05$ ).

Compatible with the involvement of M3 muscarinic receptors, mesencephalic GABAergic neurones were found to be immunopositive for this receptor. A clear M3-like labelling was detected both in dopamine and non-dopamine neurones (presumed GABAergic) (Fig. 8C), but not in astrocytes (not shown). This finding is in agreement with our pharmacological experiments with 4-DAMP. The lack of a suitable M5 receptor antibody precluded a similar evaluation of the presence of M5 receptors.

## Discussion

Functional and anatomical evidence suggest that the cholinergic system should have a major influence on the activity of VTA/SN neurones and in particular on GABAergic interneurones (Garzon *et al.*, 1999; Forster & Blaha, 2000; Fiorillo & Williams, 2000). GABAergic neurones located within the ventral mesencephalon represent a minority and are thus difficult to study in intact tissue. In the current work, we took advantage of a primary culture model to determine how ACh acts on VTA/SN GABAergic neurones.

We found that stimulation of cholinergic receptors had a general excitatory effect on GABAergic neurones. The natural neurotransmitter ACh induced a major increase in sIPSC frequency reflecting a general increase in the firing of spontaneously active GABAergic neurones. Both nicotinic and muscarinic receptor pathways were involved in this effect. Additional experiments focussed on characterizing the muscarinic component. We found that muscarine increased the firing frequency of isolated GABAergic neurones. This effect was accompanied by mild depolarization. The increase in firing rate induced by muscarine was completely  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent since it was blocked by BAPTA. Finally, 4-DAMP (100 nM) inhibited the effects of muscarine, arguing for the involvement of muscarinic M3 receptors. Somatodendritic immunolabelling for M3 receptors supports the hypothesis of an expression of this receptor in GABAergic neurones and its probable participation in the excitatory effects of muscarine. In this report, we have also shown that muscarine inhibits the amplitude of IPSCs evoked by single action potentials in isolated GABAergic neurones, suggesting that muscarinic receptors also act at the terminal level to inhibit GABA release.

### Implication of nicotinic receptors.

As numerous drugs of abuse, nicotine stimulates the release of dopamine in the mesocorticolimbic system (Di Chiara & Imperato, 1988; Imperato *et al.*, 1986). Non-

dopamine neurones in the VTA (presumed to be mainly or exclusively GABAergic) are excited by nicotine (Yin & French, 2000). This is expressed as an increase in firing frequency, but this effect desensitizes after a few minutes. Interestingly, dopamine neurones are also excited by nicotine, but this effect shows little if any desensitization. This differential desensitization could explain partially why the global effect of nicotine on the dopaminergic system is excitatory (Sanghera *et al.*, 1984; Mansvelder *et al.*, 2002). The expression of nicotinic receptor subunits in mesencephalic nuclei has been examined previously (Charpantier *et al.*, 1998; Klink *et al.*, 2001). These studies demonstrated that GABAergic neurones express diverse populations of nicotinic ACh receptors composed of different combinations of  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$ ,  $\beta_2$  and  $\beta_3$  subunits. The pharmacological profile identified in our experiments is mostly in agreement with these previous findings. Indeed, mecamylamine, an antagonist known to inhibit nicotinic receptors that contain  $\beta_2$  and  $\alpha_4$  subunits was the most effective antagonist. Interestingly, the work of Klink *et al.* (2001) suggests the presence of two major subclasses of VTA GABAergic neurones: one “regular spiking” and the other “accommodating”. These two cell types differentially expressed nicotinic receptor subunits. Regular spiking cells expressed the  $\alpha_7$  subunit, while accommodating cells did not. Together with the previous finding that subpopulations of VTA/SN GABAergic neurones can be distinguished on the basis of whether or not they send an axon to the ventral striatum or the prefrontal cortex (Carr & Sesack, 2000; Van Bockstaele & Pickel, 1995), these findings provide a possible basis for functional heterogeneity within the general population of VTA GABAergic neurones. Such heterogeneity could partly explain the variability of the response of GABAergic neurones to muscarine observed in the present set of experiments.

#### **Excitatory action of muscarinic receptors.**

Although some heterogeneity was present, muscarine generally caused an increase in firing rate. The mild depolarization induced by muscarinic receptor activation probably underlies this increase. Other mechanisms regulating cell excitability such as modulation of

spike AHP or voltage-dependent  $K^+$  channels appear not to be involved under our experimental conditions. Muscarinic receptors have been found to regulate a large number of different conductances such as several  $K^+$  currents including GIRK-type  $K^+$  currents, M current,  $S_K$ -type  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  currents and leak-type currents (Adams *et al.*, 1982; Cole & Nicoll, 1984; Madison *et al.*, 1987; Uchimura & North, 1990). In addition, muscarinic receptors are known to activate non-selective cationic currents (NSCC) mediated by receptor-operated channels (ROCs) or store operated channels (SOCs) (Colino & Halliwell, 1993; Guerineau *et al.*, 1995). Although our experiments did not allow us to demonstrate significant changes in whole-cell membrane resistance in the presence of muscarine, this finding does not discount the implication of cationic currents because NSCCs such as those mediating  $Ca^{2+}$  release-activated  $Ca^{2+}$  currents are known to have very small unitary conductances (Zweifach & Lewis, 1993). Our failure to detect an overall change in membrane resistance in response to muscarine could thus simply be due to insufficient signal to noise ratio, as previously noted in previous work on the excitatory action of muscarinic receptors on neurones (Shalinsky *et al.*, 2002). In addition, we cannot exclude that muscarinic receptor stimulation excites GABAergic neurones by some simultaneous increase in a cationic conductance coupled with the closure of some leak-type  $K^+$  channels, leading to a lack of overall change in membrane resistance. We have not directly characterized the biophysical properties of ionic conductances mediating the excitation of VTA/SN GABAergic neurones by muscarine. However, our finding that this excitation is fully  $Ca^{2+}$ -dependent provides other evidence in favour of the hypothesis that NSCCs are involved. Additional supporting evidence comes from our recent observation that muscarine induces  $Ca^{2+}$  influx independently of membrane depolarization in GABAergic neurones in our primary culture model. (F. Michel, P. Martel, and L.-E. Trudeau, unpublished observations). This influx was found to be insensitive to the  $Ca^{2+}$ -store depleting drug thapsigargin, and could thus be mediated through ROC-type channels.

Recent work has shown that muscarinic receptors activate  $Ca^{2+}$ -dependent NSCCs in entorhinal cortex neurones and in CA1 hippocampal pyramidal neurones (Fraser & MacVicar, 1996; Klink & Alonso, 1997b; Klink & Alonso, 1997a; Kuzmiski & MacVicar,

2001; Shalinsky *et al.*, 2002). In entorhinal cortex neurones, muscarinic receptor activation causes physiological effects that are essentially the same as those found in the current report: increase in firing rate,  $\text{Ca}^{2+}$ -dependency, depolarization and virtually no change in input resistance.

Pharmacological and molecular characterization of NSCCs is currently very partial. Recent reports from a number of groups have proposed that mammalian homologues of "Transient Receptor Potential" (TRP) channels, a new family of channels cloned from *Drosophila*, could contribute to the assembly of NSCC-type channels (Minke & Cook, 2002; Zitt *et al.*, 2002). Interestingly, channels assembled from TRP sub-units form  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable cationic channels that are regulated by muscarinic receptors such as M1, M3 or M5 (Zhang & Saffen, 2001; Boulay *et al.*, 1997; Zhu *et al.*, 1998). Although speculative at the moment, a reasonable hypothesis is that the excitatory effects mediated by muscarinic receptors in VTA/SN GABAergic neurones are mediated by channels containing TRP subunits.

### **Multiple mechanisms of action through muscarinic receptors.**

Chelation of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  with intrapipette BAPTA not only inhibited the excitatory action of muscarine, but actually revealed an inhibitory effect. This finding suggests that muscarinic receptors have multiple targets in GABAergic neurones leading to parallel regulation of different conductances. In our experiments, the net effect was usually excitatory. However, the existence of simultaneous inhibitory and excitatory mechanisms could provide a partial explanation of the heterogeneous response profile found in our preparation. GIRK-type channels are good candidates to explain the inhibitory effect of muscarine in the presence of BAPTA. Indeed, muscarinic receptors are known to regulate such  $\text{K}^+$  channels (Sui *et al.*, 1999; Fernandez-Fernandez *et al.*, 1999). Our finding that tertiapin prevented the membrane hyperpolarization and decrease in firing rate caused by muscarine provides strong support for this hypothesis.

Although the simplest hypothesis is that M3-like receptors activate in parallel NSCC-like channels, leading to excitation, and GIRK-type channels, leading to inhibition, an alternative explanation is that the tertiapin-sensitive inhibitory response is mediated through a second muscarinic receptor, such as M2 or M4. Indeed, M2, M3, M4 and M5 proteins have previously been detected in the ventral mesencephalon (Levey, 1993). These authors hypothesized that M2 and M4 receptors are expressed in the mesencephalon on afferent fibres from pontine nuclei. However, it is not impossible that a subpopulation of GABAergic neurones express these receptors, even though their mRNAs have not been detected. We have thus not formally excluded the possibility that the GIRK-mediated inhibitory response to muscarine revealed in the presence of BAPTA is mediated by M2 or M4 receptors in VTA GABAergic neurones. However, considering the lack of residual inhibitory response in the presence of 4-DAMP, the involvement of non-M3 receptors remains less likely.

Considering that M3 and M5 muscarinic receptors signal through phospholipase C, IP3, DAG, Ca<sup>2+</sup> and PKC, a number of other ionic channels in addition to NSCCs could be regulated by muscarinic receptors at the somatodendritic and terminal level. The inhibition of GABA release identified in our experiments on autaptic IPSCs could perhaps be caused by activation of some K<sup>+</sup> conductance at the terminal level. This would lead to a reduced activation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels in nerve terminals and to a reduction in action potential-evoked GABA release. Such a model would be compatible with our finding of a lack of reduction in the frequency of spontaneous miniature synaptic events, which would not be expected to be influenced by terminal polarization. A more direct, negative regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels in nerve terminals by muscarinic receptors could also explain our observations. Additional experiments will be necessary to explore these possibilities.

**Role of M3 receptors.**

In our experimental model, the majority of GABAergic neurones were immunopositive for M3-like receptors. Together with our finding that the preferential M3 receptor antagonist 4-DAMP completely blocked muscarine-induced cell firing and presynaptic inhibition, these data suggest that M3 receptors mediate, at least in part, the physiological effects of ACh on VTA/SN GABAergic neurones. Our results are compatible with previous data showing that M3-like receptors mediate inhibition of IPSCs evoked in a VTA slice preparation by extracellular stimulation (Grillner *et al.*, 2000). However, the presence of M3 receptors has not been conclusively demonstrated in VTA/SN neurones by *in situ* hybridization in intact tissue. If this isoform is predominantly expressed in the numerically less numerous GABAergic neurones in the VTA/SN region, confirmation of its presence by *in situ* hybridization or immunostaining in intact tissue may require careful double-labelling studies. The possible contribution of M5 receptors cannot be excluded presently. This isoform has been shown to be abundant in the mesencephalic region by *in situ* hybridization (Weiner *et al.*, 1990). Because pharmacological tools are not sufficiently selective to clearly discriminate between M3 and M5 receptors, additional experiments with M5 or M3 knockout mice or with the single-cell RT-PCR technique will be required to determine the relative contribution of these receptors to the effects observed in the present report.

**Functional considerations.**

VTA/SN GABAergic neurones exert continuous tonic inhibition on dopamine neurones (Westerink *et al.*, 1996) and are likely to play a role in fine tuning of their firing rate. The important role of these neurones is highlighted by previous work showing that opiates exert their stimulatory effect on the firing of dopamine neurones at least partly by inhibiting local GABAergic interneurones in the VTA/SN (Johnson & North, 1992a), thus leading to disinhibition.

The LDT and PPT send dual projections containing ACh and glutamate to the ventral mesencephalon. Dopamine neurones receive direct glutamatergic input while a majority of the cholinergic innervation apparently innervates local GABAergic neurones (Garzon *et al.*, 1999). Cholinergic agonists or electrical stimulation of cholinergic afferents that project to the VTA and SN induce an increase in the activity of dopamine and GABAergic neurones in brain slices, together with a long-lasting elevation of extracellular DA *in vivo* which has been shown to require M5 muscarinic receptors (Forster & Blaha, 2000; Forster *et al.*, 2002; Yeomans *et al.*, 2001). This elevation in dopamine level is multiphasic and involves nicotinic, glutamatergic and muscarinic receptors. The excitatory muscarinic part of the response is delayed and begins several minutes after stimulation. This notable time delay argues for the involvement of a complex integrated response that may implicate local GABAergic interneurons. Nonetheless, the specific physiological contribution of an increase in the activity of GABAergic neurones in response to cholinergic activation is presently unclear. It is possible that co-activation of GABAergic neurones, possibly through M3-like receptors, may prevent dopamine neurones from reaching a state of "depolarisation block" (Grace & Bunney, 1986), thus allowing them to maintain their ability to release DA tonically in projection areas. A formal test of such hypotheses will require the use of M3 knockout mice or the use of novel and more selective M3 receptor antagonists.

In conclusion, we have demonstrated that the activation of cholinergic receptors induces a strong excitatory effect on VTA/SN GABAergic interneurons in culture. In particular, we found that muscarinic receptor stimulation increases the firing rate of these neurones through a Ca<sup>2+</sup>-dependent mechanism. This enhancement in firing is accompanied by a decrease in the amplitude of IPSCs evoked by single action potentials. Both of these effects appear to depend on M3-like muscarinic receptors. Together, our results provide the first direct physiological evidence in support of the hypothesis of a regulation of mesencephalic GABAergic neurones by cholinergic receptors.

## **Acknowledgements**

This work was supported in part by grants from the Canadian Institutes of Health Research and the EJLB foundation. François Michel was supported by a studentship from the Groupe de recherche sur le système nerveux central of the Université de Montréal. We thank Marie-Josée Bourque and Isabel Jutras for their implication in the preparation and maintenance of the neuronal cultures. We also thank doctors John Yeomans and Patrice Congar as well as Gabriel Fortin for their attentive proof reading. Louis-Eric Trudeau is a scholar of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

Figures

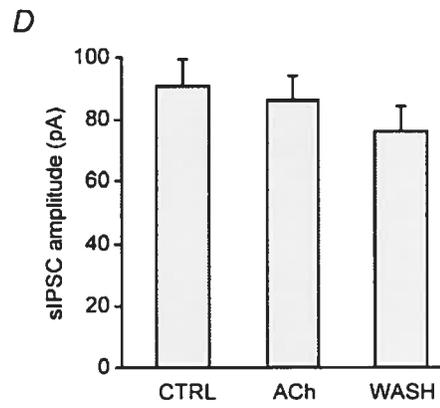
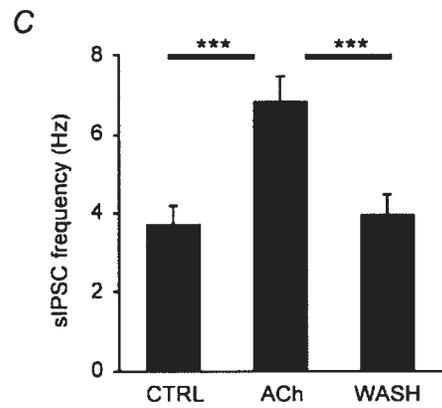
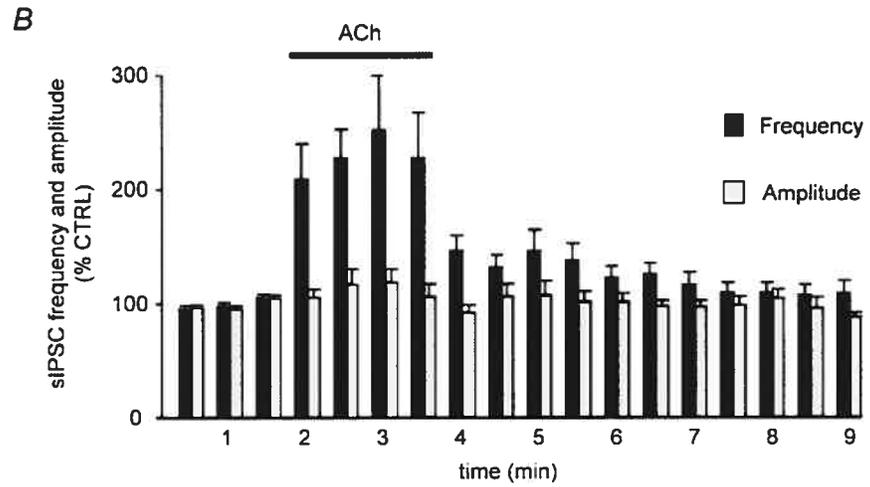
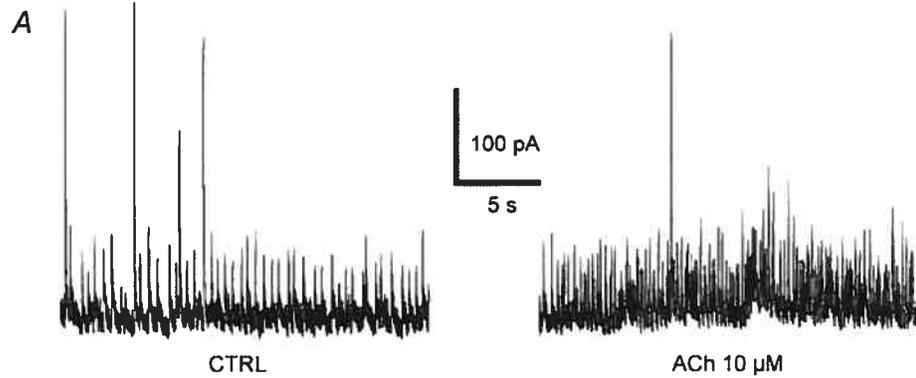


Fig. 1

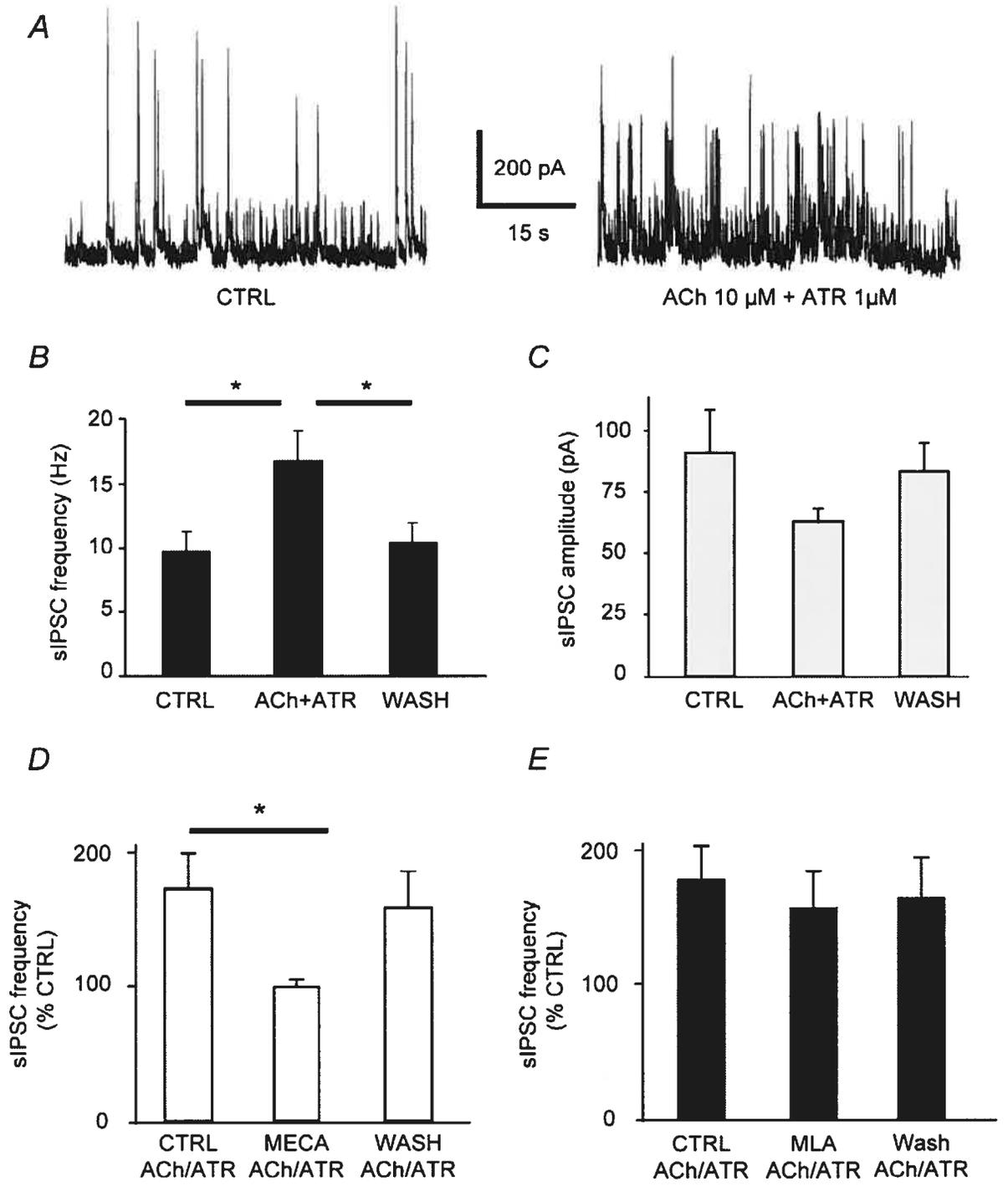


Fig. 2

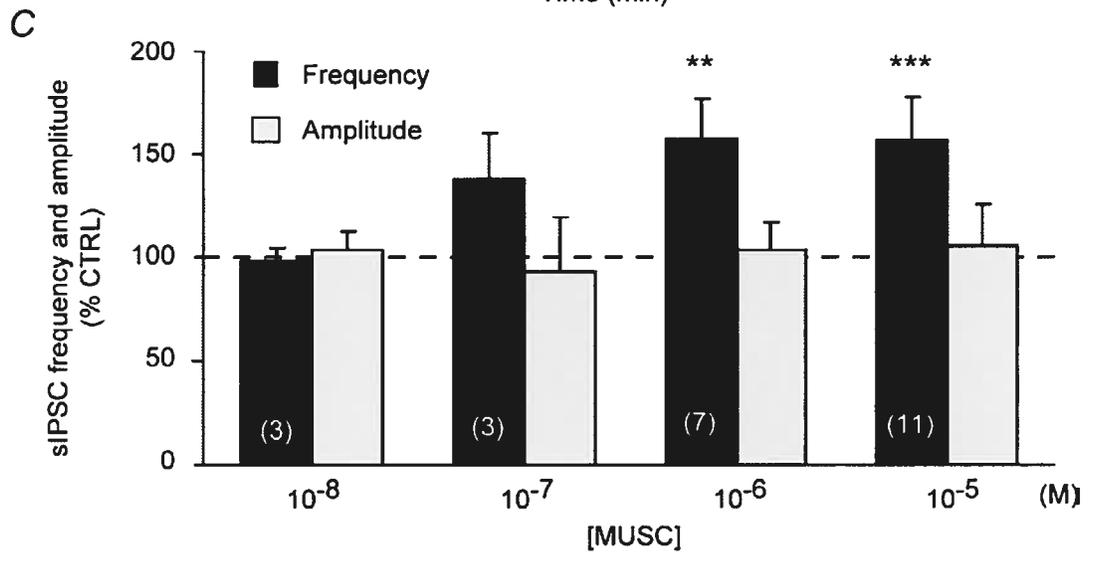
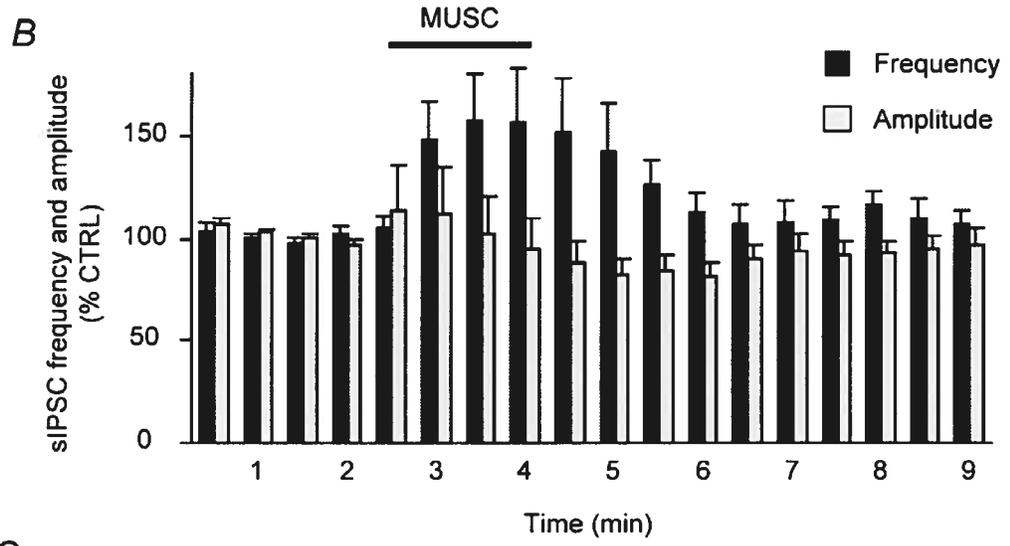
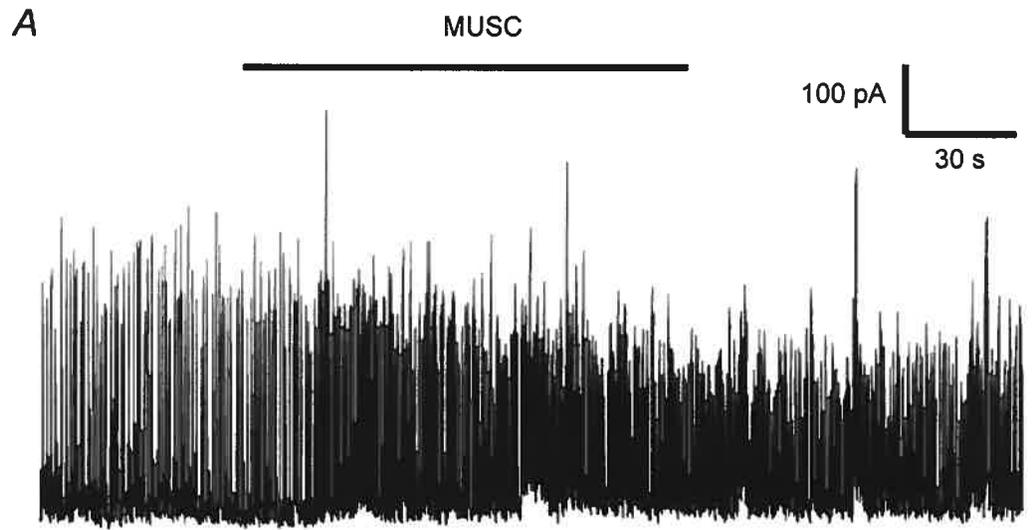


Fig. 3

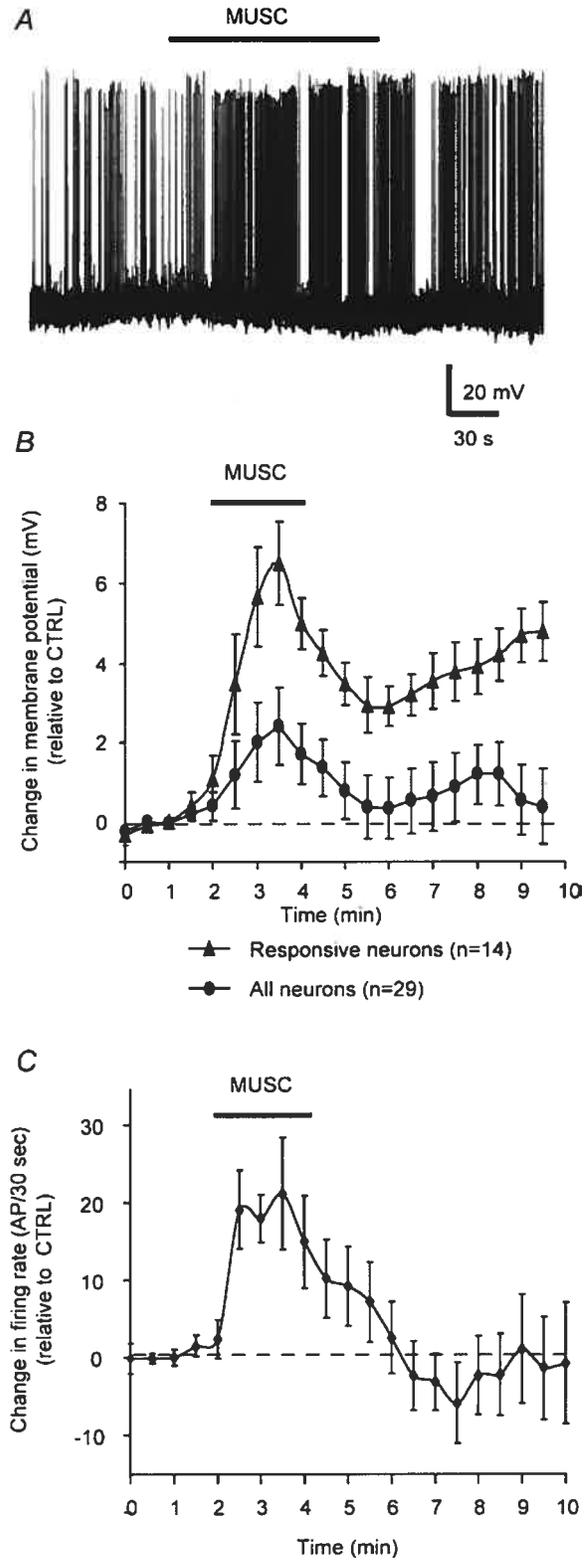


Fig.4

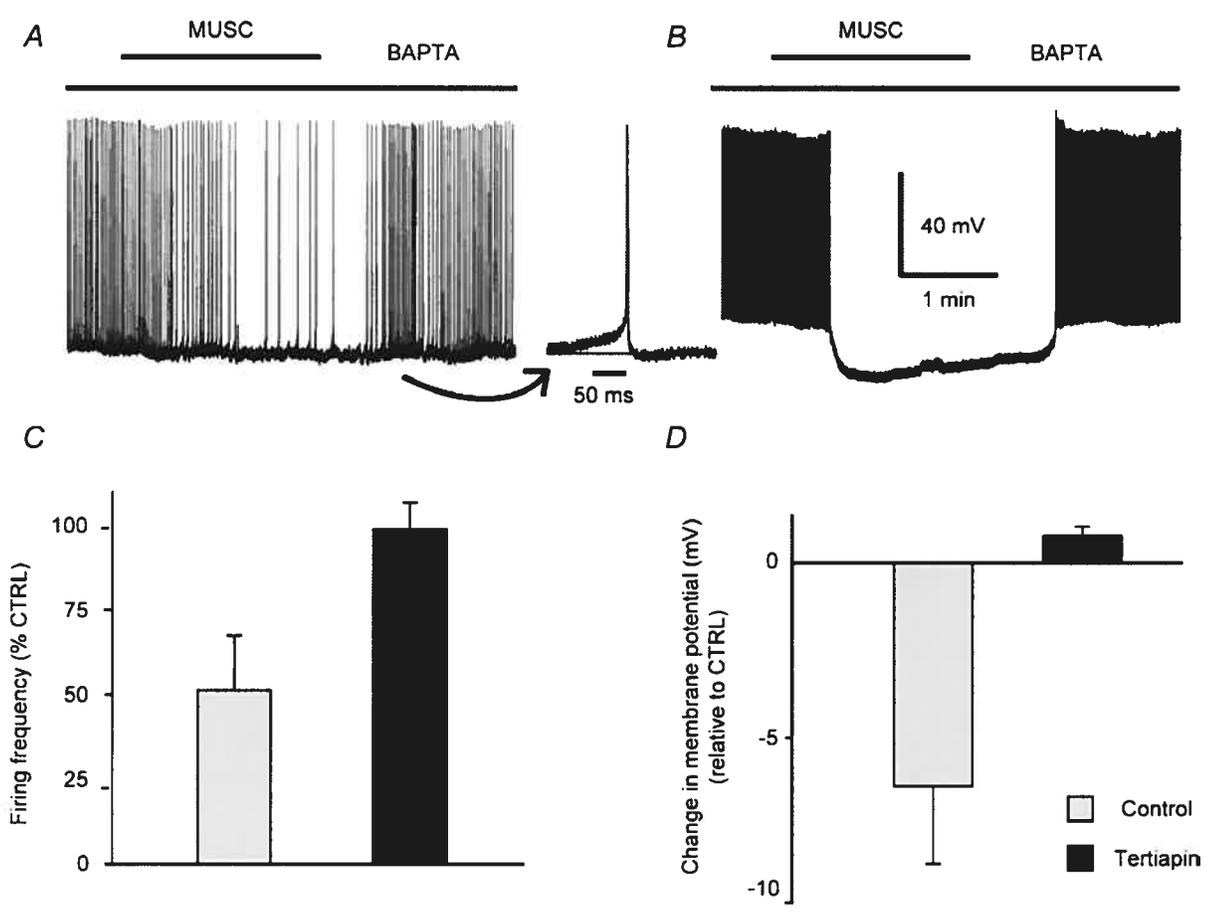


Fig.5

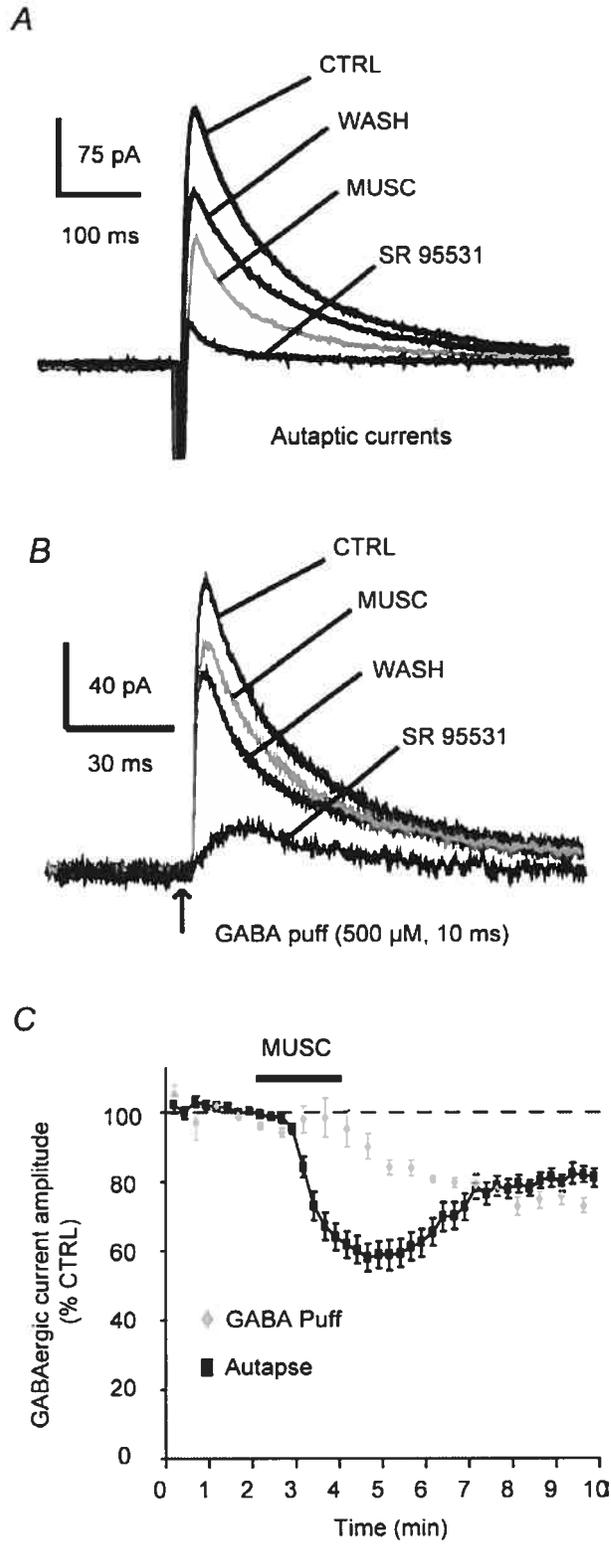


Fig. 6

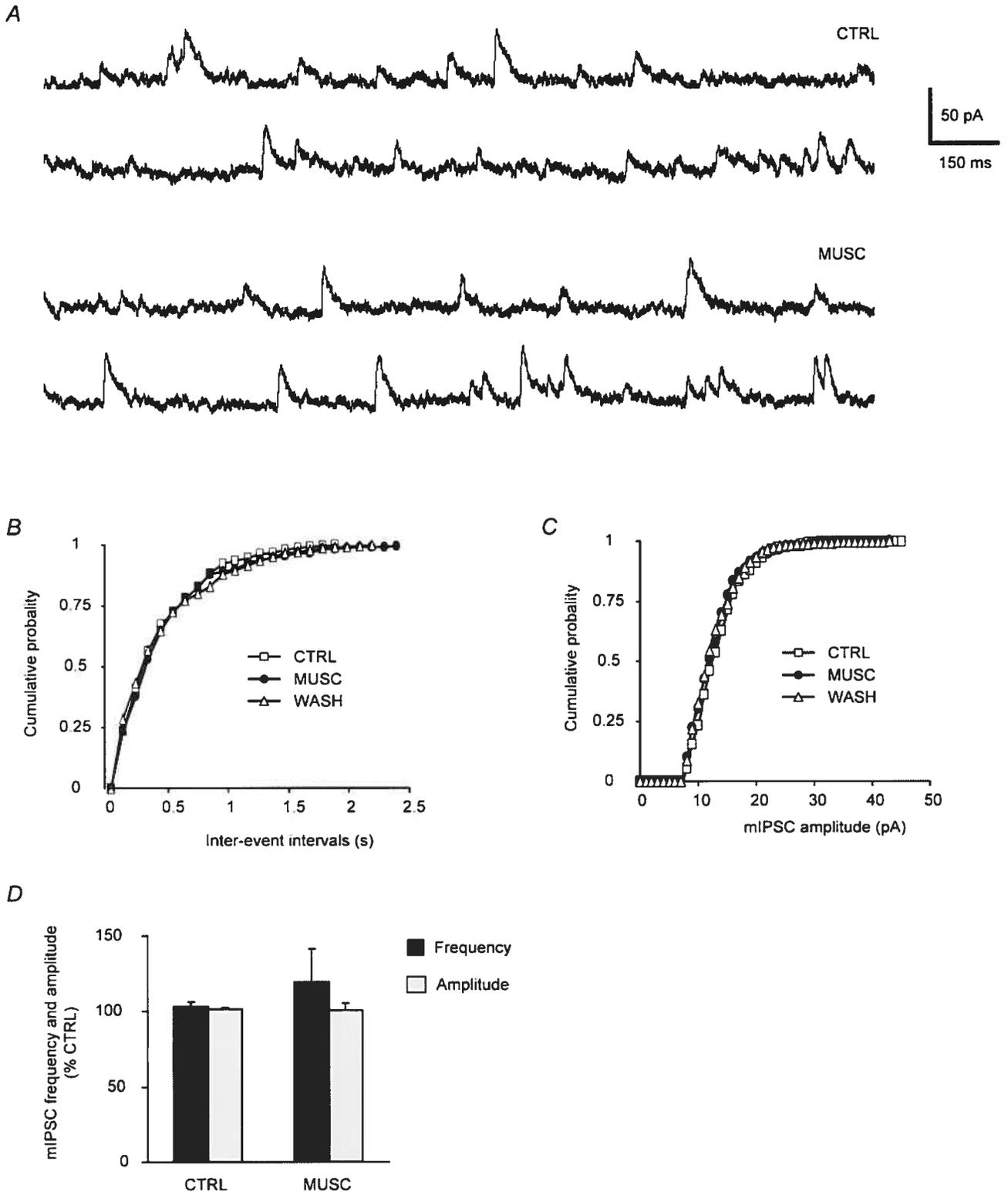
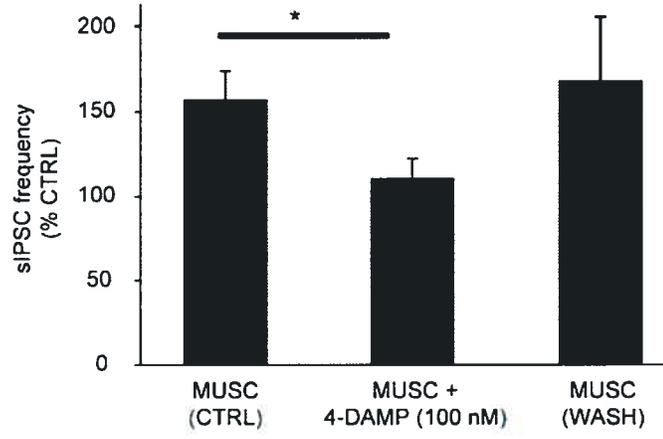
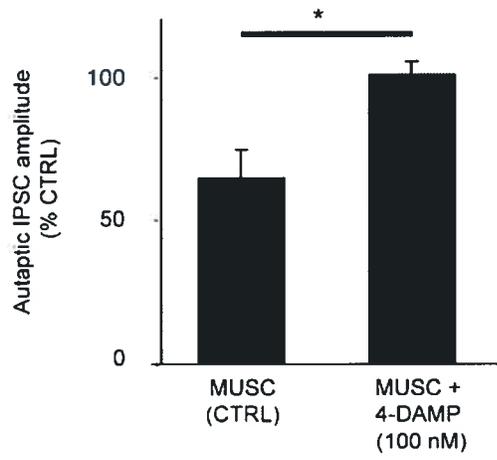


Fig. 7

A



B



C

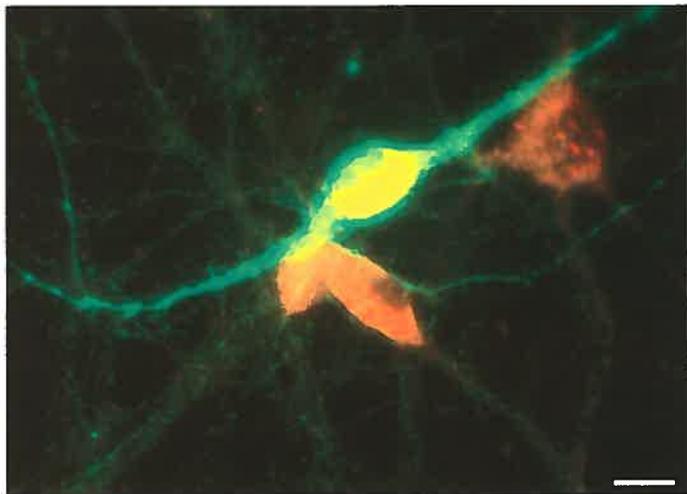


Fig. 8

## Figure legends

**FIGURE 1: ACh enhances spontaneous IPSC frequency.** A) Whole-cell voltage-clamp recording from a cultured mesencephalic neurone that showed an increase in the frequency of sIPSCs in response to 10  $\mu$ M ACh. The neurone was voltage-clamped to 0 mV in the presence of CNQX (10  $\mu$ M). GABAergic events appear as outward currents. B) Bar graph illustrating the average time course of sIPSC frequency and amplitude. Data are presented in 30 s bins and were normalized relative to the control period. ACh (10  $\mu$ M) was applied for 2 min as shown by the black bar ( $n = 55$ ). C) Bar graph summarizing the effect of ACh on sIPSC frequency. The time period showing the maximal effect was chosen for each neurone. Data are represented in events per second (in Hz) ( $n = 55$ ) (\*\*\*) indicates  $p < 0.001$ ). D) Bar graph summarizing the average effect of ACh on sIPSC amplitude for the same time periods represented in C (in pA) ( $n = 55$ ).

**FIGURE 2: Implication of nicotinic receptors in the effects of ACh on spontaneous IPSCs.** A) Whole-cell voltage-clamp recording from a neurone showing an increase in sIPSC frequency in response to ACh (10  $\mu$ M) applied in the presence of the muscarinic receptor antagonist atropine (ATR) (1  $\mu$ M) (*ACh + ATR*). The neurone was voltage-clamped to 0 mV. B) Bar graph representing the average effect of ACh applied in the presence of atropine on sIPSC frequency ( $n = 22$ ) (\* indicates  $p < 0.05$ ). C) Bar graph representing the effect of ACh applied in the presence of atropine on sIPSC amplitude ( $n = 22$ ). D) Effect of mecamylamine (MECA), a nicotinic receptor antagonist, on the increase in sIPSC frequency evoked by ACh applied in the presence of atropine. E) Effect of methyllycaconitine (MLA), another nicotinic receptor antagonist, on the increase in sIPSC frequency evoked by ACh applied in the presence of atropine. Note that only mecamylamine had a significant blocking effect (\* indicates  $p < 0.05$ ).

**FIGURE 3: Enhancement of sIPSC frequency through muscarinic receptors.** A) Whole-cell voltage-clamp recording from a neurone showing an increase in sIPSC frequency in response to 10  $\mu$ M muscarine (*MUSC*). The drug was applied for 2 min (black bar). The holding potential was 0 mV. B) Bar graph illustrating the average time course of sIPSC frequency and amplitude in response to muscarine. Data were normalized and presented in 30 s bins (n = 11). C) Bar graph representing the dose-dependent effect of muscarine on sIPSC frequency and amplitude. The number of cells tested is indicated in parentheses for each dose. \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001

**FIGURE 4: Muscarinic receptor activation increases firing rate.** A) Current-clamp recording from an isolated mesencephalic GABAergic neurone showing an increase in firing rate in response to 10  $\mu$ M muscarine (*MUSC*). Muscarine was applied for 2 min (black bar). B) Graph representing the effect of muscarine on membrane potential. Results are expressed in 30 s bins and as a difference score ( $\Delta$ ) in relation to the control period. The black dots ( $\bullet$ ) represent pooled data from all neurones tested (n = 29). The black triangles ( $\blacktriangle$ ) represent data from neurones identified as responsive to muscarine (n = 14). C) Graph representing the average effect of muscarine on action potential firing rate. Results are expressed in 30 s bins and as a difference score ( $\Delta$ ) in relation to the control period to minimise the effect of the variability in basal firing frequency across individual cells (n = 17).

**FIGURE 5: Calcium-dependent action of muscarine on firing rate.** A) and B) Examples of current-clamp recordings performed from two different neurones showing a decrease in firing frequency in response to muscarine (*MUSC*) (10  $\mu$ M) under conditions where intracellular calcium was chelated by including BAPTA (10 mM) in the patch pipette. Muscarine was applied for 2 min. The trace with an expanded time scale shows the reduced amplitude of AHPs in the presence of BAPTA. A minority of neurones such as the one in B showed a prominent hyperpolarization. C) Graph representing the average peak

effect of muscarine (10  $\mu\text{M}$ ) on firing frequency. Data are presented as percent change relative to the average of the control and washout periods ( $n = 8$ ). The black columns represent data acquired in the presence of the GIRK blocker tertiapin (100 nM). D) Graph representing the average peak effect of muscarine (10  $\mu\text{M}$ ) on membrane potential. Data are presented as percent change relative to the average of the control and washout periods ( $n = 8$ ). The black columns represent data acquired in the presence of tertiapin (100 nM).

**FIGURE 6: Presynaptic inhibition of GABA release through muscarinic receptors.** A) Autaptic IPSC recorded in an isolated GABAergic neurone at a holding potential of -40 mV. The IPSC is preceded by a sodium “action current”. Action current waveforms have been clipped for clarity. The IPSC was blocked by SR95531 (5  $\mu\text{M}$ ), a selective GABA<sub>A</sub> receptor antagonist. Muscarine (*MUSC*) (10  $\mu\text{M}$ ) caused a reversible inhibition of the amplitude of IPSCs. In these figures, each trace is an average of 3 sweeps. B) Whole-cell recordings of membrane currents evoked in the same neurone as in *A* in response to puff-application of exogenous GABA (500  $\mu\text{M}$ ). Muscarine did not affect the amplitude of GABAergic currents. Note that a small residual current persisted after GABA<sub>A</sub> receptor blockage, suggesting a minor component probably mediated by GABA<sub>B</sub> receptors. C) Graph illustrating the average effect of muscarine on the amplitude of autaptic GABAergic currents ( $n = 25$ , in black) and on puff-evoked GABAergic currents ( $n = 4$ , in grey). Note the presence of a gradual 20 % rundown of both responses over the 10 min recording period.

**FIGURE 7: Muscarinic receptor activation does not affect miniature IPSCs.** A) Miniature IPSCs recorded in the presence of TTX under control conditions (*CTRL*) (upper pair of traces) or in the presence of 10  $\mu\text{M}$  muscarine (*MUSC*) (lower pair of traces). B) Cumulative probability distribution of inter-event intervals from a representative experiment. Muscarine (*MUSC*) had no effect of event frequency. C) Cumulative probability distribution of mIPSC amplitudes from the same experiment as in *B*. Muscarine

did not cause any change in mIPSC amplitude. D) Bar graph illustrating the average effect of muscarine on mIPSC amplitude and frequency (n = 12).

**FIGURE 8: The effects of muscarine implicate M3 muscarinic receptors.** A) Bar graph showing the effect of muscarine (*MUSC*) (10  $\mu$ M) on sIPSC frequency (n = 4). Data were normalized to the control period. The preferential M3 receptor antagonist 4-DAMP (100 nM) blocked the effect of muscarine. The effect was reversible. B) Bar graph showing the ability of 4-DAMP (100 nM) to block the reduction of autaptic IPSC amplitude induced by muscarine (n = 4). Data were normalized according to the control period. C) Image showing the result of a double-labelling immunofluorescence experiment performed using an anti-M3 muscarinic receptor antibody (red) and a tyrosine hydroxylase (TH) antibody (green). Note that M3-like immunoreactivity is observed in non-TH (presumed GABAergic) neurones. Scale bar: 15  $\mu$ m.

## References

- Adams P R, Brown D A & Constanti A (1982). Pharmacological inhibition of the M-current. *J Physiol (Lond)* **332**, 223-62.
- Araujo D M, Lapchak P A & Quirion R (1991). Heterogeneous binding of 4-DAMP to muscarinic cholinergic sites in the rat brain: evidence from membrane binding and autoradiographic studies. *Synapse* **9**, 165-76.
- Baba H, Kohno T, Okamoto M, Goldstein P A, Shimoji K & Yoshimura M (1998). Muscarinic facilitation of GABA release in substantia gelatinosa of the rat spinal dorsal horn. *J Physiol (Lond)* **508 ( Pt 1)**, 83-93.
- Bacci A, Huguenard J R & Prince D A (2003). Functional autaptic neurotransmission in fast-spiking interneurons: a novel form of feedback inhibition in the neocortex. *J Neurosci* **23**, 859-66.
- Bayer V E & Pickel V M (1991). GABA-labeled terminals form proportionally more synapses with dopaminergic neurons containing low densities of tyrosine hydroxylase- immunoreactivity in rat ventral tegmental area. *Brain Res* **559**, 44-55.
- Bekkers J M & Stevens C F (1991). Excitatory and inhibitory autaptic currents in isolated hippocampal neurons maintained in cell culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 7834-7838.
- Bergevin A, Girardot D, Bourque M J & Trudeau L E (2002). Presynaptic mu-opioid receptors regulate a late step of the secretory process in rat ventral tegmental area GABAergic neurons. *Neuropharmacology* **42**, 1065-78.
- Blaha C D & Winn P (1993). Modulation of dopamine efflux in the striatum following cholinergic stimulation of the substantia nigra in intact and pedunculopontine tegmental nucleus-lesioned rats. *J Neurosci* **13**, 1035-1044.
- Boulay G, Zhu X, Peyton M, Jiang M, Hurst R, Stefani E & Birnbaumer L (1997). Cloning and expression of a novel mammalian homolog of *Drosophila* transient receptor

- potential (Trp) involved in calcium entry secondary to activation of receptors coupled by the Gq class of G protein. *J Biol Chem* **272**, 29672-29680.
- Cardozo D L (1993). Midbrain dopaminergic neurons from postnatal rat in long-term primary culture. *Neuroscience* **56**, 409-421.
- Carr D B & Sesack S R (2000). GABA-containing neurons in the rat ventral tegmental area project to the prefrontal cortex. *Synapse* **38**, 114-23.
- Charpentier E, Barneoud P, Moser P, Besnard F & Sgard F (1998). Nicotinic acetylcholine subunit mRNA expression in dopaminergic neurons of the rat substantia nigra and ventral tegmental area. *Neuroreport* **9**, 3097-3101.
- Clarke P B, Hommer D W, Pert A & Skirboll L R (1987). Innervation of substantia nigra neurons by cholinergic afferents from pedunculopontine nucleus in the rat: neuroanatomical and electrophysiological evidence. *Neuroscience* **23**, 1011-1019.
- Cole A E & Nicoll R A (1984). The pharmacology of cholinergic excitatory responses in hippocampal pyramidal cells. *Brain Res* **305**, 283-90.
- Colino A & Halliwell J V (1993). Carbachol potentiates Q current and activates a calcium-dependent non-specific conductance in rat hippocampus in vitro. *Eur J Neurosci* **5**, 1198-209.
- Congar P, Bergevin A & Trudeau L E (2002). D2 receptors inhibit the secretory process downstream from calcium influx in dopaminergic neurons: implication of K<sup>+</sup> channels. *J Neurophysiol* **87**, 1046-1056.
- Dahlstrom A & Fuxe K (1964). Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia* **20**, 398-9.
- Di Chiara G & Imperato A (1988). Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 5274-8.
- Erhardt S, Schwieler L & Engberg G (2002). Excitatory and inhibitory responses of dopamine neurons in the ventral tegmental area to nicotine. *Synapse* **43**, 227-37.
- Fernandez-Fernandez J M, Wanaverbecq N, Halley P, Caulfield M P & Brown D A (1999). Selective activation of heterologously expressed G protein-gated K<sup>+</sup> channels by

- M2 muscarinic receptors in rat sympathetic neurones. *J Physiol (Lond)* **515 ( Pt 3)**, 631-7.
- Fiorillo C D & Williams J T (2000). Cholinergic inhibition of ventral midbrain dopamine neurons. *J Neurosci* **20**, 7855-60.
- Forster G L & Blaha C D (2000). Laterodorsal tegmental stimulation elicits dopamine efflux in the rat nucleus accumbens by activation of acetylcholine and glutamate receptors in the ventral tegmental area. *Eur J Neurosci* **12**, 3596-3604.
- Forster G L, Yeomans J S, Takeuchi J & Blaha C D (2002). M5 muscarinic receptors are required for prolonged accumbal dopamine release after electrical stimulation of the pons in mice. *J Neurosci* **22**, RC190
- Fraser D D & MacVicar B A (1996). Cholinergic-dependent plateau potential in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* **16**, 4113-28.
- Garzon M, Vaughan R A, Uhl G R, Kuhar M J & Pickel V M (1999). Cholinergic axon terminals in the ventral tegmental area target a subpopulation of neurons expressing low levels of the dopamine transporter. *J Comp Neurol* **410**, 197-210.
- Grace A A (1991). Phasic versus tonic dopamine release and the modulation of dopamine system responsivity: a hypothesis for the etiology of schizophrenia. *Neuroscience* **41**, 1-24.
- Grace A A & Bunney B S (1986). Induction of depolarization block in midbrain dopamine neurons by repeated administration of haloperidol: analysis using in vivo intracellular recording. *J Pharmacol Exp Ther* **238**, 1092-100.
- Grenhoff J, Nisell M, Ferre S, Aston-Jones G & Svensson T H (1993). Noradrenergic modulation of midbrain dopamine cell firing elicited by stimulation of the locus coeruleus in the rat. *J Neural Transm Gen Sect* **93**, 11-25.
- Grillner P, Berretta N, Bernardi G, Svensson T H & Mercuri N B (2000). Muscarinic receptors depress GABAergic synaptic transmission in rat midbrain dopamine neurons. *Neuroscience* **96**, 299-307.
- Gronier B, Perry K W & Rasmussen K (2000). Activation of the mesocorticolimbic dopaminergic system by stimulation of muscarinic cholinergic receptors in the ventral tegmental area. *Psychopharmacology (Berl)* **147**, 347-355.

- Gronier B & Rasmussen K (1998). Activation of midbrain presumed dopaminergic neurones by muscarinic cholinergic receptors: an in vivo electrophysiological study in the rat. *Br J Pharmacol* **124**, 455-464.
- Guerineau N C, Bossu J L, Gahwiler B H & Gerber U (1995). Activation of a nonselective cationic conductance by metabotropic glutamatergic and muscarinic agonists in CA3 pyramidal neurons of the rat hippocampus. *J Neurosci* **15**, 4395-4407.
- Guo J Z & Chiappinelli V A (2000). Muscarinic receptors mediate enhancement of spontaneous GABA release in the chick brain. *Neuroscience* **95**, 273-282.
- Imperato A, Mulas A & Di Chiara G (1986). Nicotine preferentially stimulates dopamine release in the limbic system of freely moving rats. *Eur J Pharmacol* **132**, 337-8.
- Jin W & Lu Z (1998). A novel high-affinity inhibitor for inward-rectifier K<sup>+</sup> channels. *Biochemistry* **37**, 13291-9.
- Jin W & Lu Z (1999). Synthesis of a stable form of tertiapin: a high-affinity inhibitor for inward-rectifier K<sup>+</sup> channels. *Biochemistry* **38**, 14286-93.
- Johnson S W & North R A (1992a). Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *J Neurosci* **12**, 483-488.
- Johnson S W & North R A (1992b). Two types of neurone in the rat ventral tegmental area and their synaptic inputs. *J Physiol (Lond)* **450**, 455-468.
- Kalivas P W (1993). Neurotransmitter regulation of dopamine neurons in the ventral tegmental area. *Brain Res Brain Res Rev* **18**, 75-113.
- Kitamura H, Yokoyama M, Akita H, Matsushita K, Kurachi Y & Yamada M (2000). Tertiapin potently and selectively blocks muscarinic K(+) channels in rabbit cardiac myocytes. *J Pharmacol Exp Ther* **293**, 196-205.
- Klink R & Alonso A (1997a). Ionic mechanisms of muscarinic depolarization in entorhinal cortex layer II neurons. *J Neurophysiol* **77**, 1829-43.
- Klink R & Alonso A (1997b). Muscarinic modulation of the oscillatory and repetitive firing properties of entorhinal cortex layer II neurons. *J Neurophysiol* **77**, 1813-1828.
- Klink R, d'Exaerde A A, Zoli M & Changeux J P (2001). Molecular and Physiological Diversity of Nicotinic Acetylcholine Receptors in the Midbrain Dopaminergic Nuclei. *J Neurosci* **21**, 1452-1463.

- Kuzmiski J B & MacVicar B A (2001). Cyclic nucleotide-gated channels contribute to the cholinergic plateau potential in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* **21**, 8707-14.
- Levey A I (1993). Immunological localization of m1-m5 muscarinic acetylcholine receptors in peripheral tissues and brain. *Life Sci* **52**, 441-8.
- Madison D V, Lancaster B & Nicoll R A (1987). Voltage clamp analysis of cholinergic action in the hippocampus. *J Neurosci* **7**, 733-41.
- Mansvelder H D, Keath J R & McGehee D S (2002). Synaptic mechanisms underlie nicotine-induced excitability of brain reward areas. *Neuron* **33**, 905-919.
- Michel A D, Stefanich E & Whiting R L (1989). Direct labeling of rat M3-muscarinic receptors by [3H]4DAMP. *Eur J Pharmacol* **166**, 459-66.
- Michel F J & Trudeau L E (2000). Clozapine inhibits synaptic transmission at GABAergic synapses established by ventral tegmental area neurones in culture. *Neuropharmacology* **39**, 1536-1543.
- Minke B & Cook B (2002). TRP channel proteins and signal transduction. *Physiol Rev* **82**, 429-472.
- Nestler E J & Aghajanian G K (1997). Molecular and cellular basis of addiction. *Science* **278**, 58-63.
- Sanghera M K, Trulson M E & German D C (1984). Electrophysiological properties of mouse dopamine neurons: in vivo and in vitro studies. *Neuroscience* **12**, 793-801.
- Shalinsky M H, Magistretti J, Ma L & Alonso A A (2002). Muscarinic activation of a cation current and associated current noise in entorhinal-cortex layer-II neurons. *J Neurophysiol* **88**, 1197-211.
- Suaud-Chagny M F, Chergui K, Chouvet G & Gonon F (1992). Relationship between dopamine release in the rat nucleus accumbens and the discharge activity of dopaminergic neurons during local in vivo application of amino acids in the ventral tegmental area. *Neuroscience* **49**, 63-72.
- Sui J L, Chan K, Langan M N, Vivaudou M & Logothetis D E (1999). G protein gated potassium channels. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* **33**, 179-201.

- Sulzer D, Joyce M P, Lin L, Geldwert D, Haber S N, Hattori T & Rayport S (1998). Dopamine neurons make glutamatergic synapses in vitro. *J Neurosci* **18**, 4588-4602.
- Uchimura N & North R A (1990). Muscarine reduces inwardly rectifying potassium conductance in rat nucleus accumbens neurones. *J Physiol (Lond)* **422**, 369-80.
- Van Bockstaele E J & Pickel V M (1995). GABA-containing neurons in the ventral tegmental area project to the nucleus accumbens in rat brain. *Brain Res* **682**, 215-21.
- Vilaro M T, Palacios J M & Mengod G (1990). Localization of m5 muscarinic receptor mRNA in rat brain examined by in situ hybridization histochemistry. *Neurosci Lett* **114**, 154-159.
- Walaas I & Fonnum F (1980). Biochemical evidence for gamma-aminobutyrate containing fibres from the nucleus accumbens to the substantia nigra and ventral tegmental area in the rat. *Neuroscience* **5**, 63-72.
- Weiner D M, Levey A I & Brann M R (1990). Expression of muscarinic acetylcholine and dopamine receptor mRNAs in rat basal ganglia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 7050-7054.
- Westerink B H, Kwint H F & deVries J B (1996). The pharmacology of mesolimbic dopamine neurons: a dual-probe microdialysis study in the ventral tegmental area and nucleus accumbens of the rat brain. *J Neurosci* **16**, 2605-2611.
- Wolf P, Olpe H R, Avrith D & Haas H L (1978). GABAergic inhibition of neurons in the ventral tegmental area. *Experientia* **34**, 73-74.
- Xu S H, Honda E, Ono K & Inenaga K (2001). Muscarinic modulation of GABAergic transmission to neurons in the rat subfornical organ. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **280**, R1657-R1664
- Yeomans J, Forster G & Blaha C (2001). M5 muscarinic receptors are needed for slow activation of dopamine neurons and for rewarding brain stimulation. *Life Sci* **68**, 2449-56.

- Yin R & French E D (2000). A comparison of the effects of nicotine on dopamine and non-dopamine neurons in the rat ventral tegmental area: an in vitro electrophysiological study. *Brain Res Bull* **51**, 507-514.
- Zhang L & Saffen D (2001). Muscarinic acetylcholine receptor regulation of TRP6 Ca<sup>2+</sup> channel isoforms. Molecular structures and functional characterization. *J Biol Chem* **276**, 13331-13339.
- Zhu X, Jiang M & Birnbaumer L (1998). Receptor-activated Ca<sup>2+</sup> influx via human Trp3 stably expressed in human embryonic kidney (HEK)293 cells. Evidence for a non-capacitative Ca<sup>2+</sup> entry. *J Biol Chem* **273**, 133-142.
- Zitt C, Halaszovich C R & Luckhoff A (2002). The TRP family of cation channels: probing and advancing the concepts on receptor-activated calcium entry. *Prog Neurobiol* **66**, 243-264.
- Zubieta J K & Frey K A (1993). Autoradiographic mapping of M3 muscarinic receptors in the rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* **264**, 415-22.
- Zweifach A & Lewis R S (1993). Mitogen-regulated Ca<sup>2+</sup> current of T lymphocytes is activated by depletion of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 6295-9.

## **Article 2 : Muscarinic receptors mediate $\text{Ca}^{2+}$ influx in rat mesencephalic GABAergic neurons through PKC-dependent activation of receptor-operated channels**

Cette étude fait suite au premier article et a été effectuée en parallèle. L'implication des récepteurs muscariniques dans l'augmentation du taux de décharge des neurones GABAergiques nous a mené à mesurer les variations de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Nous savons que les récepteurs M3 et M5 sont couplés à des protéines  $G_{q/11}$  et que seuls ces récepteurs semblent être exprimés dans les noyaux DAergiques. Nous avons confirmé que la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  est influencée par l'activation des récepteurs muscariniques tant dans les neurones GABAergiques que DAergiques. Nous avons ensuite utilisé divers antagonistes qui nous ont permis d'exclure les récepteurs M1 (effet partiel de la pirenzépine à 100 nM), M2 (pas d'effet de l'AFDX-116) et M4 (pas d'effet du tropicamide). La distinction pharmacologique des récepteurs M3 et M5 n'est pas encore possible de façon satisfaisante, nous avons donc tiré partie d'une lignée de souris transgéniques dont le récepteur M5 n'est plus fonctionnel. Cette lignée nous a permis de conclure que c'est le récepteur M3 qui contrôle en grande partie les effets de la muscarine sur les neurones du mésencéphale ventral. Il reste possible que le récepteur M5 ait une influence mineure chez le rat. Nous avons ensuite démontré que la hausse de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  est due à un influx de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire. Cet influx est dépendant de l'activation de la PKC dans les neurones GABAergiques. De façon intéressante, l'effet de la muscarine dans les neurones DAergiques est indépendant de la PKC. C'est la seule différence évidente qui a pu être observée entre ces deux types cellulaires lors de cette étude. Une voie d'entrée potentielle pour le  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire consiste dans l'activation des canaux calciques dépendants du voltage. L'étude des courants calciques isolés nous montre que la muscarine, loin d'activer un influx calcique par ces canaux, a plutôt tendance à les inhiber. Une autre voie d'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire, en accord avec les différentes observations faites en électrophysiologie et en imagerie calcique, viendrait de l'activation

de canaux activés par les RCPG (ROC pour receptor-operated channels). Ces canaux sont peu décrits mais ils comporteraient une certaine sélectivité pour le calcium et sont activés par la voie de transduction qui suit l'activation de la PLC. Les meilleurs candidats font partie de la famille des canaux TRP. Ces canaux sont exprimés dans nos cellules et une molécule connue pour les bloquer (le SKF 96365) inhibe également l'effet de la muscarine que nous observons sur notre préparation.

En conclusion, nous avons confirmé que les récepteurs muscariniques M3 interviennent dans la régulation de l'activité des neurones GABAergiques du mésencéphale ventral. Ils activent des mécanismes impliquant le calcium intracellulaire et la PKC qui vont aboutir à l'augmentation du taux de décharge observé lors du premier article.



## Summary

GABAergic neurones in the mesencephalon are critical regulators of dopamine neurones and are a prime target of opiate drugs. Cholinergic projections from mesopontine nuclei preferentially synapse onto these local GABAergic neurones, thus suggesting that in addition to any direct effects, ACh can also regulate dopamine neurones indirectly by modulating GABAergic interneurones. How muscarinic receptors mediate excitation of mesencephalic GABAergic neurones is unknown, but recent work suggests that a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent mechanism is involved. Using a mesencephalic primary culture model, we show here that muscarine (10  $\mu\text{M}$ ) increases intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) in GABAergic neurones. The M3 receptor appears to be the primary mediator of this increase, which is also seen in M5 knockout mice. The rise in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induced by muscarine was not activity-dependant but required influx of  $\text{Ca}^{2+}$  from the extracellular medium. Consistent with the known coupling of M3 receptors to PKC, the effect of muscarine was blocked by bisindolylmaleimide, a selective PKC antagonist.  $\text{Co}^{2+}$  and  $\text{Gd}^{2+}$ , two broad-spectrum blockers of  $\text{Ca}^{2+}$  channels, also blocked the action of muscarine. However, voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels were not involved. Compatible with the hypothesis of an involvement of receptor-operated channels, muscarine-induced  $\text{Ca}^{2+}$  increase was inhibited by SKF 96365 and verapamil, drugs known to block non-selective cationic channels such as those formed by TRPC proteins. Finally, GABAergic neurones were found to be immunopositive for TRPC 1, 3, 5 and 6. Taken together, these results suggest that the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent regulation of mesencephalic GABAergic neurones by muscarinic acetylcholine receptors requires activation of receptor-operated channels through a PKC-dependent mechanism.

## Key words

Muscarinic, midbrain, acetylcholine.

## Introduction

Central dopamine (DA) pathways such as the nigro-striatal and meso-cortico-limbic systems are implicated in motor activity and motivational processes (Kalivas & Stewart, 1991). Although the ventral part of the mesencephalon is composed principally of DA neurones, about 20% are GABAergic neurones (Bayer & Pickel, 1991; Johnson & North, 1992b). Such GABAergic interneurones are key targets of opiate drugs, which activate DA neurones by inhibiting local GABAergic neurones (Johnson & North, 1992a).

The ventral mesencephalon receives abundant cholinergic afferents from mesopontine nuclei (Clarke *et al.*, 1987; Oakman *et al.*, 1995). Interestingly, the majority (65%) of cholinergic fibres in this area impinge on DA transporter-negative neurones that are presumed to be mostly GABAergic (Garzon *et al.*, 1999). Although acetylcholine (ACh) is thought to directly excite DAergic neurones (Imperato *et al.*, 1986; Gronier *et al.*, 2000), this preferential innervation of GABAergic neurones suggests that in part, ACh also exerts its effects on DAergic neurones by affecting local GABAergic interneurones. ACh can act through nicotinic ionotropic receptors or through muscarinic G-protein-coupled receptors. Muscarinic receptors control GABA release in several structures of the central nervous system (CNS) (Baba *et al.*, 1998; Guo & Chiappinelli, 2001) including the ventral tegmental area (Grillner *et al.*, 2000). Of the five cloned muscarinic receptors, only M3 and M5 mRNAs, part of the M1-like family, have been reported to be present in the ventral mesencephalon. However, their specific cellular localization has not yet been explored (Vilaro *et al.*, 1990; Weiner *et al.*, 1990; Zubieta & Frey, 1993). It has been demonstrated that DAergic neurones are rapidly excited through muscarinic "M1-like" receptors located in the ventral mesencephalon (Lacey *et al.*, 1990). In addition, a delayed enhancement in DA release is mediated through M5 receptors located in the ventral mesencephalon (Forster *et al.*, 2002; Gronier *et al.*, 2000). Although the net effect of muscarinic activation in the

ventral mesencephalon is excitatory, the specific role of local GABAergic neurones in muscarinic regulation has not been studied.

We have recently discovered that muscarine enhances the firing rate of mesencephalic GABAergic neurones by a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent mechanism (Michel, Robillard and Trudeau, submitted). It is now critical to determine the nature of this  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent mechanism to better understand how muscarinic receptors regulate GABAergic neurones. M3 and M5 muscarinic receptors are coupled to  $\text{G}_{q/11}$  proteins and stimulate phospholipase C leading to activation of PKC and release of  $\text{Ca}^{2+}$  from intracellular stores (van Koppen & Kaiser, 2003). Muscarinic receptors can also activate  $\text{Ca}^{2+}$  influx through some store- and voltage-independent  $\text{Ca}^{2+}$  channels (Felder *et al.*, 1992; Zhu *et al.*, 1998), often referred to as receptor-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels. Molecular characterization of receptor-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels is not complete, but  $\text{Ca}^{2+}$  influx mediated through such a modality is likely to result from channels assembled from homologues of drosophila *transient receptor potential* (TRP) channels (Zitt *et al.*, 2002). Here we show that muscarinic receptor activation causes influx of  $\text{Ca}^{2+}$  from the extracellular medium. This influx requires PKC activation and depends on receptor-operated channels blocked by SKF 96365 and verapamil.

## Methods

*Cell culture:* Experiments were performed using primary cultures of mesencephalic neurones as previously described (Cardozo, 1993; Sulzer *et al.*, 1998; Congar *et al.*, 2002). Briefly, coverslips coated with collagen/poly-L-lysine were covered with a monolayer of mesencephalic astrocytes, over which the neurones were subsequently plated. To prepare astrocyte cultures, neonatal (P0 to P2) Sprague-Dawley rats were cryoanesthetized. Brains were quickly removed from the skull and placed in ice-cold dissociation solution. A 2 mm<sup>3</sup> block of ventral midbrain tissue was rapidly isolated from a 1 mm-thick slice cut at the level of the midbrain flexure. The tissue was then digested with papain (Worthington Biochemical Corp., Lakewood, NJ, USA) for 60 min at 37 °C before being gently triturated using glass pipettes of decreasing diameters until a single-cell suspension was obtained. Cells grown in culture flasks and maintained in Basal Medium Eagle with Earl's Salts (Invitrogen, Burlington, On, Canada) supplemented with penicillin/streptomycin, GlutaMAX-1 (Invitrogen), 10% foetal calf serum (Invitrogen) and Mito+ serum extender (VWR Canlab, Montréal, Qc, Canada). After the first 48 hours, culture flasks were vigorously washed with cold medium to remove most neurones, leaving only tightly adherent astrocytes. After reaching confluence, astrocytes were gently trypsinized, washed, collected, counted and plated at a concentration of 100 000 living cells per millilitre. Twenty-four hours after plating, astrocytes covered most of the available surface and further division was inhibited with 5-fluoro-2-deoxyuridine (FUDR).

To prepare neurones, neonatal (P0 to P2) Sprague-Dawley rats were cryoanesthetized and the ventral mesencephalon was rapidly isolated. As for the astrocyte preparation, the tissue was digested with papain for 30 min at 37 °C, before being gently triturated. The dissociated cells were then collected by centrifugation, counted and diluted at a density titrated to 240 000 living cells per millilitre in order to optimise neuronal viability and connectivity. Further astrocyte division was inhibited by a second addition of FUDR 24 hours after neurones were plated. Neurone cultures were maintained in

Neurobasal A / BME (2:1), penicillin/streptomycin, GlutaMAX-1, 10% foetal calf serum (Hyclone Laboratories, Logan, UT) and B27 serum extender (Invitrogen). Kynurenate (0.5 mM) was added to the culture medium 7 days after neurones were plated in order to prevent excitotoxicity. Cell cultures were incubated at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Experiments were performed on neurones between 10 to 30 days after plating.

Electrophysiological recordings were performed on single isolated GABAergic neurones in “micro-dot” cultures. In this model, cultured neurones are plated on micro-droplets of substrate that limit synaptic connectivity to cells within the droplet. In some droplets, single GABAergic neurones can be found that establish synaptic connections onto their own dendrites and cell body, thus allowing the measurement of GABA-mediated “autaptic” currents (Bekkers & Stevens, 1991; Michel & Trudeau, 2000; Bergevin *et al.*, 2002). To prepare micro-dot cultures, coverslips were coated first with Poly-L-Ornithine and then with agarose (0.05%). Micro-droplets of collagen were then applied with a micro-sprayer. Astrocytes and neurones were then plated in much the same way as for standard cultures, although final cell concentrations for astrocytes and neurones were 60 000 and 100 000 living cells per millilitres, respectively. These cell dilutions were established to maximize the number of micro-dots containing single neurones.

Wild type (WT) and M5 knock-out (KO) mice (strain CD1-129SvJ) were obtained from the University of Toronto (Toronto, Ontario, Canada) and were described previously (Yeomans *et al.*, 2001; Takeuchi *et al.*, 2002). Mouse cultures were prepared according to the same protocols as described for rats. Neurones from WT and KO mice were plated over glial cells prepared from WT and KO mesencephalon, respectively.

All procedures were approved by the animal ethical committee of the Université de Montréal.

*Intracellular calcium imaging:* Cells were loaded for 50-60 min at room temperature with Fura-2 AM (5 µM) (Molecular Probes Inc., Eugene, OR) and pluronic

acid (0.2%). Fluorescence images were collected through a Nikon Eclipse TE-200 inverted microscope coupled to a Hamamatsu Orca-II digital cooled CCD camera. Ratio fluorescence excitation at 340/380 nm was driven by fast optical switch (DG4) (Sutter Instruments, Novato, CA) and images were recorded with an Inovision workstation using Isee software (Inovision Corporation, Raleigh, NC, USA.). Images were captured at a frequency of 0.2 Hz. Ratio values were converted to  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations using Grynkiewicz's equation (Grynkiewicz *et al.*, 1985) and an *in situ* calibration protocol to determine  $R_{\max}$  and  $R_{\min}$  values. Cells were perfused with normal extracellular saline containing (in mM): NaCl 140, KCl 5,  $\text{MgCl}_2$  2,  $\text{CaCl}_2$  2, N-(2-hydroxyethyl) piperazine-N-(2-ethanesulfonic acid) (HEPES) 10, glucose 10, sucrose 6, (pH of 7.35; 300 mOsm). Drugs were diluted and applied in standard saline solution. In most experiments, tetrodotoxin (TTX; 0.5  $\mu\text{M}$ ) (Alomone Labs, Jerusalem, Israel) was added to the extracellular medium to inhibit spontaneous action potentials and restrict analysis to neurones directly activated by the muscarinic receptor agonist. At the end of each experiment, saline containing 40 mM  $\text{K}^+$  was applied for one min to depolarise neurones and verify their viability. Finally, a digital phase contrast micrograph of the field was acquired and fluorescent micro-spheres (Duke Scientific Corp., Palo Alto, CA) were deposited locally using a patch pipette to facilitate the localization of the imaged neurones following immunolabelling to determine whether neurones were GABAergic (anti-GABA antibody) or DAergic (anti-tyrosine hydroxylase antibody).

As muscarinic effects on  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  virtually did not desensitise (see results and Fig. 2C and 2D) most of the imaging experiments followed the same basic procedure involving three successive applications of muscarine. The first application provided a control response for each cell. The second application of muscarine was performed in the presence of the test drug. The last application of muscarine permitted an evaluation of the extent of drug washout and effect reversibility.

*Electrophysiology:* Calcium currents were recorded at room temperature on micro-dot cultures. Signals were recorded with a WARNER PC-505 or PC-501 patch-clamp amplifier (Warner Instrument Corp, Hamden, CT), filtered at 1 kHz, digitised at 5 kHz and analysed with Pclamp 8 software (Axon Instruments, Foster City, CA). Patch pipettes were prepared with borosilicate glass and had a resistance of  $5 \pm 0.5 \text{ M}\Omega$ . Intrapipette solution contained (in mM): CsF 68, CsCl 56,  $\text{MgCl}_2$  2.2, EGTA 4.5, Creatine phosphate (tris Salt) 14, ATP (Mg salt) 4, GTP (Tris salt) 0.3, HEPES 9 (pH 7.35 adjusted with CsOH 50%; 300 mOsm). The phenotype of the recorded neurone was first tested by recording autaptic synaptic currents in normal saline. To evoke autaptic synaptic currents, isolated neurones were stimulated every 15 sec with a brief (1 ms) voltage command pulse to 20 mV from a holding potential of -40 to -70 mV. Blockade of the synaptic response with SR95531 (5  $\mu\text{M}$ ), a selective and potent antagonist of  $\text{GABA}_A$  receptors, confirmed the GABAergic nature of the recorded neurone. Calcium currents were isolated and recorded with an extracellular solution containing (in mM): TEACl 160,  $\text{BaCl}_2$  5, HEPES 10 and TTX 0.5 (pH of 7.35 adjusted with TEAOH 20%; 300 mOsm). At the end of each experiment, cadmium (1 mM), a broad-spectrum blocker of voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels, was applied to confirm that  $\text{Ca}^{2+}$  currents were correctly isolated. In experiments where action potentials were recorded, the extracellular saline contained (in mM): NaCl 140, KCl 5,  $\text{MgCl}_2$  2,  $\text{CaCl}_2$  2, HEPES 10, glucose 10, sucrose 6 (pH 7.35 adjusted with NaOH 2 N; 300 mOsm). Action potentials were recorded in micro-dot cultures with a  $\text{K}^+$  methylsulfate intrapipette solution containing (in mM):  $\text{KMeSO}_4$  120, KCl 20, NaCl 5, Phosphocreatine (Tris salt) 10, ATP (Mg salt) 4, GTP (Tris salt) 0.5, HEPES 10, EGTA 0.1, (pH 7.35; 295 mOsm). Events were detected and analysed with Mini Analysis Software (version 5) by Synaptosoft Inc. (Leonia, NJ, USA).

*Immunocytochemistry:* The phenotype of neurones was determined, when necessary, by *post hoc* immunocytochemical double labelling. Cells were fixed in paraformaldehyde (4%), permeated with Triton X-100 (0.1%) and non-specific sites were blocked with a solution containing BSA (0.5%), Triton X-100 (0.1%) and goat serum (5%).

Primary mouse monoclonal (1:100) or rabbit polyclonal (1:500) (Sigma) antibodies raised against GABA were used to identify GABAergic neurones. Anti-tyrosine hydroxylase (TH) mouse monoclonal (1:1000) (Pelfrez Biological, AK, USA) or rabbit polyclonal (1:5000) (Sigma) antibodies allowed identification of DAergic neurones. Fluorescent secondary antibodies used included Alexa-488, Alexa-546 or Alexa-647 (1:200) (Molecular Probes) or the DAB-HRP system (Jackson Immuno-Research Laboratories Inc. PA, USA). TRPC antibodies (1:500) were all from Alomone Labs, except anti-TRPC5 that was kindly provided by Dr. William Schilling from Case Western Reserve University School of Medicine, (Cleveland, Ohio) (Goel *et al.*, 2002). Images of immunofluorescent labelling were acquired using a point-scanning confocal microscope from Prairie Technologies LLC (Middleton, WI, USA). Excitation was achieved using the 488 nm line of an argon ion laser and with the 633 nm line of a helium-neon laser.

*Data processing:* As not all neurones were responsive to muscarine under our conditions, we included in our final analyses only neurones identified as “responsive”. To determine objectively if a cell was responsive or not, we determined whether the recorded signal changed by at least two standard deviations ( $2\sigma$ ) away from control level in response to muscarine. A third of all recorded neurones were thus discarded.

Data presented in the text are expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical comparisons used Student’s paired t-test or analysis of variance (ANOVA) with probability value corrected by Tukey’s *post hoc* test. In figures, \* indicates  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$  and \*\*\* :  $p < 0.001$ .

*Products:* All chemicals were obtained from Sigma-Aldrich (Oakville, Ont. Canada) except when indicated.

## Results

### **Muscarinic enhancement in firing rate in GABAergic mesencephalic neurones is Ca<sup>2+</sup>-dependent.**

GABAergic neurones in the mesencephalon receive abundant innervation from mesopontine cholinergic nuclei. Compatible with an excitatory action of acetylcholine on these GABAergic neurones, muscarine, a selective agonist for muscarinic receptors, induced a sustained increase in firing rate (Fig. 1A), as we recently reported (Michel & Trudeau, 2001) (Michel, Robillard and Trudeau, submitted). This excitatory effect was blocked by including the Ca<sup>2+</sup> chelator BAPTA (10 mM) in the intrapipette solution, revealing a residual inhibitory action (Fig. 1B). This demonstrates that muscarinic receptors mediate excitation of GABAergic neurones through a Ca<sup>2+</sup>-dependent mechanism.

### **Muscarinic receptors directly regulate [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in mesencephalic GABAergic neurones**

To elucidate the nature of the Ca<sup>2+</sup> signal that underlies the muscarine-induced increase in firing rate, we monitored intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) using Fura-2 and Ca<sup>2+</sup> imaging. The level of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> was measured in individual cells, and the GABAergic or DAergic phenotype of imaged neurones was determined *post hoc* by immunocytochemistry. The average basal level of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> across all neurones was 152 ± 11 nM (n = 274) in normal saline containing TTX (0.5 μM). In GABAergic neurones, muscarine increased [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> above control by 187 ± 15 nM (223% of control; n = 199; p < 0.01, unpaired Student t-test) (Fig. 2A, 2B). After washout of TTX, a second application of muscarine caused a similar, although slightly smaller effect on average (112 ± 20 nM above control (174% of control; n = 73; p < 0.01, unpaired Student t-test)) (Fig. 2B). The effect of muscarine therefore did not require cell firing.

The specificity of muscarine's effect was confirmed by the complete inhibition of the muscarine-evoked increase in  $[Ca^{2+}]_i$  by atropine (1  $\mu$ M), a broad-spectrum but selective antagonist of muscarinic acetylcholine receptors ( $101 \pm 3\%$  of control) ( $n = 9$ ;  $p < 0.05$ , paired t-test) (Fig. 2A, 2B). The response to muscarine did not show any obvious desensitisation as three successive applications of muscarine evoked comparable responses ( $150 \pm 47\%$ ,  $154 \pm 44\%$  and  $132 \pm 43\%$  of control;  $n = 7$ ) (Fig. 2C, 2D). A brief 1 minute pulse of 40 mM  $K^+$  saline was applied at the end of each recording session to depolarise neurones and evoke a brief  $[Ca^{2+}]_i$  elevation, thus confirming their viability.

### **Implication of the M3 muscarinic receptor.**

To date, among the five cloned muscarinic receptors, only M3 and M5 mRNA have been detected in the ventral mesencephalon (Vilaro *et al.*, 1990; Weiner *et al.*, 1990). No previous study has directly determined the presence and functional role of either receptor directly in mesencephalic GABAergic neurones (Grillner *et al.*, 2000; Yeomans *et al.*, 2001). Because muscarinic agonists are not sufficiently selective to discriminate among various muscarinic receptors, we tested the ability of muscarinic receptor antagonists to block muscarine-induced increases in  $[Ca^{2+}]_i$ .

First, AFDX-116 (500 nM) and tropicamide (100 nM) did not inhibit muscarine's effect on  $[Ca^{2+}]_i$  ( $132 \pm 21\%$  and  $90 \pm 26\%$  of control, respectively) (Fig. 3A). This suggests that M2 and M4 muscarinic receptors are unlikely to be implicated in the rise in  $[Ca^{2+}]_i$  induced by muscarine. We next tested pirenzepine (100 nM), known to block preferentially the M1 receptor, 4-DAMP (100 nM), known to block preferentially the M3 receptor, and oxybutynin (100 and 10 nM), another potent M3 antagonist that displays particularly low affinity for the M5 receptor (Watson *et al.*, 1999; Caulfield & Birdsall, 1998; Eglén *et al.*, 1999). All these drugs inhibited significantly the effect of muscarine ( $54 \pm 10\%$ ;  $6 \pm 5\%$ ;  $23 \pm 9\%$  and  $48 \pm 17\%$  of control, respectively) (Fig. 3B) but their respective potency indicates that M3 receptors are likely to be playing the major role. The

pharmacological profile of responses evoked in DAergic neurones was not examined in detail due to the lower number of neurones detected.

Because there is no specific antagonist for M5 receptors, it is very difficult to distinguish without ambiguity between M3 and M5 receptors. To overcome this problem, we prepared ventral mesencephalic primary cultures from wild-type CD1-129SvJ mice (WT) and from homozygote mutant mice (M5-KO) in which the M5 muscarinic receptor is not expressed (Yeomans *et al.*, 2001; Takeuchi *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2002). Muscarine-evoked  $[Ca^{2+}]_i$  increases in mice GABAergic neurones ( $64 \pm 15$  nM above baseline;  $n = 23$ ) were generally smaller than in rat neurones ( $187 \pm 15$  nM above baseline;  $n = 199$ ) ( $p < 0.001$  unpaired Student t-test) (Fig. 3C; compare to Fig. 2B). However, DAergic neurones, which also respond to muscarine, displayed an equivalent response in both species ( $194 \pm 19$  nM above baseline for rats and  $220 \pm 45$  nM above baseline for mice;  $n = 45$  and  $12$ , respectively) ( $p > 0.05$  unpaired Student t-test) (Fig. 3D). More importantly, GABAergic neurones from WT and M5-KO mice showed similar  $[Ca^{2+}]_i$  increases in response to muscarine ( $64 \pm 15$  nM and  $46 \pm 11$  nM respectively) ( $n = 18$  and  $23$ ;  $p > 0.05$  unpaired Student t-test) (Fig. 3C). The response of DAergic neurones was also not significantly different in WT and M5-KO mice ( $220 \pm 45$  nM vs.  $171 \pm 58$  nM;  $n = 11$ ) (Fig. 3D). Oxybutynin (100 nM) almost completely inhibited the effect of muscarine on GABAergic neurones in both wildtype and M5-KO mice ( $1 \pm 1\%$  and  $9 \pm 2\%$  of control, for WT and M5-KO, respectively) (Fig. 3C). Together, these data argue strongly that a major proportion of the effect of muscarine on mesencephalic GABAergic neurones in this preparation is mediated by the M3 receptor.

#### **Implication of extracellular $Ca^{2+}$ influx.**

To characterize the origin of the increase in  $[Ca^{2+}]_i$  induced by muscarinic receptor activation, we first tested the implication of intracellular  $Ca^{2+}$  stores using thapsigargin (1  $\mu$ M for 30 min), which depletes intracellular  $Ca^{2+}$  stores by inhibiting the

sarcoplasmic/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase pump. Although this treatment caused a small increase in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  by itself (Fig. 4B), it did not reduce the ability of muscarine to increase  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ( $134 \pm 28\%$  of the first muscarine-induced response;  $n = 9$ ;  $p > 0.05$ ) (Fig. 4A, 4B). Compatible with the alternate hypothesis of a major role for  $\text{Ca}^{2+}$  influx, short applications of  $\text{Ca}^{2+}$ -free saline blocked the effect of muscarine on  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ( $8 \pm 6\%$  of control;  $n = 24$ ;  $p < 0.001$ ) (Fig. 4A, 4C). Finally, broad spectrum inorganic  $\text{Ca}^{2+}$ -channel blockers including gadolinium ( $50 \mu\text{M}$ ) and cobalt ( $1 \text{ mM}$ ) blocked muscarine-evoked  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  increase. The block was complete with gadolinium ( $-3 \pm 1.3\%$  of control;  $n = 9$ ;  $p < 0.01$ ), while only  $22 \pm 6\%$  of the control response remained in the presence of cobalt ( $n = 12$ ;  $p < 0.001$ ) (Fig. 4A). These results demonstrate that  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  elevation induced by muscarinic receptor activation in mesencephalic GABAergic neurones arises mostly from extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  influx.

#### **Implication of a PKC-dependent mechanism.**

Activation of M3 or M5 muscarinic receptors leads to the activation of phospholipase C and the production of second messengers such as IP3 and diacylglycerol (DAG). These messengers then lead to mobilization of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores and/or activation of protein kinase C (PKC). Although our previous results suggest that most of the muscarine-induced elevation in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  arises from  $\text{Ca}^{2+}$  influx, this does not exclude a role for PKC, especially considering that  $\text{Ca}^{2+}$  influx through some receptor-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels has previously been reported to be PKC-dependent (Premkumar & Ahern, 2000). To test this hypothesis, we determined whether direct activation of PKC using phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) ( $500 \text{ nM}$ ) mimics the effect of muscarine. Indeed, PMA induced a significant increase in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ( $370 \pm 70\%$  of control;  $n = 8$ ; (Fig. 5A, see also Fig. 7B). After reaching a peak, the response gradually declined. Moreover, PMA-induced elevation in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  completely occluded the effect of muscarine ( $13 \pm 5\%$  of control; ( $n = 7$ ;  $p < 0.01$ ) (Fig. 5A, 5B). For these experiments, the baseline level was considered to be the

average of the pre-muscarine and post-muscarine periods, thus accounting for the gradual decline of  $[Ca^{2+}]_i$  following the initial rise caused by PMA.

The implication of PKC in muscarine-evoked elevations of  $[Ca^{2+}]_i$  in GABAergic neurones was confirmed by showing that the PKC inhibitor bisindolylmaleimide (10  $\mu$ M) blocked the effect of muscarine ( $19 \pm 8\%$  of control;  $n = 7$ ;  $p < 0.05$ ) (Fig. 5B). Unexpectedly, although PMA also occluded the ability of muscarine to cause  $[Ca^{2+}]_i$  elevation in DAergic neurones ( $5 \pm 13\%$  of baseline;  $n = 5$   $p < 0.05$ ), muscarine's effect was PKC-independent in these neurones since bisindolylmaleimide was without any effect ( $98 \pm 13\%$  of control,  $n = 11$ ) (Fig. 5B).

#### **Lack of involvement of voltage-dependent calcium channels.**

Considering that broad-spectrum  $Ca^{2+}$  channel blockers such as gadolinium and cobalt can prevent muscarine-induced  $[Ca^{2+}]_i$  elevation in GABAergic neurones, a possibility is that muscarinic receptor activation enhances the function of voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channels (VDCCs), perhaps shifting their voltage-dependency to more negative potentials. Considering that L-type voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channels are abundant in the somatodendritic compartment of most neurones, we evaluated whether nifedipine (20  $\mu$ M) and verapamil (10  $\mu$ M), two potent antagonists of L-type  $Ca^{2+}$  channels, could interfere with the effect of muscarine. Both drugs were effective and mostly blocked the ability of muscarine to elevate  $[Ca^{2+}]_i$  ( $16 \pm 5\%$  of control for nifedipine;  $n = 9$ ;  $p < 0.001$ , and  $1 \pm 4\%$  of control for verapamil;  $n = 6$ ;  $p < 0.01$ ) (Fig. 6A, 6B).

To clarify the possible implication of VDCCs, we determined the effect of muscarine on pharmacologically isolated  $Ca^{2+}$  currents in single GABAergic neurones, recorded in the whole-cell configuration. Current-voltage relationships were constructed. Incompatible with the hypothesis of a facilitation of VDCCs, muscarine instead inhibited the amplitude of  $Ca^{2+}$  currents by  $37 \pm 3\%$  (evaluated at  $-10$  mV;  $n = 7$ ;  $p < 0.01$ ) (Fig. 6C, 6F). L-type channels carried a major component of the measured currents because

nifedipine (10  $\mu\text{M}$ ) inhibited the current by  $60 \pm 7\%$  ( $n = 6$ ,  $p < 0.05$ ) (Fig. 6D). Furthermore, the current inhibited by muscarine was mostly L-type because pre-application of nifedipine completely occluded any additional inhibition of the  $\text{Ca}^{2+}$  current by muscarine ( $100 \pm 1\%$  of control;  $n = 6$ ) (Fig. 6E, 6F). These results allow us to conclude that although muscarinic receptors can regulate L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels in mesencephalic GABAergic neurones, the modulation is in a direction opposite to that expected for a contribution to muscarine-induced  $\text{Ca}^{2+}$  elevation. Nifedipine and verapamil are therefore likely to mediate their effect by blocking other, non voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels.

#### **Implication of receptor-operated channels.**

In addition to blocking L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels, agents such as gadolinium and verapamil can also block receptor- and store-operated channels, such as those assembled by the recently identified members of the TRP channel family. Indeed, several recent studies have demonstrated that these channels are  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable, that they can be activated by G-protein-coupled receptors like muscarinic receptors, and that they can be blocked by inorganic cations such as gadolinium, by verapamil and by other agents such as SKF 96365 (Harteneck *et al.*, 2000; Merritt *et al.*, 1990; Zhu *et al.*, 1998). We found that SKF 96365 (25  $\mu\text{M}$ ) also blocked most of the muscarine-induced elevation of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ( $20 \pm 2\%$  of control;  $n = 18$ ,  $p < 0.001$ ) (Fig 7A). Otherwise,  $\text{Zn}^{2+}$  (10  $\mu\text{M}$ ), suggested to act as a blocker of some receptor- and store-operated channels (Prothero *et al.*, 2000; Kaneko *et al.*, 2002) was found to be ineffective ( $135 \pm 51\%$  of control;  $n = 14$ ) (Fig 7A). Together, these results suggest that receptor-operated channels are involved in the effect of muscarine on  $\text{Ca}^{2+}$  influx in mesencephalic GABAergic neurones, and that verapamil, the most effective antagonist identified in our experiments, probably acts by blocking TRP-like receptor-operated channels.

Considering our finding that PKC is required for the ability of muscarine to elevate  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , we finally tested whether verapamil could prevent the ability of the PKC activator PMA to mimic the effect of muscarine. In agreement with this hypothesis, PMA

produced no significant effect on  $[Ca^{2+}]_i$  in the presence of verapamil (10  $\mu$ M) (Fig. 7B). We conclude that the receptor-operated  $Ca^{2+}$  influx pathway activated by muscarinic receptors and by PKC are likely to be the same.

### **Expression of TRPC channels in mesencephalic neurones.**

It has been established that TRPC channels are broadly and abundantly expressed in the CNS (Riccio *et al.*, 2002). The substantia nigra reportedly contains mRNA for TRPC1, 5 and 6, with lower levels of TRPC3 and 4, and no TRPC7 (Riccio *et al.*, 2002). However, the precise cellular distribution of these transcripts is not yet well characterized. We used immunocytochemistry to evaluate the presence and distribution of TRPC1, 3, 4, 5 and 6 proteins in isolated mesencephalic neurones. No attempt was made to localize TRPC7 or TRPC2 because they are reportedly not present in rodent midbrain (Riccio *et al.*, 2002). Co-labelling was performed to localize glutamic acid decarboxylase (GAD), a phenotypic marker of GABAergic neurones. In isolated neurone cultures, GABAergic interneurones expressed TRPC1, 3, 5 and 6 (Fig. 8) but not TRPC4 (not shown). DAergic neurones, identified in standard cultures by their expression of tyrosine hydroxylase (TH) expressed the same pattern (not shown). Note that TRPC3 labelling was almost exclusively nuclear, TRPC1 was mostly localized on the cell body and major neuronal processes, while TRPC 5 and 6 were found both in nuclei and cell processes (Fig. 8). Glial cells also expressed TRPC3, 5 and 6 but not TRPC1. In astrocytes, the labelling was mostly nuclear, although golgi-like structures also appeared to be immunopositive. Although these data do not prove that muscarinic receptors regulate TRPC-containing channels, they provide data in support of this possibility.

## Discussion

Muscarinic receptors mediate excitation of mesencephalic GABAergic neurones through a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent mechanism. Here we have characterized the mechanism mediating the  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  elevation. We found that M3-like muscarinic receptors were the main receptors involved and that their activation leads to  $\text{Ca}^{2+}$  influx from the extracellular medium. Pharmacological and electrophysiological evidence further suggest that receptor-operated channels mediate this  $\text{Ca}^{2+}$  influx rather than VDCCs and that PKC activation is required.

### Implication of M3 receptors.

Only M3 and M5 receptor mRNA have been detected in the ventral tegmentum (Weiner *et al.*, 1990; Zubieta & Frey, 1993). These receptors are both coupled to  $G_{q/11}$  proteins that activate phospholipase C-dependent transduction pathways, leading to stimulation of PKC. Here we have provided pharmacological and genetic evidence that the M3 receptor is the primary receptor subtype mediating rapid muscarine-induced  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  elevation in GABAergic neurones. First, muscarine-induced  $\text{Ca}^{2+}$  influx was completely blocked by 4-DAMP and only partially affected by pirenzepine (100 nM). Considering that pirenzepine has a  $K_i$  of ~10 nM for M1 and ~150 nM for M3 (depending on the binding conditions) (Caulfield & Birdsall, 1998), and that 4-DAMP is recognized as one of the most selective M3 receptor antagonist available (Michel *et al.*, 1989) this argues for a major role of the M3 receptor, with little if any involvement of M1. Moreover, mesencephalic GABAergic neurones from M5-KO mice responded to muscarine in the same way as WT mice. These results, although not completely discounting a role for M5 receptors, provide confirmatory evidence for the implication of M3 receptors. The finding that oxybutynine (100 nM), a molecule that is a potent antagonist of the M3 receptor with a relatively low affinity for the M5 receptor, did leave  $23 \pm 9\%$  of the response in rats, also argues for a

minor participation of M5 receptors in this species. It should be noted that in M5-KO mice, oxybutynine completely inhibited muscarine-induced  $[Ca^{2+}]_i$  elevation.

Our results need to be considered within the context of several studies by Blaha and collaborators (Forster & Blaha, 2000; Forster & Blaha, 2003; Yeomans *et al.*, 2001) in which it was demonstrated that M5 receptors in the ventral mesencephalon are required for a prolonged activation of DA release *in vivo* induced by electrical stimulation of LDT or PPT cholinergic neurones. It should be noted that this release begins 3-5 min after stimulation and peaks after 20 to 30 min. This time course is much slower than the intracellular  $Ca^{2+}$  elevations induced by muscarine in our experiments. It is therefore likely that separate mechanisms are involved. Nonetheless,  $[Ca^{2+}]_i$  elevation and excitation mediated by muscarinic receptors in mesencephalic GABAergic neurones could regulate the delayed excitation of DAergic neurones independently mediated through M5 receptors.

#### **Involvement of a PKC-dependent calcium influx pathway.**

The elevation in  $[Ca^{2+}]_i$  induced by muscarine was strictly dependent on  $Ca^{2+}$  influx from the extracellular medium. This influx was however not secondary to cell firing since muscarine-induced intracellular  $Ca^{2+}$  elevation was not blocked by TTX. The effect of muscarine was actually slightly smaller in the absence of TTX suggesting that cell activity may negatively regulate the  $Ca^{2+}$  influx mechanism through some unknown mechanism.

Arguing against a significant role for intracellular  $Ca^{2+}$  stores, the  $Ca^{2+}$  ATPase blocker thapsigargin did not prevent the effect of muscarine. These results suggest that intracellular  $Ca^{2+}$  stores, store-operated channels and  $Ca^{2+}$ -induced  $Ca^{2+}$ -release mechanisms do not play a major role. Considering that M3 receptors activate PLC, leading to IP3 and DAG production, the lack of implication of intracellular  $Ca^{2+}$  stores may be somewhat surprising. Nonetheless, our finding that activation of PKC is necessary for the ability of muscarinic receptors to cause  $Ca^{2+}$  influx in GABAergic neurones is compatible with the known signalling pathways of the M3 receptor. Non-selective cationic

conductances have previously been reported to be activated through a PLC-dependent pathway, but the specific involvement of PKC was not determined (Kawanabe *et al.*, 2002). However, recent work has shown that  $\text{Ca}^{2+}$  influx through TRPV1, a member of the TRP-family receptor-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels, requires PKC activation (Premkumar & Ahern, 2000). It is interesting to note that muscarinic receptor-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  influx in DAergic neurones was PKC-independent. This suggests that although the same receptor may mediate similar responses in GABAergic and DAergic neurones, two different signalling pathways may be involved. However, the ability of PMA to occlude responses to muscarine in both cell types suggests that both possess PKC-dependent receptor-operated channels, but only in GABAergic neurones is PKC sufficiently activated by muscarinic receptors to mediate channel activation. Other PKC-independent receptor-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels are likely to be activated by muscarinic receptors in DAergic neurones. More experiments will be necessary to clarify the PKC-dependent and PKC-independent pathways in GABAergic and DAergic neurones.

Our pharmacological characterization of the  $\text{Ca}^{2+}$  influx pathway activated by muscarinic receptors in mesencephalic GABAergic neurones points toward the involvement of receptor-operated channels. In addition to removal of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ , the inorganic  $\text{Ca}^{2+}$  channel blockers  $\text{Co}^{2+}$  and  $\text{Gd}^{3+}$  blocked the effect of muscarine. These agents are known to block not only VDCCs, but also non-selective cationic channels (NSCCs) or store-operated channels. In addition, both nifedipine and verapamil were effective antagonists. Because the later two drugs are well known to block L-type VDCCs, a simple initial hypothesis was that muscarinic receptors could modulate L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels, perhaps shifting their voltage-dependence in a way that would allow them to be activated close to resting potential. Our direct recordings of  $\text{Ca}^{2+}$  currents in GABAergic neurones however allow us to exclude this later hypothesis. Not only were VDCCs not facilitated, but they were actually inhibited by over 30%. Taken together with our finding that the NSCC blocker SKF 96365 was effective at blocking the action of muscarine, we conclude that some currently unidentified receptor-operated channels must be regulated by muscarinic receptors in GABAergic neurones, leading to  $\text{Ca}^{2+}$  influx.

### **Possible involvement of TRPC channels.**

Inorganic blockers like  $Gd^{3+}$  are effective antagonists of NSCCs, but they are clearly not selective inasmuch as they also block VDCCs and a variety of other cationic channels. Much recent work suggests that a subset of NSCCs may be assembled from TRP-family proteins. The identification of TRP channels derived from studies on “transient receptor potential” *Drosophila M.* mutants (Hardie & Minke, 1992). Mammalian TRPC proteins, one of the three subfamilies of TRP, have been cloned recently (Wes *et al.*, 1995; Zhu *et al.*, 1996; Boulay *et al.*, 1997; Philipp *et al.*, 1996; Okada *et al.*, 1998; Philipp *et al.*, 1998) and belong to the superfamily of 6 transmembrane segments cation channels. They are closely related to voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels in many respects, one notable exception being their lack of voltage sensitivity (Harteneck *et al.*, 2000). Rather, these channels can be activated via  $G_{q/11}$  protein-coupled receptors through signal transduction pathways associated with PLC (Lintschinger *et al.*, 2000; Strubing *et al.*, 2001). In particular, a number of studies in heterologous expression systems have shown that muscarinic receptors such as the M3 and M5 can efficiently activate TRPC channels, leading to the idea that TRPCs are molecular entities responsible for the formation of receptor-operated channels (Boulay *et al.*, 1997; Strubing *et al.*, 2001; Vannier *et al.*, 1999; Zhu *et al.*, 1998)

$Gd^{3+}$  is effective at blocking TRPC channels formed by TRPC1, 3 and 6 (Inoue *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 1998; Boulay *et al.*, 1997). There are currently no clearly demonstrated selective blockers of TRPC channels. Nonetheless, a widely used antagonist is SKF 96365, which effectively blocks NSCCs such as TRPC channels (Merritt *et al.*, 1990; Zhu *et al.*, 1998). This drug was very effective at inhibiting the effect of muscarine on  $Ca^{2+}$  influx in GABAergic neurones. This finding provides evidence in favour of the hypothesis that TRPC channels are involved. Nifedipine and verapamil also effectively inhibited  $Ca^{2+}$  influx elicited by muscarine. These drugs are recognized as L-type VDCC blockers, but they could also target some NSCCs. Although no data is presently available for nifedipine, Zhu and colleagues (Zhu *et al.*, 1998) demonstrated that verapamil blocks

$\text{Ca}^{2+}$  influx through TRPC3 channels with an  $\text{IC}_{50}$  of 4  $\mu\text{M}$ . This finding lends further support to the potential implication of TRPC channels in the muscarine-induced  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  elevation we observed. We also evaluated  $\text{Zn}^{2+}$  as a potential blocker of NSCCs. Considering that this cation may be effective at blocking channels containing TRPC6 but not TRPC1 (Kaneko *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2000), one may speculate that muscarinic receptors are coupled to receptor-operated channels containing TRPC1 subunits. Our finding that TRPC1 is indeed present in mesencephalic GABAergic neurones makes this hypothesis reasonable. However, because other TRPCs including 3, 5 and 6 are also present, strategies involving selective downregulation of individual TRPCs will be required to determine which is necessary and sufficient to mediate the effects of muscarinic receptor agonists. The potential implication of TRPV (vanilloid) channels should also be investigated considering their sensitivity to PKC (Premkumar & Ahern, 2000).

Flufenamate is another known blocker of  $\text{Ca}^{2+}$ -activated NSCCs (Partridge & Valenzuela, 2000). We evaluated the ability of this agent to block  $\text{Ca}^{2+}$  influx induced by muscarine, but we found this drug unsuitable for  $\text{Ca}^{2+}$  imaging experiments since by itself, it induced significant  $\text{Ca}^{2+}$  influx. This effect prevented a determination of its ability to interfere with the effect on muscarine (results not shown). Interestingly, Inoue and colleagues reported that flufenamate activates TRPC6 (Inoue *et al.*, 2001). This could explain why this drug initiates  $\text{Ca}^{2+}$  influx in our preparation.

In conclusion, our findings clarify how ACh acts on GABAergic neurones of the ventral mesencephalon. In particular, we provide a mechanism explaining the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependency of the excitatory effect of muscarinic agonists on mesencephalic GABAergic neurones. We conclude that muscarine induces  $\text{Ca}^{2+}$  influx through receptor-operated channels. PKC-dependent activation of TRP-family channels, selectively in GABAergic neurones, provides a likely molecular mechanism explaining our observations. Finally, our findings provide a first step toward an evaluation of the physiological role of muscarinic regulation of mesencephalic GABAergic neurones.

## **Acknowledgments**

This work was supported in part by grants from the Canadian Institutes of Health Research and the EJLB foundation. François Michel was supported by a studentship from the Groupe de recherche sur le système nerveux central of the Université de Montréal. Louis-Eric Trudeau is a scholar of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. We thank Marie-Josée Bourque for her implication in the preparation and maintenance of the neuronal cultures, Dr. W. Schilling who provided us with anti-TRPC5 antibodies, Dr. Haoran Wang for genotyping the M5 knockout mice and Dr. J. Takeuchi for construction of the mice.

# Figures

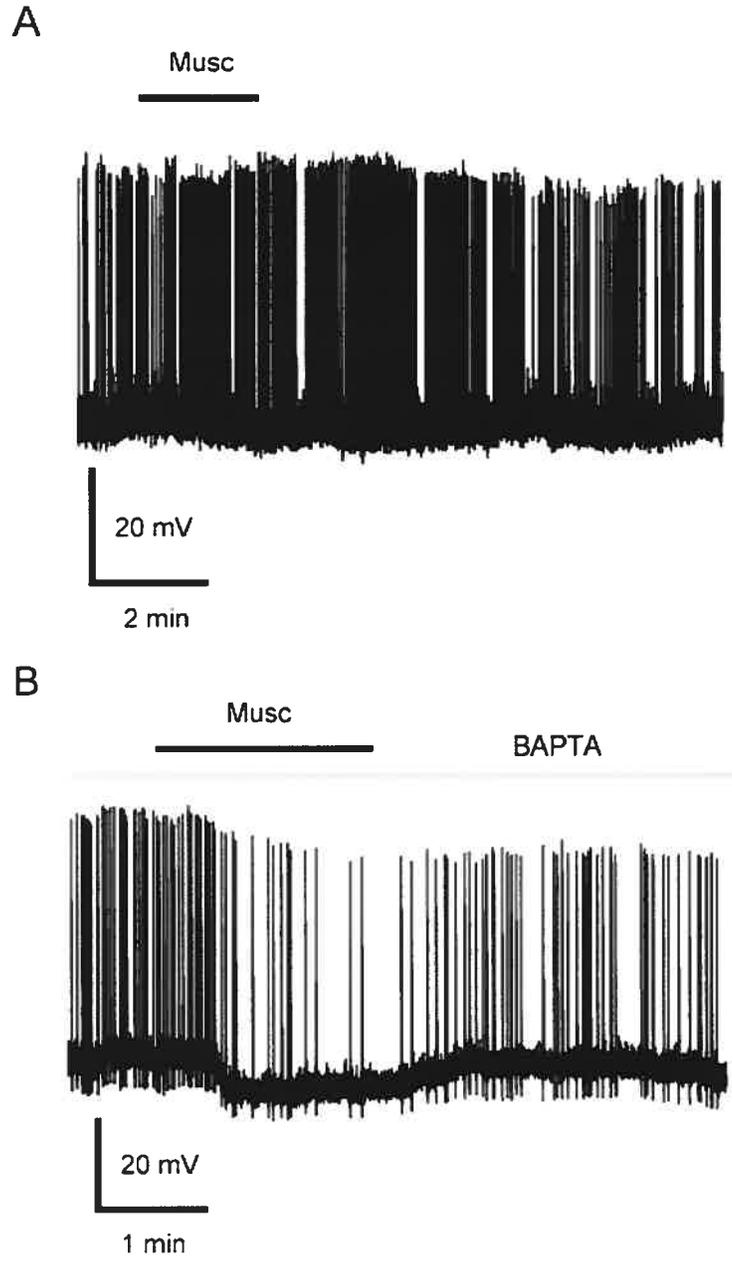


Fig 1

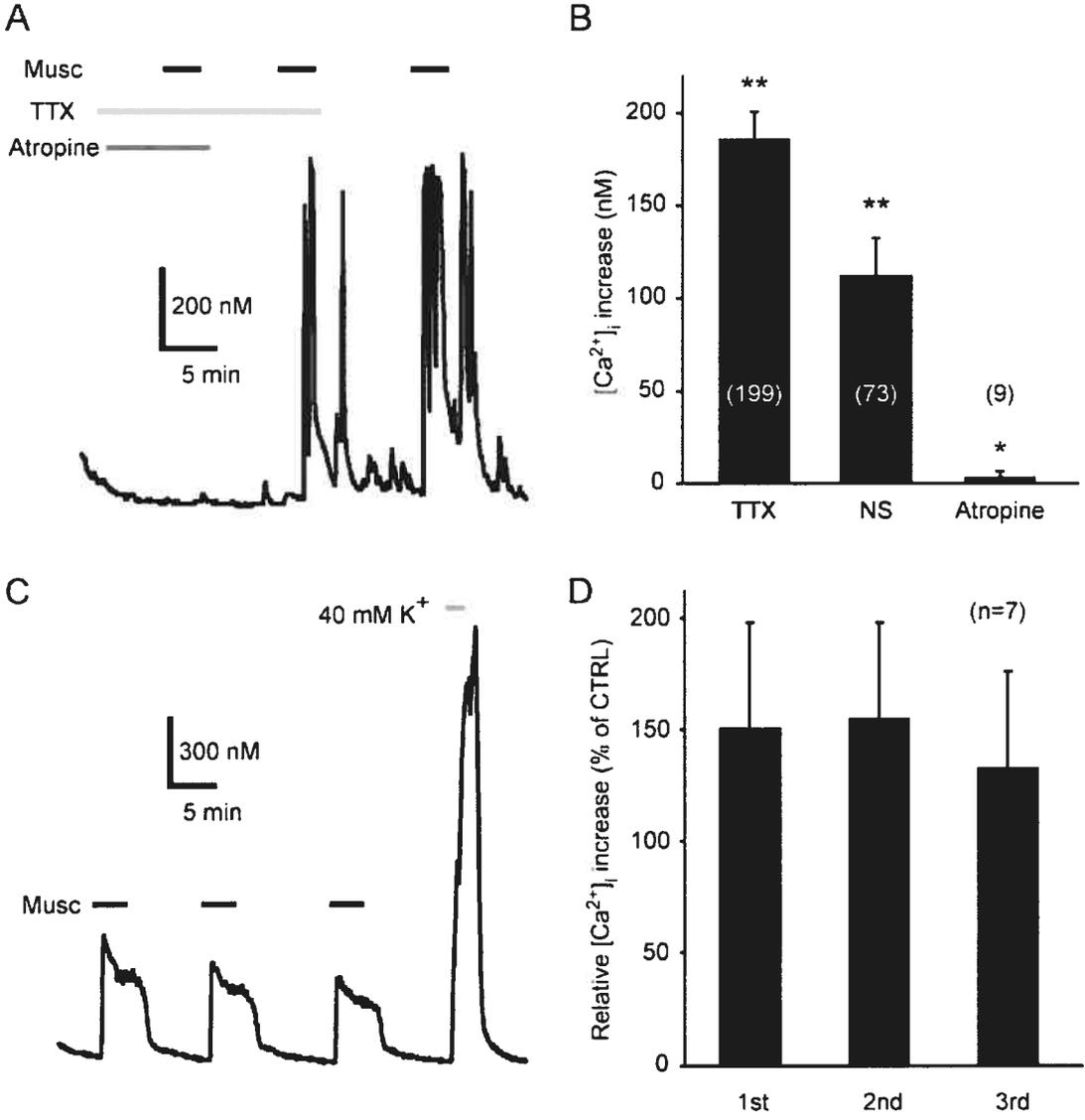


Fig 2

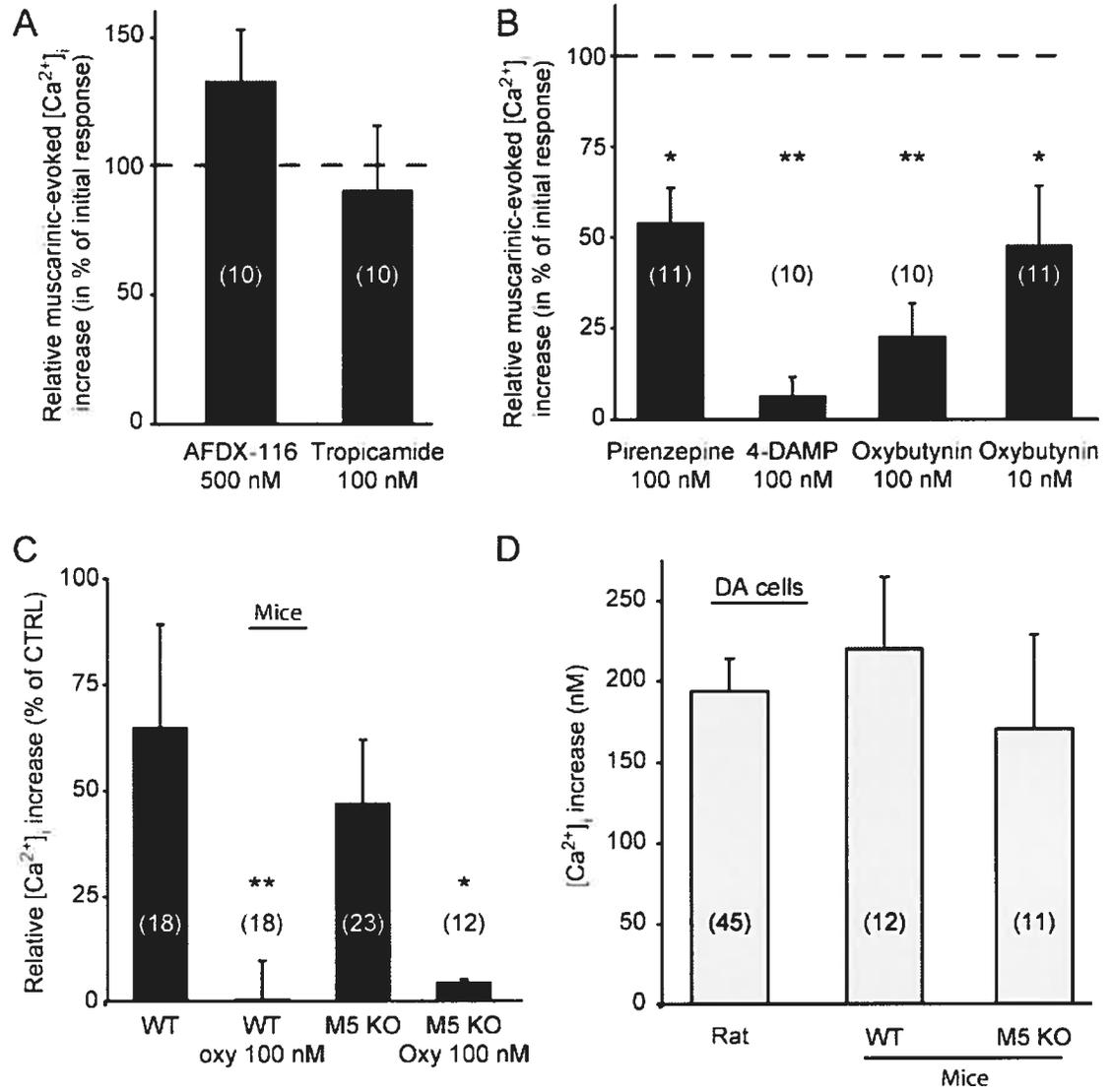


Fig 3

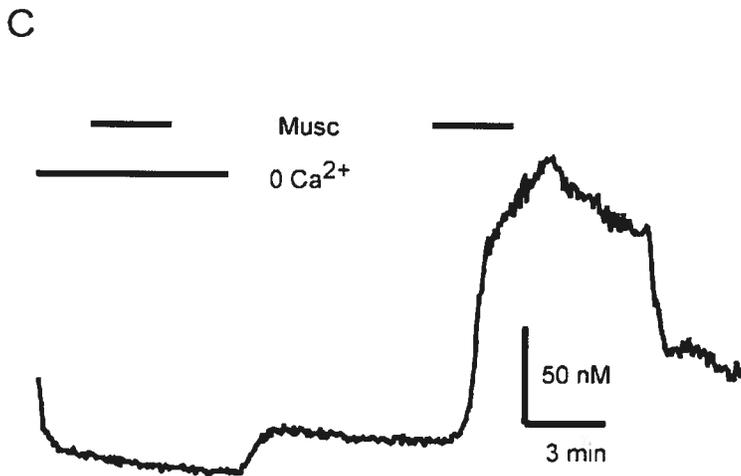
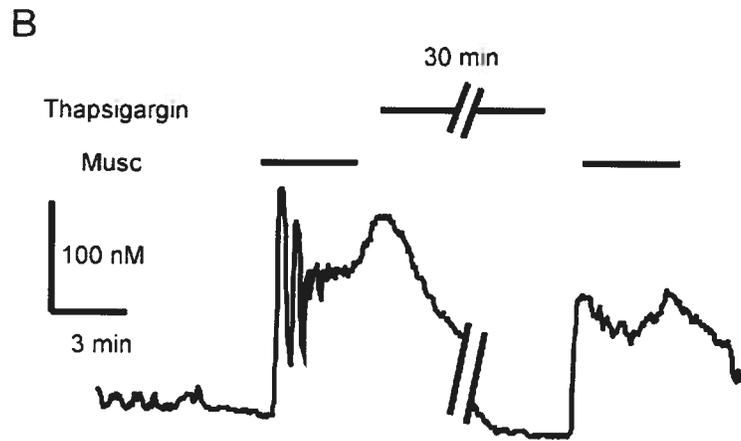
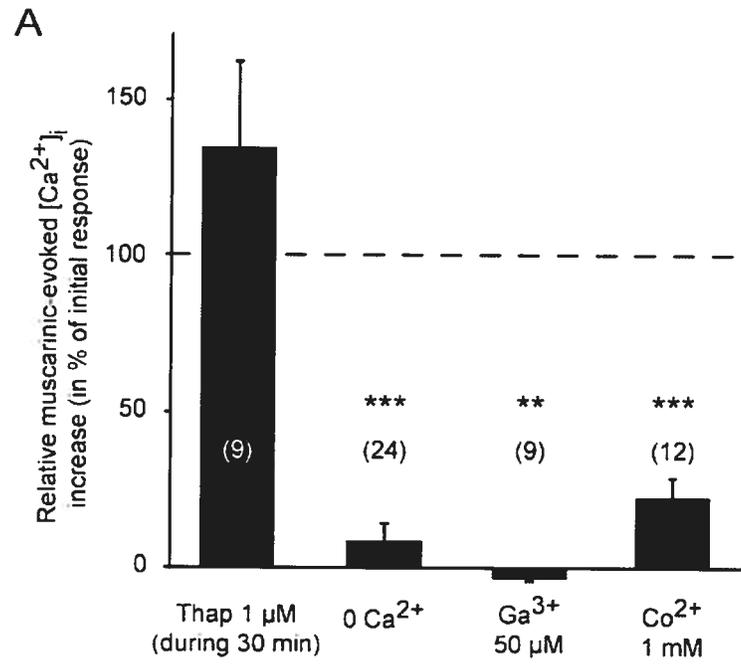


Fig 4

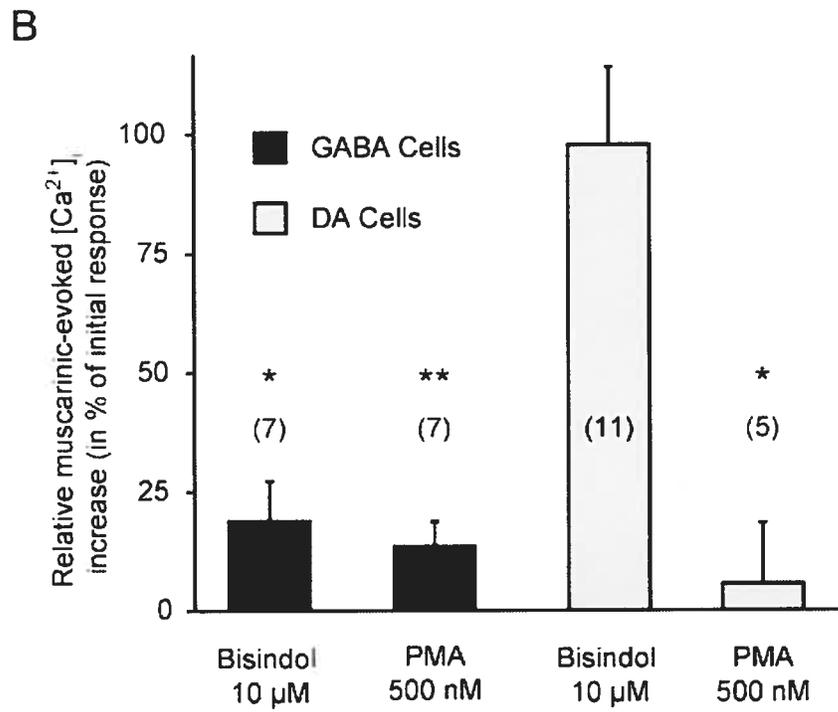
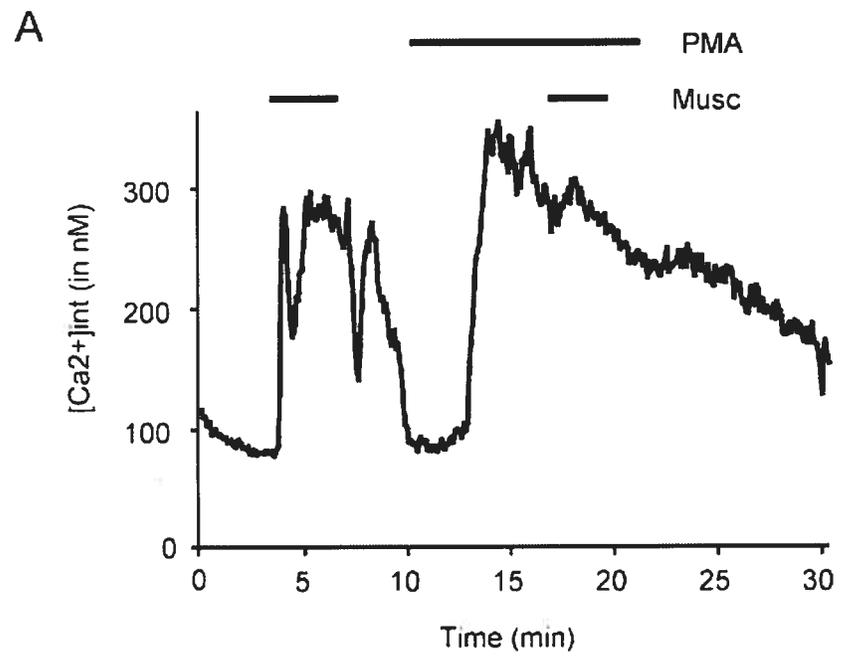


Fig 5

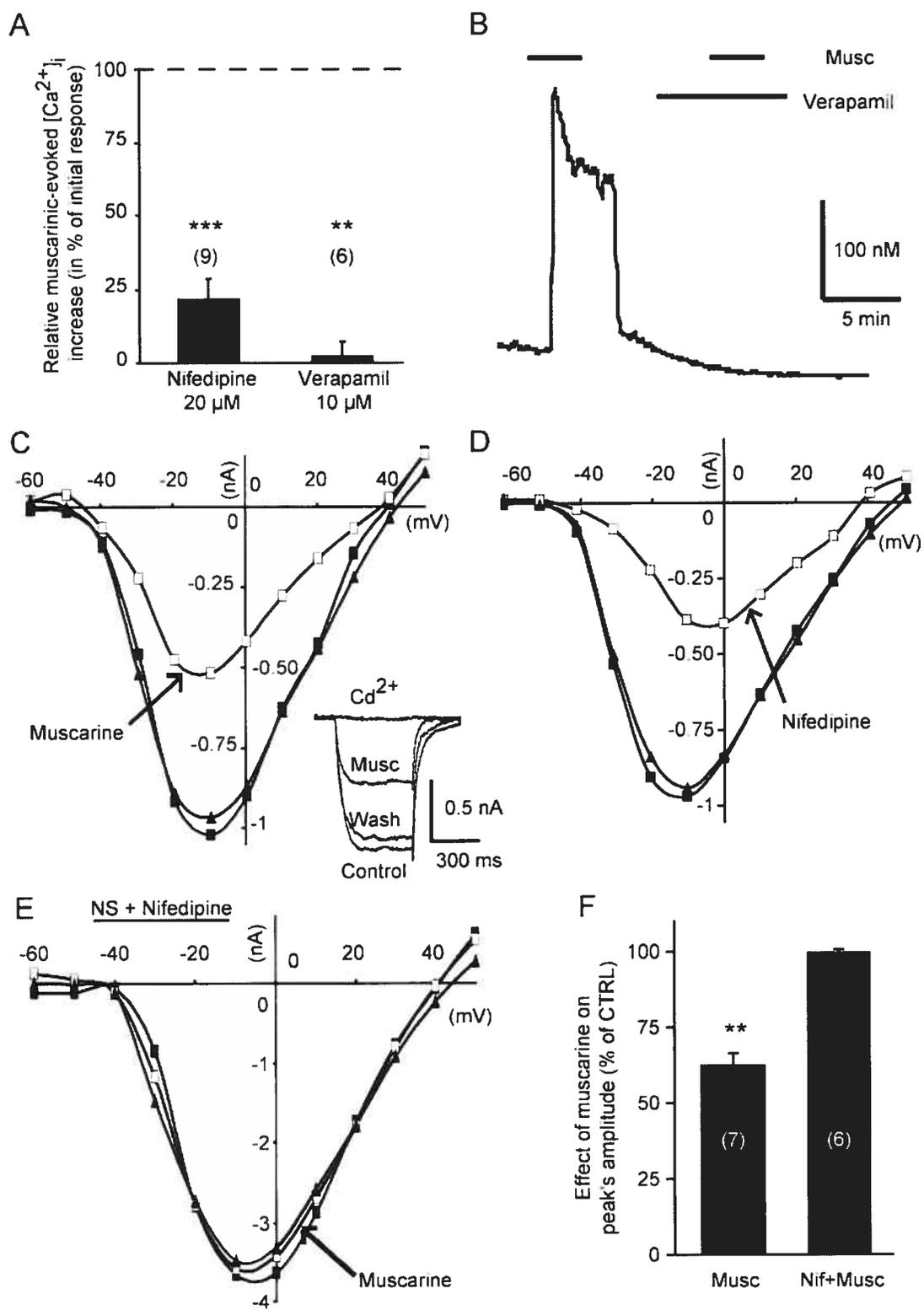


Fig 6

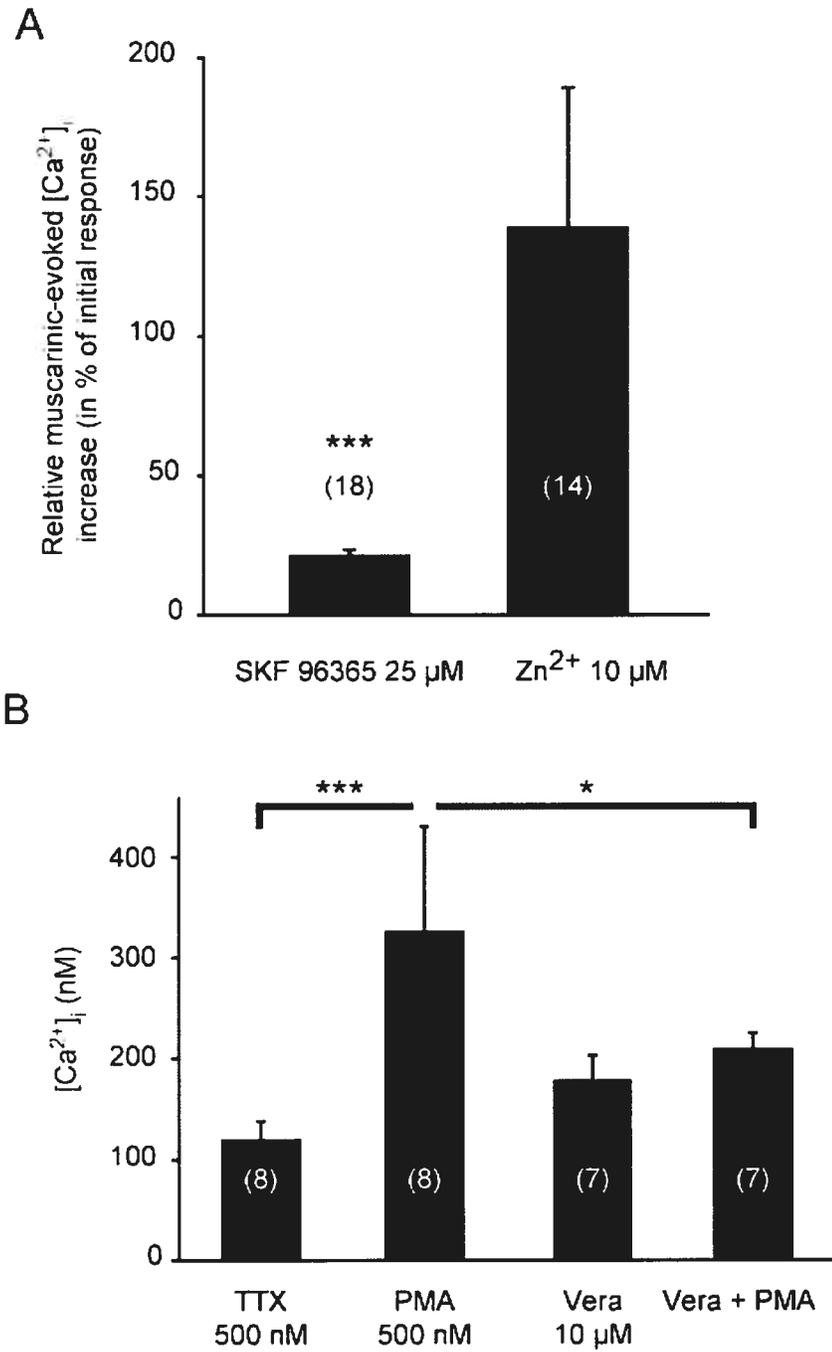
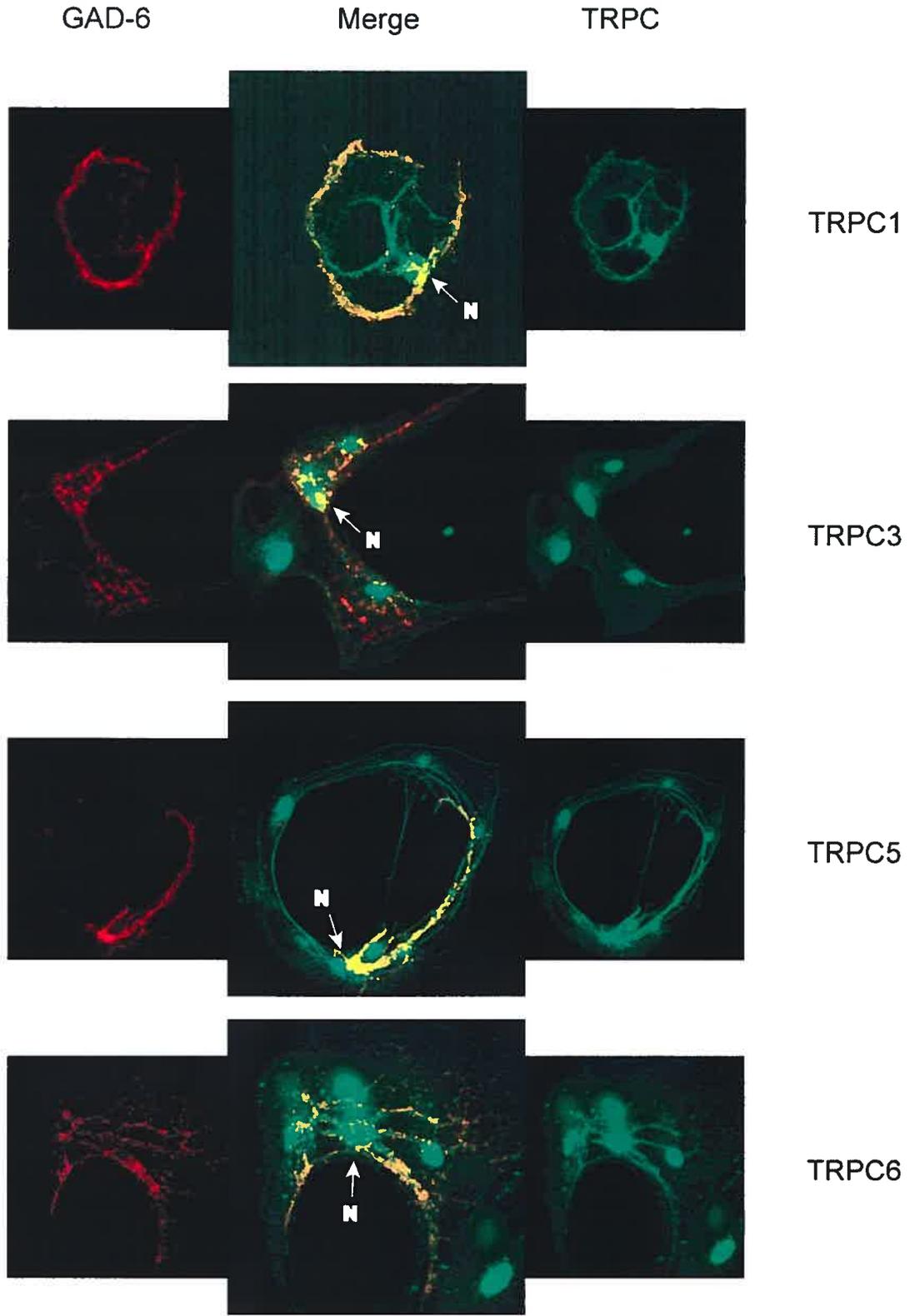


Fig 7



Micro dot culture  
single GABAergic neurons

Fig 8

## Legends

### **Figure 1: Calcium-dependent excitatory effect of muscarinic receptor stimulation on GABAergic neurons.**

A) Example of a whole-cell recording from an isolated GABAergic neuron. Muscarine (10  $\mu\text{M}$ ) increased action potential firing rate. B) Recording from a different neuron under conditions where the  $\text{Ca}^{2+}$  chelator BAPTA (10 mM) was included in the intrapipette medium. This totally inhibited the excitatory effect of muscarine, revealing a cryptic and independent inhibitory effect.

### **Figure 2: Muscarine (10 $\mu\text{M}$ ) induces a reproducible increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .**

A) Example of relative levels of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in a representative neuron. Muscarine (10  $\mu\text{M}$ ) increased  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in this GABAergic neuron, an effect that was reversibly blocked by atropine (1  $\mu\text{M}$ ). Note that TTX (0.5  $\mu\text{M}$ ) did not prevent the effect of muscarine. B) Bar graph summarizing the effects of muscarine on all responsive GABAergic neurons in the presence of TTX, in normal saline (NS) or in the presence of atropine. C) Representative experiment showing the effect of three successive applications of muscarine separated by 10 min intervals. 40 mM  $\text{K}^+$  saline was applied at the end of all experiments to demonstrate that the neuron was still metabolically active and able to buffer large loads of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . D) Bar graph summarizing the average  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  increase ( $n = 7$ ) for three successive applications of muscarine.

**Figure 3: Implication of M3 muscarinic receptors.**

A) Bar graph showing the lack of effect of AFDX-116 and tropicamide, two antagonists that block M2 and M4 muscarinic receptors, respectively. The neurons were tested twice with muscarine, with or without the antagonist. The data is presented in percent of the amplitude of a first application of muscarine. B) Bar graph summarizing the effects of antagonists that inhibit M1 (pirenzepine), M3 (4-DAMP) and M1-4 (oxybutynin) muscarinic receptors. The data is presented in percent of the amplitude of the response to a first application of muscarine. C) Bar graph illustrating the effect of muscarine on  $[Ca^{2+}]_i$  in GABAergic neurons cultured from M5 knockout mice. The data is expressed in nM to illustrate estimated absolute levels in relation to the control period. D) Bar graph summarizing the effect of muscarine on DAergic neurons from rat and mice (WT and M5-KO) cultures. The data is expressed in nM to illustrate estimated absolute levels in relation to the control period.

**Figure 4: Muscarinic receptor activation induces  $Ca^{2+}$  influx from the extracellular medium.**

A) Bar graph summarizing the effect of thapsigargin (*Thap*), extracellular  $Ca^{2+}$  removal (*O Ca<sup>2+</sup>*) and inorganic  $Ca^{2+}$  channel blockers on muscarine-induced elevation in  $[Ca^{2+}]_i$ . The data are expressed in percent of the amplitude of the first response to muscarine. B) Example of variations in  $[Ca^{2+}]_i$  in a representative neuron in the presence of thapsigargin (applied for 30 min after the first application of muscarine). C) Example of variations in  $[Ca^{2+}]_i$  in a representative neuron, illustrating the effect of  $Ca^{2+}$ -free saline on muscarine-induced elevation in  $[Ca^{2+}]_i$ .

**Figure 5: Role of PKC in muscarine-induced Ca<sup>2+</sup> influx in GABAergic neurons.**

A) Example of variations in  $[Ca^{2+}]_i$  in a representative GABAergic neuron illustrating the effect of PMA. This PKC activator increased  $[Ca^{2+}]_i$  and occluded any further effect of muscarine. B) Bar graph illustrating the effect of the PKC inhibitor Bisindolylmaleimide (*Bisindol*) and of PMA on muscarine-induced elevation of  $[Ca^{2+}]_i$  in mesencephalic neurons. Note that GABAergic and DAergic neurons were differentially sensitive to the PKC inhibitor. The data are presented as percent of the amplitude to the first response to muscarine.

**Figure 6: Muscarine-induced Ca<sup>2+</sup> influx does not involve facilitation of L-type voltage-dependant Ca<sup>2+</sup> channels.**

A) Bar graph summarizing the effects of the L-type VDCC blockers nifedipine and verapamil on muscarine-evoked elevations in  $[Ca^{2+}]_i$ . The data are presented as percent of the amplitude of the response evoked by a first application of muscarine. B) Variations in  $[Ca^{2+}]_i$  in a representative neuron illustrating the effect of verapamil (10  $\mu$ M) on muscarine-evoked elevation in  $[Ca^{2+}]_i$ . C) Current-voltage (I/V) relationship illustrating the effect of muscarine (10  $\mu$ M) on pharmacologically isolated Ca<sup>2+</sup> currents in a representative GABAergic neuron. The black squares (■) represent the control condition, open squares (□) the current in presence of muscarine and black triangles (▲) the current after washout of the drug. Inset: Example of a set of traces from the same cell in response to a voltage step to -10 mV. The broad-spectrum Ca<sup>2+</sup> channel blocker Cd<sup>2+</sup> was added at the end of each experiment to confirm the selective isolation of Ca<sup>2+</sup> currents. D) I/V curve illustrating the effect of nifedipine (10  $\mu$ M) on Ca<sup>2+</sup> currents. E) I/V curve illustrating the lack of effect of muscarine after pre-application of nifedipine. F) Bar graph summarizing the inhibitory effect of muscarine on peak Ca<sup>2+</sup> current amplitude in response to a voltage step to -10 mV, with or without pre-application of nifedipine (*Nif*). The data are presented in percent of control amplitude.

**Figure 7: Evidence for the implication of PKC-sensitive receptor-operated channels.**

A) Bar graph illustrating the inhibitory effect of SKF 96365 (25  $\mu\text{M}$ ) and the lack of effect of  $\text{Zn}^{2+}$  (10  $\mu\text{M}$ ) on muscarine-induced  $\text{Ca}^{2+}$  influx. The data is expressed in percent of the response to a first application of muscarine. B) Bar graph summarizing the effect of PMA (500 nM) on  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Verapamil (*Vera*) prevented the effect of PMA. Resting level of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in the presence of 500 nM TTX alone is also shown for reference. The data are expressed in estimated absolute concentrations of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . \*\*\*  $p < 0.001$ , \*  $p < 0.05$ , two way ANOVA.

**Figure 8: Expression of TRPC channels in mesencephalic GABAergic neurons.**

Fluorescence micrographs illustrating the expression of TRPC1, 3, 5 and 6 (in green) in GABAergic neurones co-labelled for glutamic acid decarboxylase (GAD) (in red). The central panel of each series provides a merged image showing signal co-localization (in yellow). Note that GAD labelling was restricted to nerve terminals and did not delineate cell bodies. Experiments were performed in single-neurones micro-dot cultures, assuring that all signal of neuronal origin originated from GABAergic neurones only (labelled with an *N*). Note that TRPC1 labelling was restricted to neuronal processes, TRPC3 was mostly nuclear, and TRPC5-6 labelled both neuronal processes and nuclear compartments.

## References

- Baba H, Kohno T, Okamoto M, Goldstein P A, Shimoji K & Yoshimura M (1998). Muscarinic facilitation of GABA release in substantia gelatinosa of the rat spinal dorsal horn. *J Physiol (Lond)* **508** ( Pt 1), 83-93.
- Bayer V E & Pickel V M (1991). GABA-labeled terminals form proportionally more synapses with dopaminergic neurons containing low densities of tyrosine hydroxylase- immunoreactivity in rat ventral tegmental area. *Brain Res* **559**, 44-55.
- Bekkers J M & Stevens C F (1991). Excitatory and inhibitory autaptic currents in isolated hippocampal neurons maintained in cell culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 7834-7838.
- Bergevin A, Girardot D, Bourque M J & Trudeau L E (2002). Presynaptic mu-opioid receptors regulate a late step of the secretory process in rat ventral tegmental area GABAergic neurons. *Neuropharmacology* **42**, 1065-1078.
- Boulay G, Zhu X, Peyton M, Jiang M, Hurst R, Stefani E & Birnbaumer L (1997). Cloning and expression of a novel mammalian homolog of Drosophila transient receptor potential (Trp) involved in calcium entry secondary to activation of receptors coupled by the Gq class of G protein. *J Biol Chem* **272**, 29672-29680.
- Cardozo D L (1993). Midbrain dopaminergic neurons from postnatal rat in long-term primary culture. *Neuroscience* **56**, 409-421.
- Caulfield M P & Birdsall N J (1998). International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev* **50**, 279-90.
- Clarke P B, Hommer D W, Pert A & Skirboll L R (1987). Innervation of substantia nigra neurons by cholinergic afferents from pedunculo-pontine nucleus in the rat: neuroanatomical and electrophysiological evidence. *Neuroscience* **23**, 1011-1019.

- Congar P, Bergevin A & Trudeau L E (2002). D2 receptors inhibit the secretory process downstream from calcium influx in dopaminergic neurons: implication of K<sup>+</sup> channels. *J Neurophysiol* **87**, 1046-1056.
- Eglen R M, Choppin A, Dillon M P & Hegde S (1999). Muscarinic receptor ligands and their therapeutic potential. *Curr Opin Chem Biol* **3**, 426-32.
- Felder C C, Poulter M O & Wess J (1992). Muscarinic receptor-operated Ca<sup>2+</sup> influx in transfected fibroblast cells is independent of inositol phosphates and release of intracellular Ca<sup>2+</sup>. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 509-13.
- Forster G L & Blaha C D (2000). Laterodorsal tegmental stimulation elicits dopamine efflux in the rat nucleus accumbens by activation of acetylcholine and glutamate receptors in the ventral tegmental area. *Eur J Neurosci* **12**, 3596-3604.
- Forster G L & Blaha C D (2003). Pedunculopontine tegmental stimulation evokes striatal dopamine efflux by activation of acetylcholine and glutamate receptors in the midbrain and pons of the rat. *Eur J Neurosci* **17**, 751-62.
- Forster G L, Yeomans J S, Takeuchi J & Blaha C D (2002). M5 muscarinic receptors are required for prolonged accumbal dopamine release after electrical stimulation of the pons in mice. *J Neurosci* **22**, RC190
- Garzon M, Vaughan R A, Uhl G R, Kuhar M J & Pickel V M (1999). Cholinergic axon terminals in the ventral tegmental area target a subpopulation of neurons expressing low levels of the dopamine transporter. *J Comp Neurol* **410**, 197-210.
- Goel M, Sinkins W G & Schilling W P (2002). Selective association of TRPC channel subunits in rat brain synaptosomes. *J Biol Chem* **277**, 48303-10.
- Grillner P, Berretta N, Bernardi G, Svensson T H & Mercuri N B (2000). Muscarinic receptors depress GABAergic synaptic transmission in rat midbrain dopamine neurons. *Neuroscience* **96**, 299-307.
- Gronier B, Perry K W & Rasmussen K (2000). Activation of the mesocorticolimbic dopaminergic system by stimulation of muscarinic cholinergic receptors in the ventral tegmental area. *Psychopharmacology (Berl)* **147**, 347-355.
- Grynkiewicz G, Poenie M & Tsien R Y (1985). A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* **260**, 3440-50.

- Guo J & Chiappinelli V A (2001). Distinct muscarinic receptors enhance spontaneous GABA release and inhibit electrically evoked GABAergic synaptic transmission in the chick lateral spiriform nucleus. *Neuroscience* **104**, 1057-66.
- Hardie R C & Minke B (1992). The trp gene is essential for a light-activated Ca<sup>2+</sup> channel in Drosophila photoreceptors. *Neuron* **8**, 643-51.
- Harteneck C, Plant T D & Schultz G (2000). From worm to man: three subfamilies of TRP channels. *Trends Neurosci* **23**, 159-66.
- Imperato A, Mulas A & Di Chiara G (1986). Nicotine preferentially stimulates dopamine release in the limbic system of freely moving rats. *Eur J Pharmacol* **132**, 337-8.
- Inoue R, Okada T, Onoue H, Hara Y, Shimizu S, Naitoh S, Ito Y & Mori Y (2001). The transient receptor potential protein homologue TRP6 is the essential component of vascular alpha(1)-adrenoceptor-activated Ca(2+)- permeable cation channel. *Circ Res* **88**, 325-32.
- Johnson S W & North R A (1992a). Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *J Neurosci* **12**, 483-488.
- Johnson S W & North R A (1992b). Two types of neurone in the rat ventral tegmental area and their synaptic inputs. *J Physiol (Lond)* **450**, 455-468.
- Kalivas P W & Stewart J (1991). Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity. *Brain Res Brain Res Rev* **16**, 223-44.
- Kaneko, S., Higuchi, S., Kawakami, S., Kume, T., Akaike, A., Satoh, M. & Mori, Y. (2002). Expression and function of TRP channels in cultured cerebral cortical neurons from fetal rat. *Soc. Neurosci. Abstr.* Abstract 341.9
- Kawanabe Y, Okamoto Y, Miwa S, Hashimoto N & Masaki T (2002). Molecular mechanisms for the activation of voltage-independent Ca<sup>2+</sup> channels by endothelin-1 in chinese hamster ovary cells stably expressing human endothelin(A) receptors. *Mol Pharmacol* **62**, 75-80.
- Lacey M G, Calabresi P & North R A (1990). Muscarine depolarizes rat substantia nigra zona compacta and ventral tegmental neurons in vitro through M1-like receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **253**, 395-400.

- Lintschinger B, Balzer-Geldsetzer M, Baskaran T, Graier W F, Romanin C, Zhu M X & Groschner K (2000). Coassembly of Trp1 and Trp3 proteins generates diacylglycerol- and Ca<sup>2+</sup>- sensitive cation channels. *J Biol Chem* **275**, 27799-805.
- Liu X, Wang W, Singh B B, Lockwich T, Jadlowiec J, O'Connell B, Wellner R, Zhu M X & Ambudkar I S (2000). Trp1, a candidate protein for the store-operated Ca(2+) influx mechanism in salivary gland cells. *J Biol Chem* **275**, 3403-11.
- Merritt J E, Armstrong W P, Benham C D, Hallam T J, Jacob R, Jaxa-Chamiec A, Leigh B K, McCarthy S A, Moores K E & Rink T J (1990). SK&F 96365, a novel inhibitor of receptor-mediated calcium entry. *Biochem J* **271**, 515-22.
- Michel A D, Stefanich E & Whiting R L (1989). Direct labeling of rat M3-muscarinic receptors by [3H]4DAMP. *Eur J Pharmacol* **166**, 459-66.
- Michel F J & Trudeau L E (2000). Clozapine inhibits synaptic transmission at GABAergic synapses established by ventral tegmental area neurones in culture. *Neuropharmacology* **39**, 1536-1543.
- Michel, F.J. & Trudeau, L.-E. (2001). Muscarinic regulation of VTA GABAergic neurons. *Soc. Neurosci. Abstr.* **27**, 912.5
- Oakman S A, Faris P L, Kerr P E, Cozzari C & Hartman B K (1995). Distribution of pontomesencephalic cholinergic neurons projecting to substantia nigra differs significantly from those projecting to ventral tegmental area. *J Neurosci* **15**, 5859-69.
- Okada T, Shimizu S, Wakamori M, Maeda A, Kurosaki T, Takada N, Imoto K & Mori Y (1998). Molecular cloning and functional characterization of a novel receptor-activated TRP Ca<sup>2+</sup> channel from mouse brain. *J Biol Chem* **273**, 10279-87.
- Partridge L D & Valenzuela C F (2000). Block of hippocampal CAN channels by flufenamate. *Brain Res* **867**, 143-8.
- Philipp S, Cavalie A, Freichel M, Wissenbach U, Zimmer S, Trost C, Marquart A, Murakami M & Flockerzi V (1996). A mammalian capacitative calcium entry channel homologous to Drosophila TRP and TRPL. *EMBO J* **15**, 6166-71.

- Philipp S, Hambrecht J, Braslavski L, Schroth G, Freichel M, Murakami M, Cavalie A & Flockerzi V (1998). A novel capacitative calcium entry channel expressed in excitable cells. *EMBO J* **17**, 4274-82.
- Premkumar L S & Ahern G P (2000). Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. *Nature* **408**, 985-90.
- Prothero L S, Mathie A & Richards C D (2000). Purinergic and muscarinic receptor activation activates a common calcium entry pathway in rat neocortical neurons and glial cells. *Neuropharmacology* **39**, 1768-78.
- Riccio A, Medhurst A D, Mattei C, Kelsell R E, Calver A R, Randall A D, Benham C D & Pangalos M N (2002). mRNA distribution analysis of human TRPC family in CNS and peripheral tissues. *Brain Res Mol Brain Res* **109**, 95-104.
- Strubing C, Krapivinsky G, Krapivinsky L & Clapham D E (2001). TRPC1 and TRPC5 form a novel cation channel in mammalian brain. *Neuron* **29**, 645-55.
- Sulzer D, Joyce M P, Lin L, Geldwert D, Haber S N, Hattori T & Rayport S (1998). Dopamine neurons make glutamatergic synapses in vitro. *J Neurosci* **18**, 4588-4602.
- Takeuchi J, Fulton J, Jia Z, Abramov-Newerly W, Jamot L, Sud M, Coward D, Ralph M, Roder J & Yeomans J (2002). Increased drinking in mutant mice with truncated M5 muscarinic receptor genes. *Pharmacol Biochem Behav* **72**, 117-23.
- van Koppen C J & Kaiser B (2003). Regulation of muscarinic acetylcholine receptor signaling. *Pharmacol Ther* **98**, 197-220.
- Vannier B, Peyton M, Boulay G, Brown D, Qin N, Jiang M, Zhu X & Birnbaumer L (1999). Mouse *trp2*, the homologue of the human *trpc2* pseudogene, encodes mTrp2, a store depletion-activated capacitative Ca<sup>2+</sup> entry channel. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 2060-4.
- Vilaro M T, Palacios J M & Mengod G (1990). Localization of m5 muscarinic receptor mRNA in rat brain examined by in situ hybridization histochemistry. *Neurosci Lett* **114**, 154-159.

- Wang, H., Gao, X., Han, J H., & Yeomans, J S. (2002). Expression of M5 muscarinic and D2 dopamine receptor genes in brain and peripheral tissues. *Soc. Neurosci. Abstr.* , **28**, 205.16.
- Watson N, Daniels D V, Ford A P, Eglén R M & Hegde S S (1999). Comparative pharmacology of recombinant human M3 and M5 muscarinic receptors expressed in CHO-K1 cells. *Br J Pharmacol* **127**, 590-6.
- Weiner D M, Levey A I & Brann M R (1990). Expression of muscarinic acetylcholine and dopamine receptor mRNAs in rat basal ganglia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 7050-7054.
- Wes P D, Chevesich J, Jeromin A, Rosenberg C, Stetten G & Montell C (1995). TRPC1, a human homolog of a Drosophila store-operated channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 9652-6.
- Yeomans J, Forster G & Blaha C (2001). M5 muscarinic receptors are needed for slow activation of dopamine neurons and for rewarding brain stimulation. *Life Sci* **68**, 2449-56.
- Zhu X, Jiang M & Birnbaumer L (1998). Receptor-activated Ca<sup>2+</sup> influx via human Trp3 stably expressed in human embryonic kidney (HEK)293 cells. Evidence for a non-capacitative Ca<sup>2+</sup> entry. *J Biol Chem* **273**, 133-142.
- Zhu X, Jiang M, Peyton M, Boulay G, Hurst R, Stefani E & Birnbaumer L (1996). trp, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca<sup>2+</sup> entry. *Cell* **85**, 661-71.
- Zitt C, Halaszovich C R & Luckhoff A (2002). The TRP family of cation channels: probing and advancing the concepts on receptor-activated calcium entry. *Prog Neurobiol* **66**, 243-264.
- Zubieta J K & Frey K A (1993). Autoradiographic mapping of M3 muscarinic receptors in the rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* **264**, 415-22.

### **Article 3 : Clozapine inhibits synaptic transmission at GABAergic synapses established by ventral tegmental area neurones in culture**

Lors de cette étude, nous avons exploré le versant postsynaptique de la relation entre les neurones GABAergiques et DAergiques de l'ATV. Les antipsychotiques atypiques ont une efficacité reconnue contre une maladie que l'on ne comprend pas vraiment. Leurs modes d'action restent énigmatiques. Toute information qui donne un éclaircissement sur les cibles potentielles ou effectives de ces molécules est pertinente. En l'occurrence, nous avons démontré que la clozapine a un effet inhibiteur sur les courants synaptiques GABAergiques. Pour ce faire, nous avons montré que les courants autaptiques GABAergiques sont inhibés de 12 % dès la présence d'une concentration de 1  $\mu\text{M}$  de clozapine dans le milieu extracellulaire, avec une  $\text{IC}_{50}$  de 8  $\mu\text{M}$ . L'effet maximal est atteint à 50  $\mu\text{M}$  pour une inhibition de 49 %. Cette inhibition est retrouvée lorsqu'on active les récepteurs  $\text{GABA}_A$  par l'éjection de GABA exogène directement sur le soma des neurones. Ceci implique que c'est une modulation des récepteurs  $\text{GABA}_A$  post-synaptiques qui sous-tend cette inhibition. Afin de confirmer que les récepteurs synaptiques aussi bien qu'extra-synaptiques sont affectés de la même façon, nous avons testé l'effet de la clozapine sur les courants inhibiteurs miniatures. La fréquence de ces courants reflète l'activité pré-synaptique alors que leur amplitude est plutôt dépendante des récepteurs post-synaptiques. Dans notre étude, l'amplitude des courants miniature s'est avérée significativement diminuée, ce qui confirme l'effet inhibiteur de la clozapine sur les récepteurs  $\text{GABA}_A$  post-synaptiques.

**Clozapine inhibits synaptic transmission at  
GABAergic synapses established by ventral tegmental  
area neurones in culture.**

Running title: Clozapine actions at GABA<sub>A</sub> synapses

F. J. Michel and L.-E. Trudeau\*

Départements de Pharmacologie et de Psychiatrie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec H3C 3J7.

\* : to whom correspondence should be addressed at Département de Pharmacologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7; Tel. 1-514-343-5692 ; Fax. 1-514-343-2291 ; e-mail :

████████████████████

MICHEL, F.J. and TRUDEAU, L.E. (2000). *Neuropharmacology* **39**, pp 1536-1543.

## Abstract

The elucidation of the mechanism of action of the atypical antipsychotic clozapine is complicated by the finding that this molecule interacts with multiple targets including dopaminergic and serotonergic receptors. Binding studies have suggested that clozapine also antagonises GABA<sub>A</sub> receptors, but physiological evidence for such a block at functional synapses is lacking. In this study, we explored this antagonism using electrophysiological techniques on GABAergic neurones of the ventral tegmental area in culture. Inhibitory postsynaptic currents (IPSCs) evoked in isolated GABAergic neurones were found to be dose-dependently inhibited by clozapine. Compatible with a postsynaptic mechanism, we found that membrane currents evoked by exogenous applications of GABA were similarly dose-dependently inhibited by clozapine. An analysis of miniature inhibitory postsynaptic currents (mIPSCs) showed that clozapine reduced the amplitude of quantal events in a way similar to SR-95531, a specific GABA<sub>A</sub> receptor antagonist. Both drugs caused a similar leftward shift of the cumulative probability distribution of mIPSC amplitudes. This suggests that clozapine acts on both synaptic and extrasynaptic GABA<sub>A</sub> receptors. In conclusion, our work demonstrates that clozapine produces a functional antagonism of GABA<sub>A</sub> receptors at synapses. Because this effect occurs at concentrations that could be found in the brain of patients treated with clozapine, a reduction in GABAergic synaptic transmission could be implicated in the therapeutic actions and/or side-effects of clozapine.

## Keywords

GABA<sub>A</sub> receptors, clozapine, midbrain, atypical antipsychotic, schizophrenia.

## Introduction

Although atypical antipsychotic drugs such as clozapine are widely used in the treatment of schizophrenia (Andersson et al, 1998; Brunello et al, 1995), their exact mechanism of action remains ill-defined. The discovery that classical antipsychotics are potent antagonists of dopamine (DA) receptors has been instrumental in the elaboration of a “dopamine hypothesis” for the pathophysiology of schizophrenia (Bacopoulos et al, 1979; Davis et al, 1991; Grace, 1991; Joyce, 1993; Reynolds, 1983; Seeman, 1992). Although a number of variants of this hypothesis have been proposed, most of these suggest that one way or another, some aspect of the functioning of the central dopaminergic pathways is perturbed in schizophrenia and that most antipsychotics act by interacting with dopamine receptors.

Despite a large number of studies on clozapine, our understanding of its mechanism of action remains fragmentary. This drug interacts not only with all DA receptors (the D4 subtype showing the highest affinity (~9 nM) (Van Tol et al, 1991)), but also with other metabotropic receptors such as those for serotonin (5HT1 and 5HT2) (Canton et al, 1990), norepinephrine (Coward, 1992), acetylcholine (Snyder et al, 1974) and histamine (Coward, 1992) (for review see Brunello et al, 1995 and Coward, 1992). It has also been shown that clozapine can interact with some ionotropic receptors such as the NMDA-subtype glutamate receptor (Arvanov et al, 1997; Ossowska et al, 1999) and the GABA<sub>A</sub> receptor (Squires et al, 1991).

The possibility that GABAergic receptors could be a relevant target for clozapine can be considered interesting in part because dopaminergic neurones such as those in the ventral tegmental area (VTA) are known to be regulated by the activity of GABAergic neurones both of local origin and from areas such as the nucleus accumbens (Ikemoto et al, 1997; Johnson et al, 1992; Steffensen et al, 1998). Most evidence in favour of an interaction between clozapine and GABA receptors has originated from binding studies. Squires et al,

(1991) demonstrated that clozapine in the micromolar range can reverse the inhibitory effect of GABA on the binding of [<sup>35</sup>S]TBPS (<sup>35</sup>S-t-butylbicyclophosphorothionate), a competitive GABA<sub>A</sub> receptor antagonist, to rat brain membranes. A clozapine metabolite, N-desmethylozapine, seems to have the same effect (Wong et al, 1996). The same authors have suggested recently that in addition to clozapine, several other antipsychotic drugs may also act as antagonists at GABA<sub>A</sub> receptors (Squires et al, 1997; Squires et al, 1998). These observations have been confirmed by Korpi et al, (1995) who found that clozapine at 10 μM significantly reduces GABA-mediated Cl<sup>-</sup> influx in brain vesicles and that at 100 μM it regionally antagonises GABA inhibition of [<sup>35</sup>S]TBPS binding in brain sections. Finally, using a system allowing the expression of various combinations of recombinant GABA<sub>A</sub> receptor subunits, this same group has demonstrated that clozapine preferentially interacts with GABA<sub>A</sub> receptors containing specific combinations of α and β subunits (Korpi et al, 1995). Although physiological evidence is lacking, taken together these experiments support the idea that clozapine can act to reduce GABA<sub>A</sub> receptor activation.

In this report we have sought to determine whether the reported antagonism of GABA<sub>A</sub> receptors by clozapine could be of physiological importance at the synapse. Using GABAergic neurones from the VTA in primary culture we have tested whether clozapine acts to regulate the synaptic activation of GABA<sub>A</sub> receptors.

## Methods

### Cell culture

Primary cell cultures were prepared using methods derived from Cardozo (1993). Briefly, neonatal (P<sub>0</sub> or P<sub>1</sub>) Sprague-Dawley rats were anaesthetised with Halothane and their brains were removed and transferred to ice-cold medium. A 1.5 mm slice was cut at the level of the midbrain flexure. Using a custom tissue punch, the VTA was isolated and digested with papain during 30 min before being mechanically triturated. Cells were then centrifuged and re-suspended in Basal Medium Eagle containing 5 % FBS (GIBCO) and Mito+ serum extender (VWR Canlab). Cells were plated at a density of 200 000 cells per ml on poly-L-lysine/collagen coated coverslips (standard cultures) or at 100 000 cells per ml on agarose-covered coverslips sprayed with poly-D-lysine/collagen micro-dots (“micro-dot” cultures). The latter permitted the establishment of single neurone cultures in which the formation of autaptic synaptic contacts facilitated electrophysiological recordings of GABA-mediated synaptic currents (Bekkers et al, 1991). Experiments were performed on neurones between 10 to 30 days after plating.

### Electrophysiological recordings

Cells were perfused with extracellular medium that contained (in mM): NaCl 140, KCl 5, MgCl<sub>2</sub> 2, CaCl<sub>2</sub> 2, HEPES 10, glucose 10, sucrose 6 (pH 7.35). Whole-cell recordings were performed at room temperature using a WARNER PC-505 patch-clamp amplifier (Warner Instrument Corp, Hamden, CT). Signals were digitised at 5 kHz and recorded and analysed with Pclamp 6.0.4 software (Axon Instruments, Foster City, CA). Autaptic currents and IPSCs were recorded with a potassium gluconate intrapipette solution containing (in mM): K<sup>+</sup> gluconate 140, EGTA 10, HEPES 10, ATP (Mg<sup>2+</sup> salt) 4, GTP (Tris salt) 0.2 (pH 7.35). Miniature IPSCs (mIPSCs) were recorded with a Caesium

gluconate intrapipette solution which contained (in mM): Cs<sup>+</sup> gluconate 117.5, NaCl 10, MgCl<sub>2</sub> 4, HEPES 15, EGTA 5, ATP (Mg<sup>2+</sup> salt) 2, GTP (Tris salt) 0.2 (pH 7.35). When recording mIPSCs, 0.5 μM tetrodotoxin (TTX) and 10 μM 6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) were added to the extracellular medium in order to block respectively fast sodium spikes and glutamatergic non-NMDA EPSCs. All drugs were purchased from RBI/Sigma (St-Louis, MO) except TTX Alomone Labs (Jerusalem, Israel). mIPSCs were analysed with Mini Analysis software by Synaptosoft inc. (Leonia, NJ). Data are expressed as mean +/- SEM. Significance levels are expressed as: p<0.05 (\*), p<0.01 (\*\*) and p<0.001 (\*\*\*).

## Results

### Clozapine inhibits GABAergic autaptic IPSCs

To determine whether clozapine affects GABAergic synaptic transmission in VTA interneurons, autaptic synaptic responses were recorded in single neurone micro-dot cultures. GABAergic autaptic responses were triggered by a 1.5 ms depolarising step to +30 mV from a holding potential between -50 and -40 mV. This elicited a fast inward sodium action current followed by a slow outward GABA<sub>A</sub> receptor-mediated IPSC (Fig. 1A). These IPSCs were GABAergic because they were abolished by SR-95531 (2 μM), a specific GABA<sub>A</sub> receptor antagonist (Fig. 1A). Clozapine was found to have a dose-dependent inhibitory action on IPSCs starting from a threshold concentration of 1 μM (11.8 +/- 2.1 % inhibition; n=13; p<0.001). At 10 μM, IPSCs were decreased by 33.9 +/- 7.6 % (n= 9) (p<0.01) (Figs. 1A and 1B). The effect was reversible by wash (Figs. 1A and 1B). At a concentration of 50 μM and higher we found that clozapine appeared to interfere with action potential generation which could suggest a depolarising action or an interaction with voltage-dependent Na<sup>+</sup> channels (results not shown).

### **Clozapine inhibits GABAergic receptors**

The inhibition of IPSCs by clozapine could result from a number of possible mechanisms, either pre- or postsynaptic, or both. To determine whether, as predicted by binding studies, a direct block of GABA<sub>A</sub> receptors is involved, we tested the effect of clozapine on membrane currents activated by local applications of exogenous GABA on the cell bodies of VTA neurones. GABA was pressure-ejected at 500  $\mu$ M onto patch-clamped neurones. A clear antagonism of functional GABA responses was detected (Fig. 2A). At a concentration of 10  $\mu$ M, clozapine reversibly decreased GABA responses by 28.4  $\pm$  6 % (n=18) (p < 0.01) (individual means were compared using a Bonfferoni post-hoc test after a one-way ANOVA (F (4,56)=13.9 p<0.001)) (Figs. 2A and 2B). A maximal effect was reached at 50  $\mu$ M with a 48.8  $\pm$  7.3 % inhibition (Fig. 2B). The IC<sub>50</sub> was found to be 8.2  $\mu$ M (Fig. 2B). Because the inhibition of the autaptic IPSCs and the membrane currents evoked by direct applications of GABA were quantitatively similar, these results are compatible with the idea that clozapine acts at GABAergic synapses through a postsynaptic mechanism.

### **Clozapine acts on mIPSCs similarly to SR-95531**

Because somatic and synaptic GABA<sub>A</sub> receptors could possibly have different pharmacological properties (Brickley et al, 1999), we tested the effect of clozapine on the amplitude and frequency of miniature inhibitory postsynaptic currents (mIPSCs) in standard VTA cultures. This allowed us to more directly determine whether GABA<sub>A</sub> receptors located at the synapse can be blocked by clozapine and to exclude a presynaptic site of action. These events were recorded in the presence of TTX in order to block sodium action potentials and isolate quantal events. We predicted that if clozapine acts through a postsynaptic mechanism, it should decrease the amplitude of mIPSCs. Such experiments are complicated by the fact that as events decrease in amplitude they will have a tendency to fall below detection threshold therefore giving the appearance of a decrease in mIPSC

frequency and leading to an underestimation of the decrease in event amplitudes. In order to control for such a problem we have plotted cumulative probability distributions of mIPSC amplitudes before, during and after application of clozapine. This method allows one to directly compare synaptic event amplitude distributions, irrespective of the absolute change in event frequency. In addition, we compared the effect of clozapine to that of SR-95531, a specific GABA<sub>A</sub> receptor antagonist. The latter was used at a concentration (100 nM) sufficient to produce a block of 51.1 +/- 9.6% of autaptic IPSC amplitudes (Fig. 3C). We found that at 10  $\mu$ M, clozapine caused a significant and reversible decrease in mIPSC amplitudes in 2 out of 6 neurones tested. The decrease in mIPSC amplitude was directly observed as a shift to the left of the cumulative probability distribution of mIPSCs for individual experiments (Kolmogorov-Smirnov 2-Sample test,  $p < 0.01$ ) (Fig. 3A). At 50  $\mu$ M a clear reduction in mIPSC amplitude was detected in 7 out of 7 neurones tested (Fig. 3B) ( $p < 0.001$ ; Kolmogorov-Smirnov 2-Sample test). However, in 2 neurones the effect was not fully reversible. In these same neurones, a quantitatively similar decrease in mIPSC amplitudes was caused by the GABA<sub>A</sub> receptor antagonist SR-95531 (100 nM) (Fig. 3B) ( $p < 0.001$ ; Kolmogorov-Smirnov 2-Sample test). These observations confirm that clozapine acts to antagonise not only somatic but also synaptic GABA<sub>A</sub> receptors in our preparation.

## Discussion

The results presented herein provide direct physiological evidence for an action of clozapine at GABA<sub>A</sub> receptors located on VTA neurones. An inhibitory effect of clozapine on GABAergic synaptic currents (Fig. 1) and membrane currents evoked by direct applications of GABA (Fig. 2) was detectable from a threshold concentration of 1  $\mu$ M and was maximal at concentrations reaching 50  $\mu$ M. An analysis of miniature synaptic currents also suggests that the action of clozapine closely resembles that of SR-95531, a specific GABA<sub>A</sub> receptor antagonist (Fig. 3). Taken together, our results suggest that clozapine can act as an antagonist at both synaptic and extrasynaptic GABA<sub>A</sub> receptors on VTA neurones.

At face value, our observation that clozapine appears to be less effective at reducing the amplitude of mIPSCs (2 out of 6 neurones) than GABA-mediated membrane currents, might be taken as evidence for a heterogeneity in the sensitivity of synaptic and extrasynaptic GABA<sub>A</sub> receptors for clozapine. This is not theoretically impossible because synaptic and extrasynaptic GABA<sub>A</sub> receptors have been shown to display certain differences (Brickley et al, 1999) and a previous binding study has suggested that the affinity of clozapine for the GABA<sub>A</sub> receptor is dependent on the subunit composition of the receptor (Korpi et al, 1995). However, in the present situation, it is likely that this difference simply results from the considerable variability in mIPSC amplitudes (from 4 to 50 pA). Distributions established from very large numbers of mIPSCs would be required to reliably detect changes in mIPSC amplitudes in the range of 20 to 30%. In favour of the idea that populations of synaptic and extrasynaptic GABA<sub>A</sub> receptors on VTA neurones display similar sensitivities towards clozapine, we find that IPSCs (Fig. 1) and GABA-mediated membrane currents (Fig. 2) are decreased to approximately the same extent by 10  $\mu$ M clozapine.

In order to be relevant for the therapeutic effects of clozapine, such an antagonism of GABA receptors would need to occur at concentrations that are found in the brain of patients during treatment with this drug. Steady-state plasma concentrations of clozapine in human have been reported to be between 200 ng/ml to 450 ng/ml (Olesen, 1998). This corresponds to between 0.8  $\mu$ M and 1.8  $\mu$ M. In rodents, it has been reported that brain concentrations of clozapine are 16 to 24 fold higher than in plasma (Baldessarini et al, 1993; Weigmann et al, 1999). Taking into account various pharmacodynamics parameters, Weigmann and colleagues (1999) have compared human and rodent data on clozapine. From their work, it seems likely that clozapine concentrations in human brain should also be much higher than in plasma, perhaps between 10 to 15 fold. Similar conclusions have been reached for other psychoactive drugs such as antidepressants or the classical antipsychotic haloperidol (Altamura et al, 1987; Kornhuber et al, 1999). Concentrations of clozapine in the brain could thus reach between 8 and 27  $\mu$ M. At such concentrations our data suggest that clozapine might produce a 25 to 35 % decrease in GABAergic synaptic transmission in some brain areas. Nonetheless, it should be considered that the above-mentioned studies provided determinations of total brain concentrations and not aqueous concentrations. It is thus possible that the concentration of clozapine available to interact with GABA<sub>A</sub> receptors will be somewhat lower than the total brain concentration.

Although our experiments do not allow us to conclude that GABA receptors located on VTA neurones are especially sensitive to clozapine in comparison to GABAergic neurones elsewhere in the brain, our data nonetheless lead to the prediction that under conditions where clozapine reaches concentrations approaching 10  $\mu$ M in the brain, DA neurones of the VTA could be partially disinhibited because of a reduction in the efficacy of GABAergic synaptic inhibition. Clozapine has previously been shown to lead to an enhancement of the firing of VTA DA neurones, but this has been usually interpreted as resulting solely from the block of D2-type somatodendritic DA receptors on DA neurones (Hand et al, 1987). A partial contribution of GABA<sub>A</sub> receptor blockade to this effect might need to be considered.

Although our results do not allow us to predict directly the extent of antagonism of GABA<sub>A</sub> receptors by clozapine in patients receiving standard therapeutic doses, it remains a possibility that such an action on GABA receptors could be implicated in the generation of seizures that have been reported in a small subset of patients after treatment at high doses or during rapid dose escalation (Hyde et al, 1997; Pacia et al, 1994). If a significant block of GABA<sub>A</sub> receptors also occurs in patients at standard therapeutic concentrations, the possibility that a reduction of GABA transmission by clozapine could be involved in its therapeutic actions should also be considered. Interestingly, it has been previously suggested that clozapine could potentially act through a “kindling” mechanism whereby it might fail to cause enhanced cellular excitability following initial dosages, but in analogy with kindling models using electrical stimulation, an initially sub-threshold dosage of clozapine might eventually come to cause “micro-seizures” after repeated administration (Stevens et al (1997) but see also George et al (1998) or Minabe et al (1998)), possibly leading to long-term changes in neuronal pathways involved in schizophrenia. Recent work has shown that an acute application of clozapine to medial prefrontal cortex slices produced a marked facilitation of NMDA receptor-evoked responses (Arvanov et al, 1997). Additionally, Ossowska et al (1999) demonstrated that chronic treatment with clozapine produces a long term increase in NMDA receptor expression. An interesting possibility is that opposite actions of clozapine at GABA<sub>A</sub> (antagonism) and NMDA receptors (facilitation) might synergistically influence the activity of various neuronal networks.

### **Acknowledgements:**

We thank Drs. Patrice Congar and Alexandre Bouron for helpful comments on the manuscript. We also wish to acknowledge the help of Isabel Jutras for the preparation and maintenance of neuronal cultures. This work was funded in part by grants from Medical Research Council of Canada, the EJLB Foundation and the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

## Figures

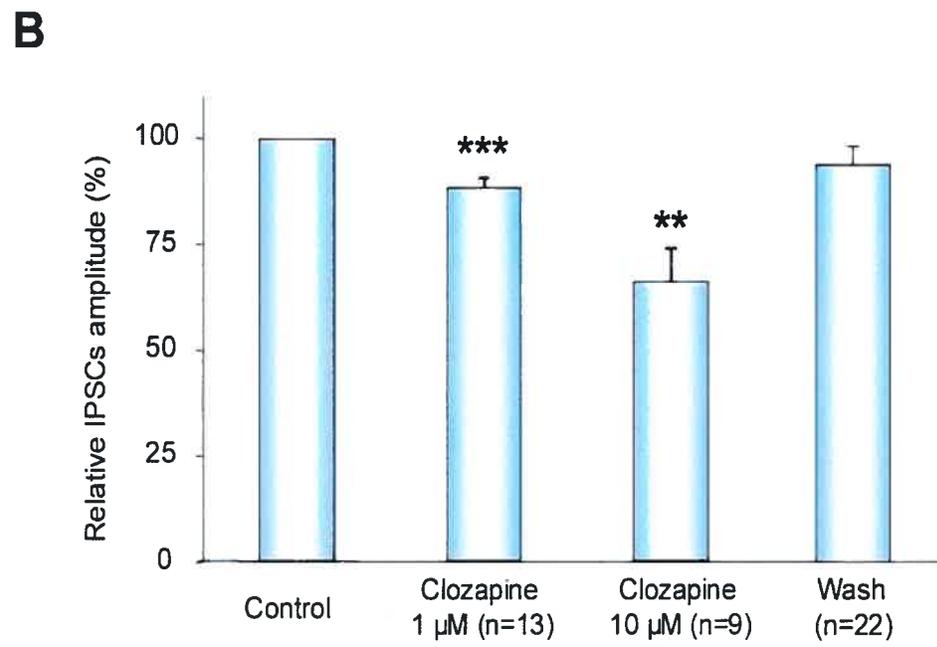
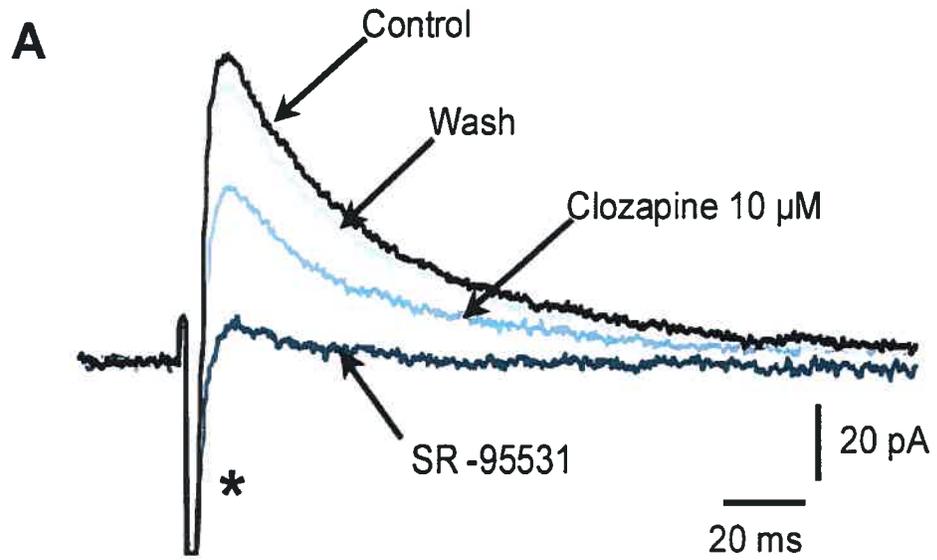


Fig. 1

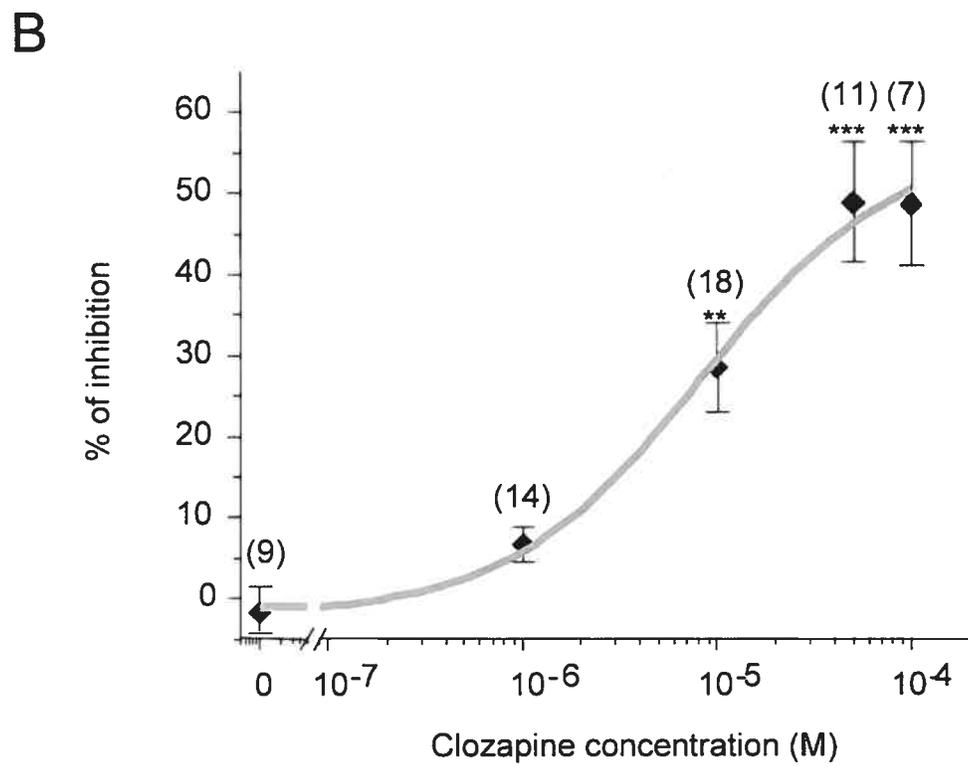
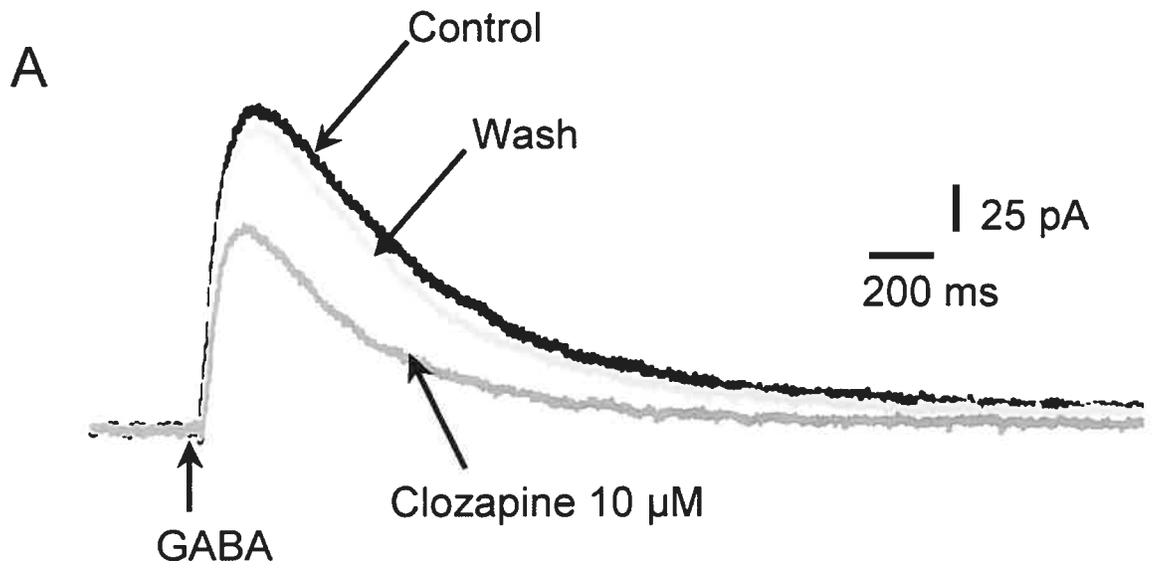


Fig. 2

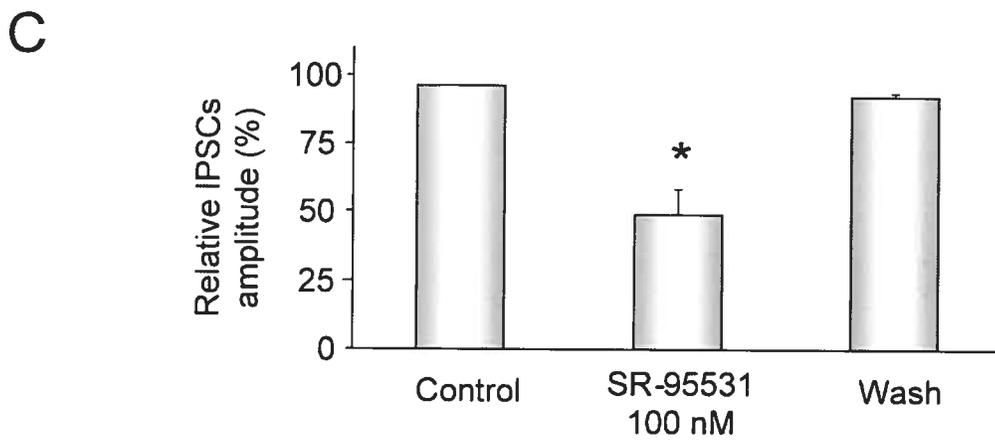
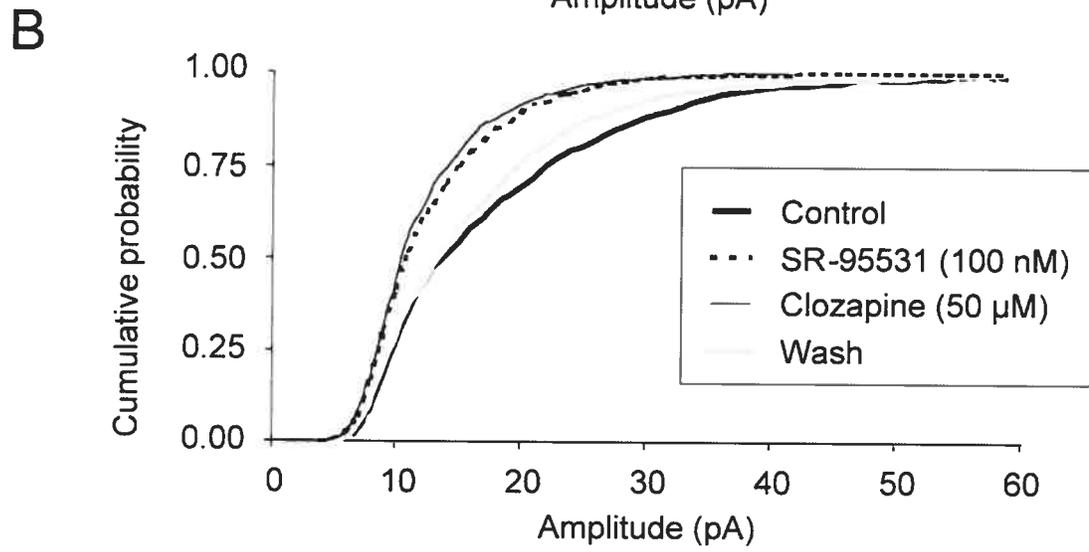
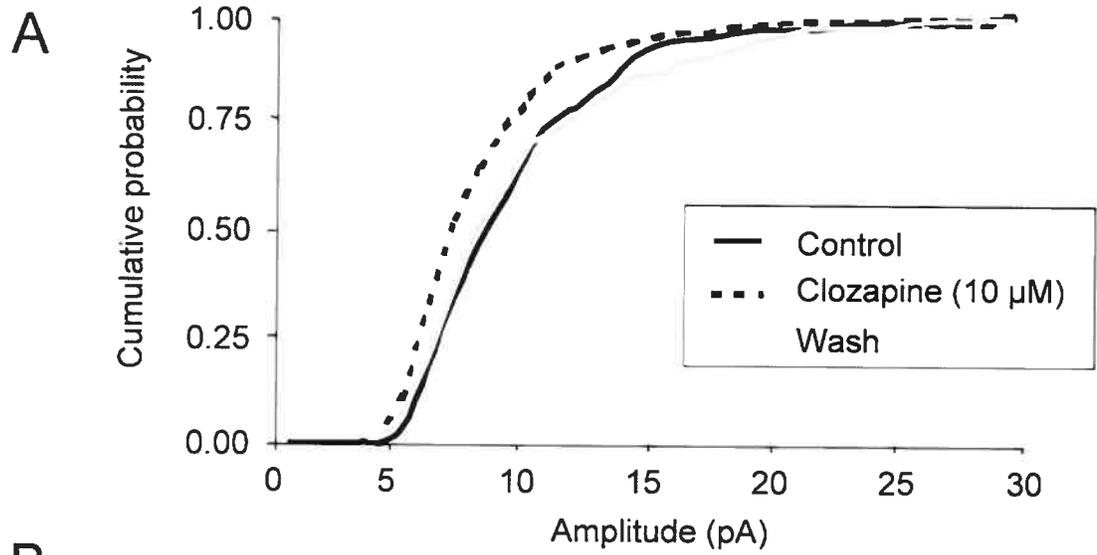


Fig. 3

## Legends

### Figure 1: Reduction of GABA-mediated synaptic currents by clozapine

A) Recording of an autaptic GABA-mediated synaptic current evoked by a step depolarisation to +30 mV for 1.5 ms. The neurone was voltage-clamped at -40 mV. Clozapine (10  $\mu$ M) caused a clear and reversible (*Wash*) decrease in IPSC amplitude. The outward current was almost totally abolished by 2  $\mu$ M SR-95531, a specific GABA<sub>A</sub> receptor antagonist. Note that the initial inward current (\*) is a truncated sodium action current. The recordings shown are 5-trace averages.

B) Summary data showing the reduction of autaptic IPSC amplitudes by 1 and 10  $\mu$ M clozapine and the reversal of these effects by wash. The number of experiments is indicated in parentheses for each column. Bars represent the mean  $\pm$  s.e.m. (paired t-tests were used for statistical comparisons).

### Figure 2: Clozapine reduces exogenous GABA-mediated currents

A) Outward currents evoked by direct application of exogenous GABA (500  $\mu$ M) by pressure ejection from a local pipette (3.5 ms pulse). The cell was voltage-clamped at -40 mV. In this cell, the outward GABA current was inhibited by 33 % by clozapine (10  $\mu$ M). This effect was completely reversible. Traces are averages of 5.

B) Dose-response curve of the antagonism of exogenous GABA-mediated currents by clozapine. The IC<sub>50</sub> was 8.2  $\mu$ M and corresponds to an inhibition of 27.5 %. The number of experiments at each dose is indicated in parentheses. Bars represent mean  $\pm$  s.e.m

**Figure 3: Clozapine acts similarly to a GABA<sub>A</sub> receptor antagonist on mIPSCs.**

A) Miniature GABAergic IPSCs (mIPSC) were recorded from standard VTA cultures in the presence of TTX (0.5  $\mu$ M) and CNQX (10  $\mu$ M). Clozapine (10  $\mu$ M) caused a clear and reversible shift to the left of the cumulative probability distribution of mIPSC amplitudes recorded from a VTA neurone, thus revealing a reduction in mIPSC amplitudes. The experimental distribution (*Clozapine*) was significantly different from control ( $p < 0.02$ ; Kolmogorov-Smirnov test).

B) Clozapine (50  $\mu$ M) and the GABA<sub>A</sub> receptor antagonist SR-95531 (100 nM) caused a quantitatively similar shift to the left of the mIPSC amplitude distribution. Data are from one representative neurone. Both experimental distributions (*Clozapine* and *SR-95531*) were significantly different from control ( $p < 0.0001$ ; Kolmogorov-Smirnov test).

C) At a concentration of 100 nM, SR-95531 caused a 51.1  $\pm$  9.6 % decrease in the amplitude of autaptic GABAergic IPSCs (n=5). Bars represent mean  $\pm$  s.e.m.

## References

- Altamura, A.C., De Novellis, F., Mauri, M.C., Gomeni, R. 1987. Plasma and brain pharmacokinetics of mianserin after single and multiple dosing in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 11 , 23-33.
- Andersson, C., Chakos, M., Mailman, R., Lieberman, J. 1998. Emerging roles for novel antipsychotic medications in the treatment of schizophrenia. *Psychiatr Clin North Am* 21 , 151-179.
- Arvanov, V.L., Liang, X., Schwartz, J., Grossman, S., Wang, R.Y. 1997. Clozapine and haloperidol modulate N-methyl-D-aspartate and non-N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neurotransmission in rat prefrontal cortical neurons in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 283 , 226-234.
- Bacopoulos, N.C., Spokes, E.G., Bird, E.D., Roth, R.H. 1979. Antipsychotic drug action in schizophrenic patients: effect on cortical dopamine metabolism after long-term treatment. *Science* 205 , 1405-1407.
- Baldessarini, R.J., Centorrino, F., Flood, J.G., Volpicelli, S.A., Huston-Lyons, D., Cohen, B.M. 1993. Tissue concentrations of clozapine and its metabolites in the rat. *Neuropsychopharmacology* 9 , 117-124.
- Bekkers, J.M. and Stevens, C.F. 1991. Excitatory and inhibitory autaptic currents in isolated hippocampal neurons maintained in cell culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 , 7834-7838.
- Brickley, S.G., Cull-Candy, S.G., Farrant, M. 1999. Single-channel properties of synaptic and extrasynaptic GABA<sub>A</sub> receptors suggest differential targeting of receptor subtypes. *J Neurosci* 19 , 2960-2973.
- Brunello, N., Masotto, C., Steardo, L., Markstein, R., Racagni, G. 1995. New insights into the biology of schizophrenia through the mechanism of action of clozapine. *Neuropsychopharmacology* 13 , 177-213.

- Canton, H., Verrielle, L., Colpaert, F.C. 1990. Binding of typical and atypical antipsychotics to 5-HT<sub>1C</sub> and 5-HT<sub>2</sub> sites: clozapine potently interacts with 5-HT<sub>1C</sub> sites. *Eur J Pharmacol* 191 , 93-96.
- Cardozo, D.L. 1993. Midbrain dopaminergic neurons from postnatal rat in long-term primary culture. *Neuroscience* 56 , 409-421.
- Coward, D.M. 1992. General pharmacology of clozapine. *Br J Psychiatry Suppl* 17 , 5-11.
- Davis, K.L., Kahn, R.S., Ko, G., Davidson, M. 1991. Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization. *Am J Psychiatry* 148 , 1474-1486.
- George, B. and Kulkarni, S.K. 1998. Protective effect of clozapine against pentylenetetrazol convulsions and kindling. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 20 , 395-401.
- Grace, A.A. 1991. Phasic versus tonic dopamine release and the modulation of dopamine system responsivity: a hypothesis for the etiology of schizophrenia. *Neuroscience* 41 , 1-24.
- Hand, T.H., Hu, X.T., Wang, R.Y. 1987. Differential effects of acute clozapine and haloperidol on the activity of ventral tegmental (A10) and nigrostriatal (A9) dopamine neurons. *Brain Res* 415 , 257-269.
- Hyde, T.M. and Weinberger, D.R. 1997. Seizures and schizophrenia. *Schizophr Bull* 23 , 611-622.
- Ikemoto, S., Kohl, R.R., McBride, W.J. 1997. GABA<sub>A</sub> receptor blockade in the anterior ventral tegmental area increases extracellular levels of dopamine in the nucleus accumbens of rats. *J Neurochem* 69 , 137-143.
- Johnson, S.W. and North, R.A. 1992. Two types of neurone in the rat ventral tegmental area and their synaptic inputs. *J Physiol (Lond)* 450 , 455-468.
- Joyce, J.N. 1993. The dopamine hypothesis of schizophrenia: limbic interactions with serotonin and norepinephrine. *Psychopharmacology (Berl)* 112 , S16-S34.
- Kornhuber, J., Schultz, A., Wiltfang, J., Meineke, I., Gleiter, C.H., Zochling, R., Boissl, K.W., Leblhuber, F., Riederer, P. 1999. Persistence of haloperidol in human brain tissue. *Am J Psychiatry* 156 , 885-890.

- Korpi, E.R., Wong, G., Luddens, H. 1995. Subtype specificity of gamma-aminobutyric acid type A receptor antagonism by clozapine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 352 , 365-373.
- Minabe, Y., Watanabe, K., Nishimura, T., Ashby, C.R.J. 1998. Acute and chronic administration of clozapine produces greater proconvulsant actions than haloperidol on focal hippocampal seizures in freely moving rats. *Synapse* 29 , 272-278.
- Olesen, O.V. 1998. Therapeutic drug monitoring of clozapine treatment. Therapeutic threshold value for serum clozapine concentrations. *Clin Pharmacokinet* 34 , 497-502.
- Ossowska, K., Pietraszek, M., Wardas, J., Nowak, G., Wolfarth, S. 1999. Chronic haloperidol and clozapine administration increases the number of cortical NMDA receptors in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 359 , 280-287.
- Pacia, S.V. and Devinsky, O. 1994. Clozapine-related seizures: experience with 5,629 patients. *Neurology* 44 , 2247-2249.
- Reynolds, G.P. 1983. Increased concentrations and lateral asymmetry of amygdala dopamine in schizophrenia. *Nature* 305 , 527-529.
- Seeman, P. 1992. Dopamine receptor sequences. Therapeutic levels of neuroleptics occupy D2 receptors, clozapine occupies D4. *Neuropsychopharmacology* 7 , 261-284.
- Snyder, S.H., Greenberg, D., Yamumura, H.I. 1974. Antischizophrenic drugs: affinity for muscarinic cholinergic receptor sites in the brain predicts extrapyramidal effects. *J Psychiatr Res* 11 , 91-95.
- Squires, R.F. and Saederup, E. 1991. A review of evidence for GABAergic predominance/glutamatergic deficit as a common etiological factor in both schizophrenia and affective psychoses: more support for a continuum hypothesis of "functional" psychosis. *Neurochem Res* 16 , 1099-1111.
- Squires, R.F. and Saederup, E. 1997. Clozapine and some other antipsychotic drugs may preferentially block the same subset of GABA<sub>A</sub> receptors. *Neurochem Res* 22 , 151-162.

- Squires, R.F. and Saederup, E. 1998. Clozapine and several other antipsychotic/antidepressant drugs preferentially block the same 'core' fraction of GABA<sub>A</sub> receptors. *Neurochem Res* 23 , 1283-1290.
- Steffensen, S.C., Svingos, A.L., Pickel, V.M., Henriksen, S.J. 1998. Electrophysiological characterization of GABAergic neurons in the ventral tegmental area. *J Neurosci* 18 , 8003-8015.
- Stevens, J.R., Denney, D., Szot, P. 1997. Sensitization with clozapine: beyond the dopamine hypothesis. *Biol Psychiatry* 42 , 771-780.
- Van Tol, H.H., Bunzow, J.R., Guan, H.C., Sunahara, R.K., Seeman, P., Niznik, H.B., Civelli, O. 1991. Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature* 350 , 610-614.
- Weigmann, H., Hartter, S., Fischer, V., Dahmen, N., Hiemke, C. 1999. Distribution of clozapine and desmethylclozapine between blood and brain in rats. *Eur Neuropsychopharmacol* 9 , 253-256.
- Wong, G., Kuoppamaki, M., Hietala, J., Luddens, H., Syvalahti, E., Korpi, E.R. 1996. Effects of clozapine metabolites and chronic clozapine treatment on rat brain GABA<sub>A</sub> receptors. *Eur J Pharmacol* 314 , 319-323.

**Discussion générale**

## 1. Rôles des neurones GABAergiques au sein du mésencéphale ventral.

Dans le premier article présenté dans cette thèse, nous démontrons que le taux de décharge des neurones GABAergiques du mésencéphale ventral est affecté par l'activation des récepteurs cholinergiques. Comme nous l'avons expliqué dans l'introduction, l'activité des neurones DAergiques est fondamentale tant du point de vue physiologique que pathologique. La concentration de DA dans le striatum et dans les autres cibles des neurones DAergiques est directement liée à l'activité de décharge de ces neurones. Le taux de décharge des neurones GABAergiques va directement influencer celui des neurones DAergiques qui reçoivent les afférences de ces interneurons. Par exemple, les neurones GABAergiques du mésencéphale ont un rôle central dans les mécanismes de dépendance aux opiacés. En effet, au sein du mésencéphale ventral, seuls les neurones GABAergiques expriment le récepteur mu aux opiacés. Ce récepteur est couplé à différents canaux potassiques et son activation par les endorphines (ou par des drogues opiacés exogènes) va entraîner l'hyperpolarisation des neurones GABAergiques et, de ce fait, diminuer l'inhibition tonique qu'exercent ces cellules sur les neurones DAergiques. En final, on peut voir que la présence d'agonistes opiacés dans le mésencéphale induit une hausse de la DA dans les zones de projection ce qui sous-tendrait les effets addictifs de ce type de molécules. Il semblerait que ces neurones interviennent également dans une autre voie de dépendance qui ne ferait pas intervenir les neurones DAergiques. Le mécanisme d'action de cette nouvelle voie de récompense reste hypothétique et serait basé sur le taux d'expression des récepteurs GABA<sub>A</sub>, plus élevé dans les neurones GABAergiques que dans les neurones DAergiques (Churchill et al. 1992). Ces auteurs ont montré que l'injection focalisée de muscimol (un agoniste des récepteurs GABA<sub>A</sub>) au niveau de l'ATV mais aussi de bicuculline (un antagoniste des récepteurs GABA<sub>A</sub>) conduit à un comportement de préférence de place. La voie de récompense activée par le muscimol est bloquée par un antagoniste des récepteurs DAergiques à l'inverse de la voie dépendante de la bicuculline qui reste inchangée (Laviolette et Van der Kooy 2001). Cette dernière observation montre

qu'il y a bien une voie du système de récompense qui passerait par les neurones GABAergiques de l'ATV et qui est indépendante des neurones DAergiques.

Dans un autre exemple, on peut voir que l'influence inhibitrice des neurones GABAergiques peut paradoxalement entraîner une hausse de la DA libérée. En effet, les neurones DAergiques peuvent, dans certaines conditions, passer dans un état de blocage par dépolarisation, où les canaux sodiques dépendants du voltage sont à l'état désensibilisé en permanence, car ces neurones ont un potentiel de membrane trop dépolarisé. Cet état se retrouve dans certaines conditions expérimentales chez le rat. En particulier, après un traitement chronique (au moins 21 jours) avec des antipsychotiques comme l'halopéridol ou la chlorpromazine, ou bien lorsque le système DAergique subit une lésion avec dégénérescence des neurones nigro-striés de type Parkinson (Chiodo et Bunney 1983 ; pour revue : Grace et al. 1997). Le mécanisme qui sous-tend ce phénomène n'est pas complètement élucidé, mais on sait que les neurones de la SN et de l'ATV peuvent être également touchés. Un premier mécanisme impliquerait les auto-récepteurs DAergiques, un second ferait intervenir la boucle de retro-contrôle striatale (voir figure 13). On peut voir que les projections GABAergiques indirectes du striatum aboutissent sur les interneurones GABAergiques du mésencéphale, et donc peuvent être impliquées dans un mécanisme de désinhibition qui pourrait conduire au blocage par dépolarisation. (Grace et Bunney 1979, 1985).

Le rôle des neurones GABAergiques dans la polarisation des neurones DAergiques est prépondérant d'un point de vue anatomique (voir figure 13) et fonctionnel. Comme on l'a vu précédemment, les neurones DAergiques de la SNc sont fortement innervés par des projections GABAergiques issues de la SNr qui forment ~~de~~ un réseau local ouvert comprenant des projections principales (interneurones) et des collatérales (neurones GABAergiques qui vont innerver également des zones cibles comme le striatum) (Mailly et al. 2003). Il a été démontré que les neurones DAergiques sont sous le contrôle tonique d'afférences GABAergiques qui agissent par l'intermédiaire des récepteurs canaux GABA<sub>A</sub> (Westerink et al. 1996 ; Wolf et al. 1978). Finalement, on sait que les afférences GABAergiques intrinsèques stimulent préférentiellement les récepteurs GABA<sub>A</sub>, alors que

les afférences venant de l'extérieur des noyaux DAergiques (issues de l'accumbens ou du striatum) stimulent plutôt des récepteurs GABA<sub>B</sub>. Ces données démontrent bien que les interneurons GABAergiques sont très impliqués dans le niveau de polarisation des neurones DAergiques et donc dans leur taux de décharge. La figure 13 illustre quelques unes des afférences qui innervent et régulent les neurones GABAergiques et DAergiques du mésencéphale ventral. La compréhension complète de ces multiples influences reste à explorer (en particulier pour les neurones GABAergiques), mais nos travaux démontrent que les voies cholinergiques ont un effet excitateur sur les neurones GABAergiques, outre celui déjà observé sur les neurones DAergiques.

Ces deux exemples soulignent l'intérêt d'étudier les neurones GABAergiques du mésencéphale ventral. Ils montrent aussi le peu d'information disponible à leur sujet. L'étude de ces neurones est compliquée par l'absence d'organisation macroscopique des structures qui les contiennent. Il est impossible de distinguer morphologiquement les neurones DAergiques des GABAergiques dans des tranches. Par ailleurs, l'emphase a principalement été portée sur l'étude des neurones DAergiques, lesquels constituent la cible primaire des multiples phénomènes physiologiques et pathologiques dont nous avons fait état. L'étude bibliographique du sujet montre cependant un nombre croissant de publications. Il est donc raisonnable d'espérer pour un proche avenir une meilleure description générale de l'influence des neurones GABAergiques sur les neurones DAergiques du mésencéphale ventral.

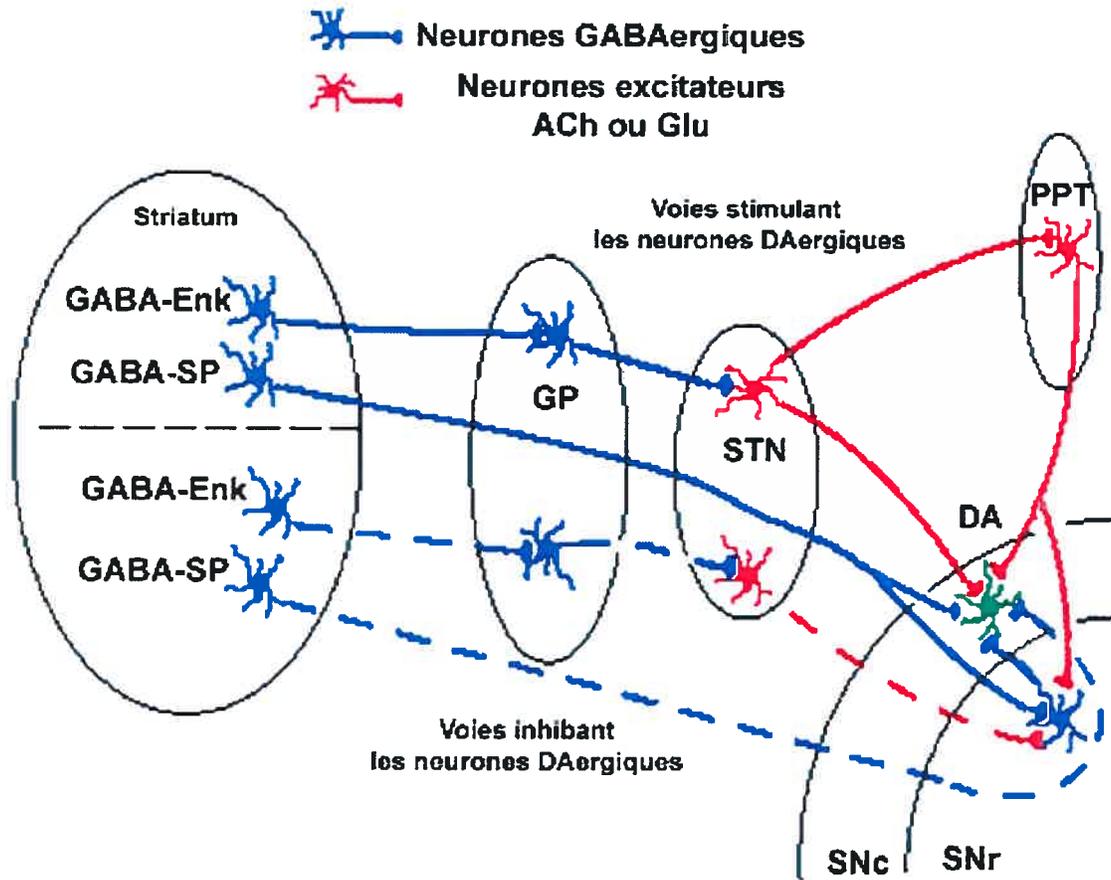


Figure 13 : Régulation des neurones DAergiques de la SN

Les neurones DAergiques (en vert) de la SN reçoivent une forte innervation GABAergique directe et indirecte qui régule de façon positive (traits pleins) ou négative (traits pointillés) leur activité. Ces neurones reçoivent aussi des afférences excitatrices glutamatergiques et cholinergiques. La sommation de ces afférences (et des autres citées dans l'introduction, mais non incluses dans à la figure : NA, 5HT...) entraîne une régulation complexe, où les interneurones GABAergiques du mésencéphale ventral, de par leur position finale dans le circuit, intègrent une grande quantité de l'information relayée aux neurones DAergiques. Par soucis de simplification les projection DAergiques ont été omises. PPT : pédonculopontine tegmentum ; STN : noyau sous-thalamique ; GP : globus pallidus ; SNc et SNr : substance noire compacte et réticulée ; Enk : enképhaline ; SP : substance P (Tiré de Grace 1997).

## 2. Implication des récepteurs M3

La pharmacologie des récepteurs muscariniques est riche de nombreuses molécules. Malheureusement, la plupart n'ont pas une sélectivité satisfaisante pour des études pharmacologiques. Ceci est sans doute imputable en partie à la forte homologie entre les divers sous-types de récepteurs muscariniques. En effet, le site de liaison est particulièrement conservé, alors que les molécules les plus spécifiques sont des toxines polypeptidiques, extraites du venin de serpents (mambas noir et vert), qui tireraient leur sélectivité des interactions qu'elles forment avec des sites extérieurs au site de liaison principal (Bradley 2000). Il est néanmoins possible de détecter la présence de récepteurs muscariniques dans des cellules. On utilise à cette fin les techniques d'immunocytochimie et d'hybridation *in situ*, qui permettent la mise en évidence des protéines et des ARNm des divers sous-types.

Seul l'ARNm du M5 a été clairement détecté dans le mésencéphale ventral (Weiner et al. 1990). Le M3 est sans doute également exprimé dans la région, car plusieurs études couplant radioligand et immunocytochimie ont rapporté sa présence (Grillner et al. 2000). On ne saurait, par contre, exclure la présence très minoritaire des autres récepteurs muscariniques, parce que les anticorps dirigés contre ces récepteurs ne sont pas très efficaces et que les études d'hybridation *in situ* ont un pouvoir de détection limité. Nous avons couplé différentes approches afin de déterminer quels récepteurs muscariniques sont impliqués dans les effets que nous avons présentés. Tout d'abord, l'immunocytochimie nous a permis de reconnaître la présence du M3 de façon claire. Malheureusement, les marquages contre le M5 n'ont pas été interprétables, car le rapport signal/bruit était trop faible. Les outils pharmacologiques nous ont permis d'exclure les récepteurs M2 et M4, ainsi que le M1, dans la régulation des niveaux intracellulaires de  $Ca^{2+}$ . Les antagonistes utilisés (voir introduction) sont complémentaires et seul le profil pharmacologique global nous permet d'arriver à la conclusion d'une implication du récepteur M3 et peut-être du M5. Pour compléter cette étude pharmacologique, nous avons eu recours à des cultures de souris transgéniques dont le gène du récepteur M5 est invalidé. Pour réaliser une telle étude,

impliquant un changement de modèle (cultures de souris plutôt que de rats), il nous a fallu effectuer différentes expériences préliminaires. Tout d'abord, nous avons vérifié que le protocole de mise en culture pouvait s'appliquer à des cultures de neurones du mésencéphale ventral de souris. Nous avons utilisé à cette fin des souris de la lignée CD1, qui est l'une des deux lignées souches ayant servi à l'obtention des M5-KO (Takeuchi et al. 2002). Ces tests ont montré qu'avec le même protocole pour les rats et les souris, on obtient des cultures fonctionnelles et comparables en terme de proportion respective de neurones DAergiques et GABAergiques. La principale différence observée est la taille des cellules et donc du nombre de cellules par lamelle. Les neurones de souris étant plus petits, il a fallu augmenter de 50 % (200 000 à 300 000 cellules/ml) la concentration de la suspension cellulaire déposée sur les lamelles pour obtenir une densité équivalente à celle des cultures de rats. La survie à long terme des cultures de souris est également plus faible. La survie de ces cultures ne dépasse pas 3 semaines, ce qui pourrait indiquer un manque de facteur(s) trophique(s) spécifique(s) aux neurones de souris dans le milieu. Le tapis glial issu du mésencéphale ventral des souris est également lent à se développer, ce qui pourrait confirmer un tel manque. Malgré cela, les études d'imagerie calcique effectuées sur ces cultures nous ont donné des résultats similaires à ceux du rat. La muscarine a augmenté la  $[Ca^{2+}]_i$  de  $114 \pm 25$  % pour les rats et  $170 \pm 39$  % pour les souris. La deuxième étape a été d'utiliser les souris M5-KO et wt pour comparer les effets de la muscarine pour les deux lignées et évaluer la part relative de l'activation du récepteur M5 dans la réponse calcique observée. L'effet de la muscarine sur les neurones GABAergiques en culture était alors moindre par rapport aux CD1, mais d'égale amplitude :  $64 \pm 15$  nM d'augmentation pour les wt et  $46 \pm 11$  nM d'augmentation pour les M5-KO (soit  $89 \pm 44$  % et  $52 \pm 13$  % de hausse, respectivement  $p > 0.05$ ).

Ces résultats permettent de conclure que le récepteur M3 est responsable de la majeure partie de la réponse calcique des neurones GABAergiques du mésencéphale ventral, mais qu'une composante minoritaire pourrait être due à l'activation de récepteurs M5 dans certaines cellules.

### 3. Régulation calcique des neurones GABAergiques

Le calcium est un signal ubiquitaire contrôlant de nombreux processus cellulaires. C'est en 1883 que Sidney Ringer a montré le rôle prépondérant joué par le calcium lors de la contraction cardiaque chez la grenouille, mais c'est seulement depuis une vingtaine d'années que le rôle du calcium dans la signalisation cellulaire commence à être compris. Il intervient dans toutes les étapes de la vie : méiose, fécondation, embryogenèse... et de nombreuses fonctions physiologiques : contraction musculaire, sécrétion, mémoire... (Berridge et al. 2000).

Toutes les cellules vivantes dépensent de l'énergie pour maintenir la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique à un niveau très bas (autour de 100 nM). La concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire est de l'ordre de 1,4 mM (soit 10 000 à 20 000 fois supérieur). Le  $\text{Ca}^{2+}$  diffuse passivement vers le cytosol (influx), pour être activement rejeté par des transporteurs localisés dans la membrane plasmique et la membrane du réticulum endoplasmique. Ainsi, à l'état de repos, le cytosol est entouré de compartiments à forte concentration de  $\text{Ca}^{2+}$ . Les mitochondries et l'intérieur de la membrane nucléaire (qui est en continuité avec le réticulum) contiennent également du  $\text{Ca}^{2+}$ . Le transport actif du  $\text{Ca}^{2+}$  se fait par des pompes à  $\text{Ca}^{2+}$  et l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . En particulier, les pompes appelées SERCA (pour sarcoplasmic or endoplasmic réticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase) sont inhibées par la thapsigargine. Une incubation de cellules avec cette molécule entraîne une fuite du  $\text{Ca}^{2+}$  hors des organites, laquelle se traduit par une diminution progressive des stocks de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire. C'est grâce à ce type d'expérience que nous avons conclu que la hausse de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induite par la muscarine est due à un influx à partir du milieu extracellulaire, puisqu'un traitement de 30 min avec la thapsigargine n'affectait pas cette réponse. Cette conclusion a été confirmée par l'emploi de bloqueurs non sélectifs des canaux cationiques ( $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Gd}^{3+}$ ). L'augmentation de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  résulte donc de l'ouverture de canaux calciques situés au sein de la membrane plasmique. Ces canaux peuvent être de 3 types : dépendants du voltage (VDCC), dépendants des stocks internes de  $\text{Ca}^{2+}$  (SOC : Store operated channels) et dépendants de l'activation de récepteurs (ROC) (Putney 1999).

### 3.1 VDCC (canaux calciques dépendants du voltage)

Ces canaux sont retrouvés principalement dans les cellules excitables et s'ouvrent lorsque la membrane est dépolarisée. Les VDCC sont composés de complexes multimériques dont la sous-unité principale  $\alpha 1$  constitue le canal et confère la sensibilité au voltage. Pas moins de 6 sous-unités  $\alpha 1$  différentes ont été clonées. On distingue deux catégories de VDCC, la première s'active à bas seuil (-50 mV), ce qui est proche du potentiel de repos des cellules (-65 mV), et s'inactive rapidement (sous-type T). La seconde s'active à haut seuil (-30 à -20 mV), mais s'inactive peu ou pas. Parmi ceux-ci, les canaux L sont inhibés par la nifédipine et la verapamil et sont activés par le BayK 9644. Nous avons montré que la hausse de  $[Ca^{2+}]_i$  induite par la muscarine est inhibée par la nifédipine et la verapamil. Des expériences effectuées avec le BayK montrent, par contre, qu'en présence de cet agoniste, la muscarine induit encore une hausse de  $[Ca^{2+}]_i$  ( $59 \pm 21$  % de la réponse muscarinique mesurée en l'absence de BayK ( $p = 0.16$  ;  $n = 15$ )) (non publié). Cette dernière observation est en contradiction avec l'implication des canaux de type L dans l'effet de la muscarine. De plus, la faible dépolarisation due à la muscarine exclue également les canaux L, qui sont à hauts seuil et nécessitent donc une forte dépolarisation. Pour écarter de façon définitive l'implication des VDCC, nous avons étudié l'effet de la muscarine sur les courants calciques voltages dépendants présents dans les neurones GABAergiques (article 2 fig. 6). Si les canaux calciques dépendants du voltage sont impliqués dans l'effet de la muscarine, leur potentiel d'activation devrait être abaissé par la muscarine. Ceci se traduira par un décalage vers la gauche de la courbe montrant le courant en fonction du voltage de la cellule (courbe I/V). On peut voir dans la figure 6 de l'article 2 qu'il n'y a aucun changement à ce niveau, et qu'en plus, l'amplitude des courants calciques est diminuée par la muscarine, ce qui est en totale contradiction avec une implication de ces canaux dans les effets étudiés. Ces résultats nous ont donc poussé à éliminer toute implication des canaux calciques dépendants du voltage dans l'influx calcique observé. Par contre, on ne peut pas exclure que cet effet inhibiteur soit intervenu dans la diminution de l'amplitude des courants GABAergiques autaptiques décrits dans le premier article (figure 7).

### 3.2 SOC (canaux calciques dépendants des stocks internes de $\text{Ca}^{2+}$ )

Ces canaux s'ouvrent lorsque le  $\text{Ca}^{2+}$  des compartiments intracellulaires est mobilisé. Ce mécanisme particulier d'entrée du calcium est également appelé entrée capacitative de calcium (Putney 1986). Les courants calciques qui en résultent sont du type  $I_{\text{CRAC}}$  (calcium Release-activated calcium current) (Hoth et Pennes, 1992). Le ou les mécanismes d'activation de  $I_{\text{CRAC}}$  sont mal connus. La principale hypothèse fait intervenir un message intracellulaire diffusible qui ferait le lien entre la libération du calcium des réserves internes et l'activation des canaux calciques de la membrane plasmique (CIF pour calcium influx factor). Le CIF n'a pas encore été purifié et sa nature reste très controversée; il pourrait même s'agir du  $\text{Ca}^{2+}$  lui-même. Une autre hypothèse suggère une relation directe entre les canaux calciques internes (récepteurs-canaux à la ryanodine et à l'IP3) et les canaux calciques de la membrane plasmique (interaction protéine-protéine) (voir figure 14) (Venkatachalan 2002). Le fait que la déplétion des stocks internes de calcium par la thapsigargine n'affecte pas l'effet de la muscarine, tend à exclure la possibilité de l'implication de ce type de canaux.

### 3.3 ROC (canaux calciques dépendants de l'activation de récepteurs)

Ces canaux sont divisés en deux sous-familles : Les récepteurs canaux et les canaux activés par une voie de transduction indépendante des stocks de calcium internes. Ces récepteurs canaux sont localisés dans la membrane plasmique et possèdent des sites de liaison pour des transmetteurs spécifiques : Récepteurs NMDA au glutamate,  $5\text{-HT}_3$  à la sérotonine, nicotiques  $\alpha 7$ , purinergiques P2X... Ces canaux ne sont pas impliqués dans l'effet que nous observons, puisque c'est l'activation de récepteurs muscariniques qui induit la hausse de calcium et que ces récepteurs métabotropiques ne forment pas de canaux en soi.

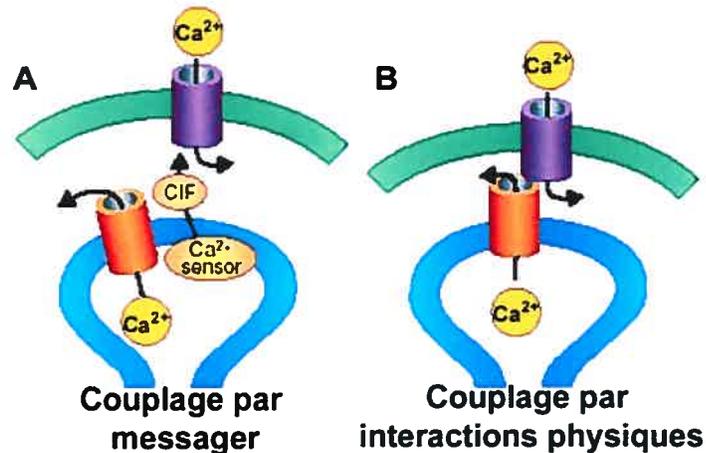


Figure 14 : Modèles de l'activation des SOC (canaux dépendants des stocks internes de  $\text{Ca}^{2+}$ )

A) La déplétion des stocks de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire entraîne l'émission d'un messenger chimique (CIF) qui va induire l'ouverture des SOC. B) Il y aurait une interaction directe entre les récepteurs à l'IP<sub>3</sub> et les SOC et l'activation des récepteurs induirait la transmission d'un signal de type allostérique qui induirait l'ouverture des SOC (Modifié de Venkatachalam et al. 2002).

Par contre, les récepteurs muscariniques (en particulier M1, M3 et M5) induisent l'activation de canaux cationiques non sélectifs (Yamashita 1999; Guérineau 1995; Shalinsky 2002). Ces conductances ne sont pas sensibles à la présence de BAPTA dans la pipette, ce qui prouve leur indépendance par rapport aux stocks intracellulaires de calcium. De même, de nombreuses études exposent des résultats démontrant un influx calcique de ce type dans des cellules non-excitables. Deux exemples ont retenu notre attention. Rosado et Sage (2000) décrivent un influx calcique activé par le récepteur à la thrombine, qui est couplé à une protéine  $G_{q/11}$ , dans les cellules plaquettaires. L'intérêt de cette étude réside dans le fait que cet influx est dépendant de la PKC comme dans le cas des neurones GABAergiques. Ces auteurs concluent que l'influx en question est probablement dû à

l'activation de canaux TRPC3 directement par le DAG. Moneer et Taylor (2002) démontrent pour leur part que, dans une lignée cellulaire issue de muscles vasculaires lisses (A7r5), il est possible de distinguer les voies d'entrée de calcium par les canaux ROC et SOC. Une première série d'expériences montre que ces deux mécanismes ne sont pas indépendants et qu'ils partagent la même voie de signalisation par la PLC et la production de DAG et d'IP3. Par contre, le même stimulus (activation du récepteur à la vasopressine) entraîne en même temps une inhibition des SOC et une stimulation des ROC. La pharmacologie de ces deux types d'influx calciques est différente dans ce modèle, ce qui permet de pondérer l'influence de chacune de ces voies d'entrées du calcium. Les auteurs arrivent à la conclusion que c'est l'acide arachidonique qui vient de la dégradation du DAG par la DAG lipase qui régule simultanément négativement et positivement les ROC et les SOC.

On peut donc voir que les récepteurs M1, M3 et M5 en activant la voie de la PLC vont influencer en même temps les deux modalités d'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  indépendantes du voltage. Cette convergence n'est pas le fruit du hasard, mais montre bien que le signal calcique est très régulé. Bien que les fondements moléculaires de ces conductances calciques ne soient pas connus, une multitude d'études, quelquefois contradictoires, montrent que cette convergence impliquerait les canaux qui sous-tendent ces influx. En effet, il semble que la grande majorité des flux de  $\text{Ca}^{2+}$  à travers la membrane plasmique qui sont indépendants du voltage passe par des canaux de la famille des TRP.

### 3.4 TRP

Les canaux TRP ont été identifiés comme étant des composantes essentielles de la photo-transduction chez la mouche du fruit (*Drosophila Melanogaster*). Le nom *trp* signifie *transient receptor potential* et vient de la description du phénotype mutant du gène de cette protéine (Montell et Rubin 1989). En effet, les mouches mutantes pour ce gène montrent une dégradation du signal calcique détecté dans les cellules de l'œil sous l'action de la

lumière. Chez la mouche, le signal visuel est induit par la rhodopsine via une protéine Gq et l'activation de la PLC qui entraîne l'ouverture de canaux dépolarisants. Parmi les canaux TRP, on distingue le TRP et le TRP-like (TRPL). L'activation de ces canaux par la voie de l'IP3 et la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  des organites en fait des prototypes de SOC (Montell 1999). La recherche d'homologues de TRP (et TRPL) chez les mammifères a été des plus fructueuse ; 7 gènes (TRPC1 à 7) ont été clonés et encodent des protéines très proches de la TRP de la drosophile (figure 15). Le C correspond à "canonical" en raison de leur ressemblance avec le canal de la mouche. Les TRP possèdent tous une structure comprenant 6 domaines transmembranaires proche des canaux dépendants du voltage. Leur absence de sensibilité au voltage est due au segment S4 qui est dégénéré et aux domaines Ankirines-like répétés (figure 15). Il semble également que les canaux TRP se regroupent en tétramères homogènes ou hétérogènes. La superfamille des TRP se compose de 3 grandes familles, les TRPC, les TRPV (pour vanilloïde) au nombre de 5, et les TRPM (pour melastatine) produits par 8 gènes différents. Certains de ces canaux semblent être des SOC (TRPV6 et TRPM7), mais la majorité n'a pas encore de fonction établie et ses propriétés de canal n'ont pas encore été décrites (Montell et al. 2002). On peut diviser la famille TRPC en 4 sous-familles sur la base de leur éloignement génétique (figure 15).

Le rôle des canaux TRP dans la régulation physiologique de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  reste controversé. Les canaux TRP sont ubiquitaires et chaque type cellulaire exprime souvent plusieurs sous-types de TRP. Il devient difficile d'étudier la fonction de chaque type de canal TRP dans ces conditions. En effet, il faut travailler dans des systèmes de sur-expression et extraire le signal spécifique de la réponse endogène. A l'opposé, il est très difficile d'abolir complètement la fonction de ce type de canal, tant par une stratégie anti-sens qu'à l'aide de souris knock-out. La superfamille des canaux TRP est couplée à un nombre impressionnant de stimuli différents, tels la température, la douleur, le stress oxydatif, la lumière, les hormones et les neurotransmetteurs (Clapham et al. 2001). La caractéristique qui unit la famille des TRPC aux TRP de Drosophile est leur capacité de répondre à la stimulation de la PLC quel que soit le type de récepteur impliqué et donc de montrer une activité ROC.

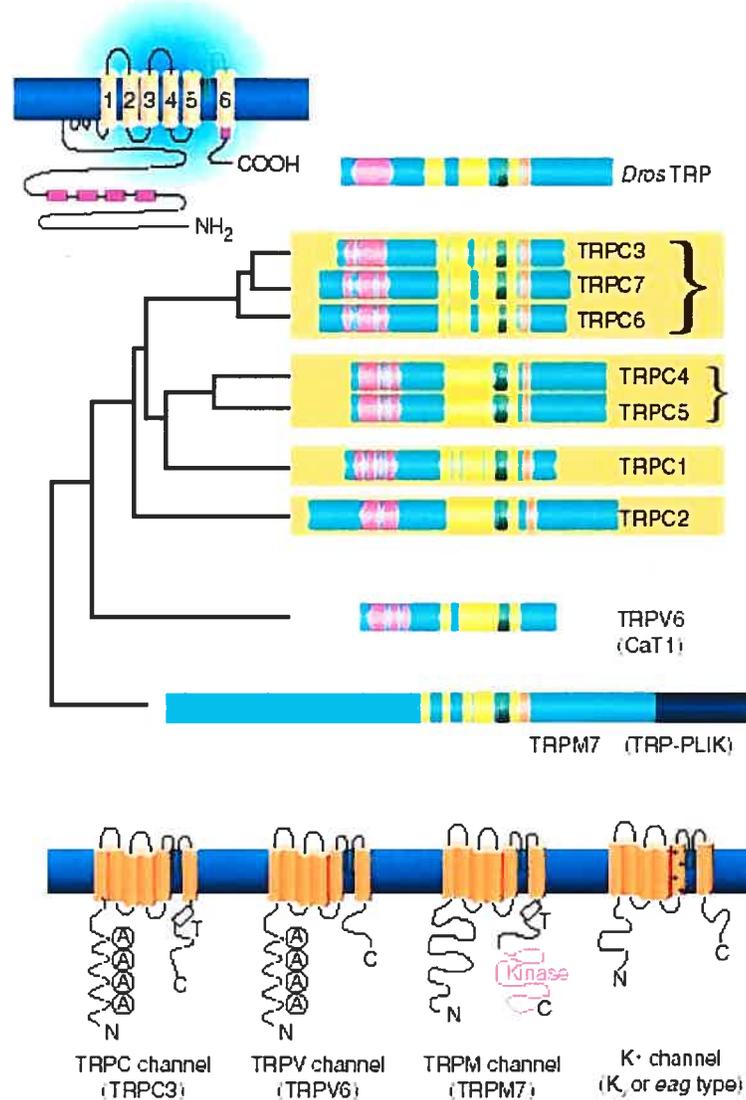


Figure 15 : Structure des canaux TRP (transient receptor potential)

La structure des canaux TRP est proche de celle des canaux dépendants du voltage, avec 6 domaines transmembranaires (jaune). Ces canaux possèdent également un motif de type ankirine répété (rouge et A). Le dendrogramme montre les 4 familles de TRPC de mammifère mis en parallèle avec celui de la drosophile et les TRPV6 et TRPM7. On notera la forte homologie de structure entre ces différents canaux. (Modifié de Venkatachalam et al. 2002).

Malgré tout, l'activation de la PLC mène aussi à la production d'IP3 et à la relâche du calcium des stocks intracellulaires. Finalement, il est très difficile de distinguer entre des fonctions ROC et SOC pour les canaux TRPC (figure 16). Chaque sous-type de TRPC a fait l'objet d'un nombre impressionnant d'études contradictoires concernant ces fonctions ROC et SOC. A l'évidence, le fonctionnement des canaux TRP semble fortement dépendre du type cellulaire et du taux d'expression des différents partenaires impliqués dans la voie de transduction, depuis le récepteur jusqu'au sous-type de TRP (Hofmann et al. 2000 ; Zitt et al. 2002 ; Minke et Cook 2002). Dans le cas présent, il n'y a pas de sur-expression puisque les expériences ont été effectuées en culture primaire. Les effets étudiés sont donc plus proches des conditions physiologiques. Par contre, notre approche pharmacologique ne permet pas de discriminer entre les sous-types, d'autant plus que ces canaux peuvent être formés d'hétérotétramères dont le profil pharmacologique est sans doute très variable, comme nous l'avons mentionné précédemment.

### 3.5 Conclusion

Nous avons vu, dans l'article 2, que les neurones GABAergiques du mésencéphale ventral en culture expriment les sous-types TRPC1, 3, 5 et 6 (les neurones DAergiques expriment ces même sous-types (figure 17)). Par ailleurs, nous avons montré que la réponse calcique induite par l'activation des récepteurs muscariniques est bloquée par le SKF96365, seul composé connu pour avoir une certaine sélectivité pour les canaux TRPC. La hausse de calcium observée n'est pas attribuable à l'activation des VDCC ni à une mobilisation des stocks intracellulaires, mais dépend de l'activation de la PKC. Nous pouvons donc conclure que cette hausse de  $[Ca^{2+}]_i$  passe fort probablement par l'activation de canaux qui font partie de la famille des TRPC, stimulés par les récepteurs M3 et probablement par la production de DAG (ROC).

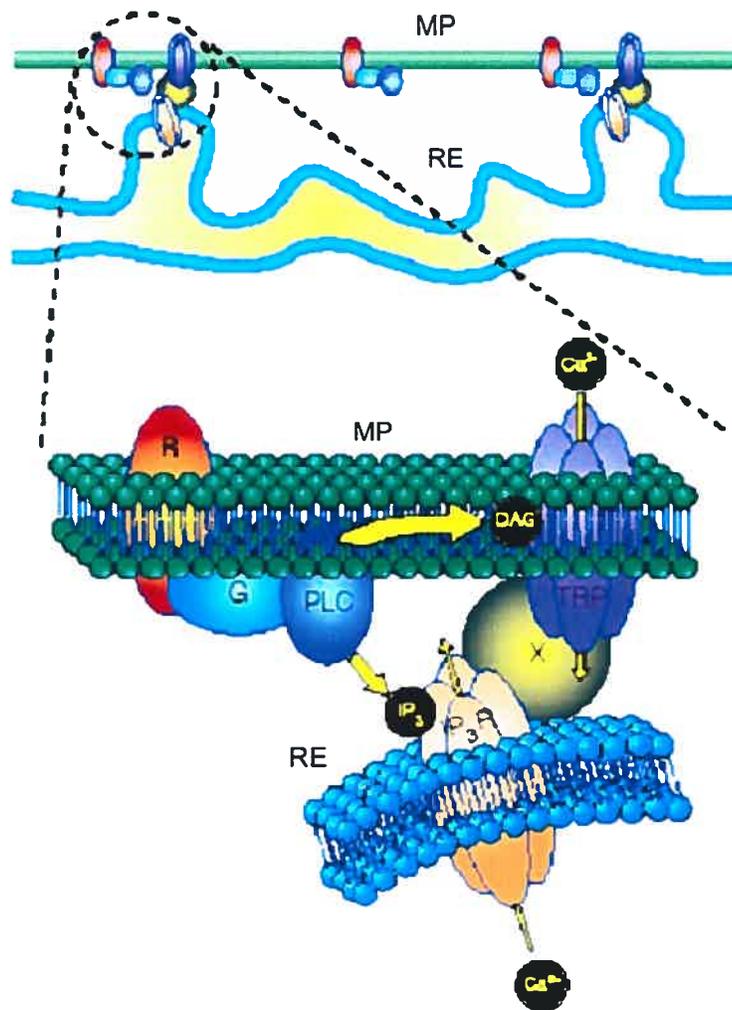


Figure 16 : Schéma du couplage entre RCPG et canaux TRP

L'activation du récepteur R va induire la production de DAG et d'IP3 grâce à la PLC. Ces deux seconds messagers vont ensuite produire un influx calcique dans la cellule par l'intermédiaire de canaux TRP. Le DAG a une action directe alors que l'IP3 va passer par l'activation du récepteur-canal à l'IP3 et entraîner la libération des stocks de  $\text{Ca}^{2+}$  des organites par un mécanisme X, pouvant lui même varier en fonction du type cellulaire. MP : membrane plasmique, RE : réticulum endoplasmique. (Modifié de Venkatachalam et al. 2002).

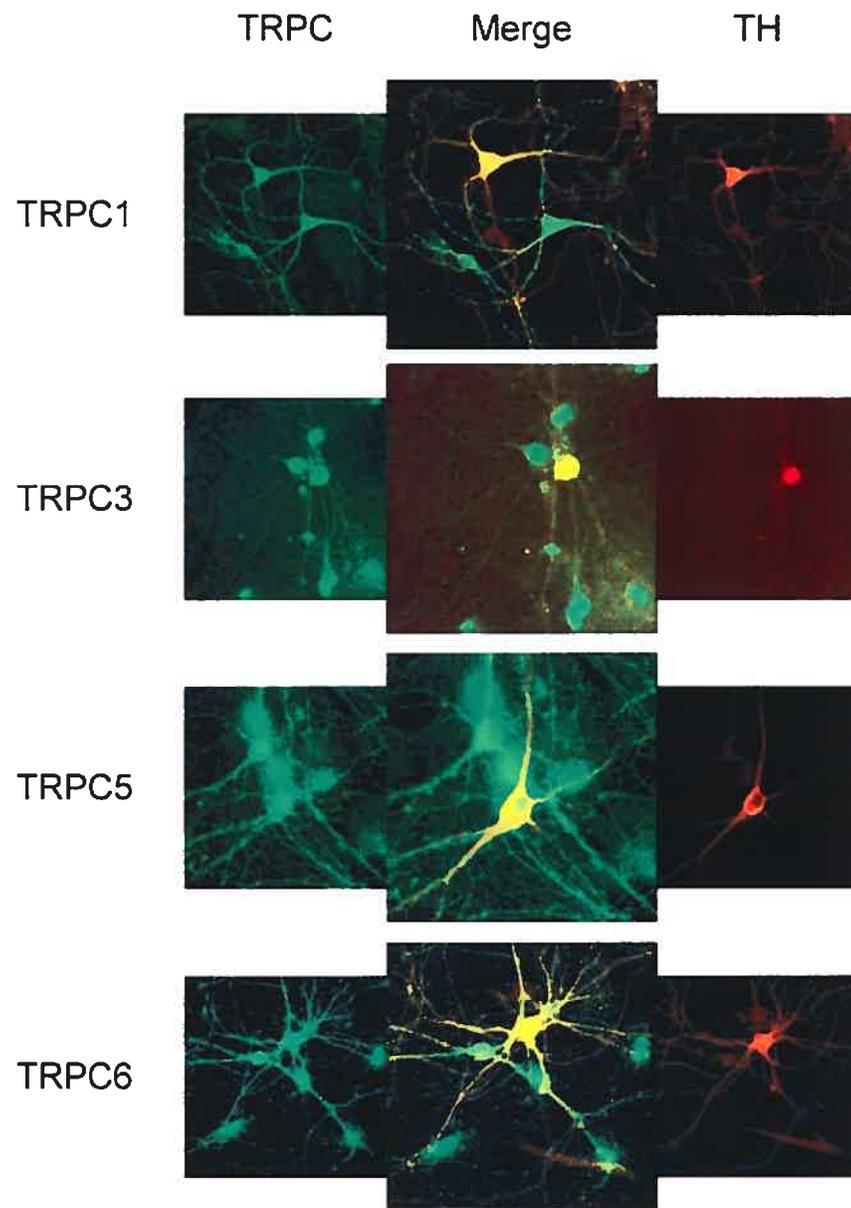


Figure 17 : Les neurones DAergiques expriment les TRPC1, 3, 5 et 6

Photographie de doubles marquages avec des anticorps dirigés contre la TH en rouge et différents TRPC (en vert). La superposition des deux marquages (merge) montre bien la co-expression des marqueurs. Des neurones TH négatifs (généralement GABAergiques) expriment les TRP, ainsi que des cellules gliales, mais dans une moindre mesure.

#### **4. Implications des effets de la clozapine sur les récepteurs GABA<sub>A</sub>**

Les concentrations thérapeutiques efficaces de la clozapine sont relativement élevées (1  $\mu$ M dans le plasma), alors que son affinité pour certains RCPG est de l'ordre du nM (dopaminergiques (D4 surtout), muscariniques, adrénergiques...). Il semble que les cibles les plus évidentes ne soient pas forcément les plus impliquées dans le pouvoir thérapeutique de ce médicament. Par ailleurs, certains effets secondaires dus au traitement, comme la possibilité accrue de développer des crises d'épilepsie, par exemple, pourraient être le résultat d'une inhibition des fonctions GABAergiques. Les neurones GABAergiques sont plus nombreux que n'importe quel autre type neuronal dans le SNC. Une baisse, même faible, des courants GABAergiques, pourrait donc avoir une influence importante sur l'état général d'excitabilité de l'ensemble des neurones de l'encéphale. Il a été rapporté que les crises d'épilepsie détectées chez certains patients étaient souvent dues à une hausse trop rapide des doses de clozapine en début de traitement ou bien chez des patients dont la dose thérapeutique efficace était particulièrement élevée (Hyde et al, 1997; Pacia et al, 1994). Suite à nos résultats, nous concluons qu'il serait important d'être plus vigilant lors des phases critiques du traitement de patients schizophrènes afin de tenir compte de la possibilité d'effets secondaires associés à une désinhibition GABAergique.

Par ailleurs, Squires et Saederup (1997 et 1998) ont démontré que d'autres antipsychotiques ainsi que certains antidépresseurs pouvait avoir un effet antagoniste sur les récepteurs GABA<sub>A</sub>. Cependant les concentrations utilisées en thérapeutique pour ces différentes drogues étant plus faibles, on peut penser que cet effet inhibiteur sera moins important que pour la clozapine.

## 5. Perspectives

Il serait souhaitable de compléter cette étude à l'aide d'autres approches actuellement utilisées au laboratoire, ou qui pourraient être mises en oeuvre grâce à des collaborations.

Il existe déjà des lignées de souris transgéniques qui expriment la "green fluorescent protein" (GFP) sous le contrôle du promoteur de la GAD (l'enzyme de synthèse du GABA). L'emploi de ce type de souris GAD-GFP permettrait de recourir aux tranches de cerveau comme modèle d'étude et d'y détecter les cellules GABAergiques avant de les patcher. De même, les cultures issues de ces souris pourraient être avantageuses en terme de gain de temps et de précision sur le phénotype. En effet, nous pourrions effectuer des marquages immunocytochimiques sur ces préparations et détecter deux autres marqueurs phénotypiques, comme la présence de récepteurs M3 et de TRP, par exemple. Dans le même but de déterminer quelles sont les protéines impliquées dans la régulation muscarinique des neurones GABAergiques (type de récepteurs, transduction et effecteurs), nous pourrions développer certaines approches moléculaires comme la RT-PCR sur cellule unique. Lors de ces expériences, les neurones sont patchés et une analyse sommaire des propriétés électrophysiologiques de la cellule est effectuée. Le cytoplasme de la cellule est ensuite aspiré et les ARNm de la cellule sont transformés en ADNc puis amplifiés et identifiés. Cette technique permet donc de connaître, dans une même cellule, les gènes exprimés par la cellule et de corrélérer cette information aux réponses électrophysiologiques. On peut ainsi définir le type de récepteur muscariniques exprimé par les différentes populations de neurones en culture. Dans de telles expériences, il serait important de détecter la présence de la TH et de la GAD afin de confirmer le phénotype de la cellule étudiée. Finalement, il serait critique de déterminer la présence de l'ARNm des récepteurs muscariniques et des sous-unités TRPC ou éventuellement d'autres membres de la famille TRP.

Il est également possible de tirer parti de notre modèle de culture primaire en effectuant divers traitements basés sur la stratégie anti-sens. Cette stratégie consiste à insérer des oligonucléotides complémentaires des ARNm de gènes ciblés dans les cellules. Cette insertion va entraîner une chute de la production de la protéine visée et donc, à terme, sa disparition (ou une forte baisse de sa concentration). Cette approche permettrait de confirmer la fonction des récepteurs muscarinique ou bien des canaux TRP. En effet, l'expression de telle ou telle protéine n'est pas un gage de son implication dans les processus observés. Toujours dans une stratégie de biologie moléculaire visant à préciser l'implication des différents récepteurs muscariniques de souris M5-KO. Nous avons effectué des cultures primaires de neurones du mésencéphale ventral. Il serait intéressant de tester des souris M3-KO dans les mêmes conditions. Nous pouvons supposer que les neurones issues de ces souris seraient peu ou pas sensible à la muscarine. Si, malgré tout, il y avait un signal calcique dans ces neurones, celui-ci devrait être insensible à l'oxybutyryne (100 nM). Ce type d'expériences fournirait des informations sur l'influence et la physiologie du récepteur M5.

Par ailleurs, nous avons vu que le taux de décharge des neurones GABAergiques est dépendant de la  $[Ca^{2+}]_i$  et que la muscarine augmente cette concentration intracellulaire. Il serait intéressant de coupler les techniques d'imagerie calcique avec des enregistrements électrophysiologiques afin de confirmer l'interrelation entre les deux types de phénomènes. Les mécanismes ultimes d'activation des canaux qui sous-tendent l'influx de  $Ca^{2+}$  n'ont pas été déterminés. Il n'existe pas actuellement d'agents pharmacologiques qui affectent sélectivement les canaux TRP. Par contre, le DAG semble être un activateur direct de ce type de canaux. Des expériences d'imagerie avec le OAG (un analogue soluble du DAG) et la muscarine apporteraient un argument supplémentaire à l'implication des canaux TRP. L'occlusion de l'effet du PMA par le SKF-96365 serait également un résultat en faveur des TRP. Une autre donnée de notre étude concerne l'implication possible de la PKC dans l'influx calcique observé chez les neurones GABAergiques et DAergiques. Les canaux TRPC peuvent être activés directement par le DAG ou bien indirectement par l'intermédiaire de la PKC. Une série d'expériences avec un inhibiteur de PKC

(bisindolylmaleimide) et un analogue du DAG pourrait donner une indication sur des mécanismes impliqués chez ces deux types cellulaires. Toute information au sujet d'une différence entre les modulations des neurones GABAergiques et DAergiques du mésencéphale pourrait être d'intérêt potentiellement thérapeutique.

Une des limites de notre modèle de culture primaire provient de la dissociation des cellules et de la perte des afférences issues d'autres régions du cerveau. Les afférences cholinergiques du tronc cérébral ou bien GABAergiques et glutamatergiques du cortex et du striatum sont interrompues. L'utilisation de tranches de cerveau du mésencéphale ventral permettrait de stimuler localement des fibres qui restent fonctionnelles et d'évaluer les effets induits par cette stimulation. La difficulté de ce type d'expériences tient à l'absence de faisceaux de fibres bien délimité pour chacune des afférences pré-citées. Il faut donc compter sur la chance d'enregistrer un neurone GABAergique et que l'électrode de stimulation passe à proximité d'une fibre d'intérêt. L'utilisation des souris GAD-GFP serait ici encore d'une aide précieuse. L'enregistrement en tranches provenant de ces souris permettrait de prendre en compte les réseaux locaux, tout en examinant les effets de l'ACh sur les neurones GABAergiques et DAergiques. Comme on l'a vu précédemment l'effet global de l'ACh sur les neurones DAergiques est excitateur, alors que les interneurones GABAergiques également stimulés devraient avoir un effet inhibiteur.

A long terme, une meilleure connaissance des voies modulatrices des neurones DAergiques a un potentiel thérapeutique important. Les neurones GABAergiques du mésencéphale sont dans une position privilégiée dans les circuits innervant les neurones DAergiques. Il semble logique de continuer à explorer cette avenue afin de développer de nouvelles cibles pour le traitement de la maladie de Parkinson ou de la schizophrénie.

## **Conclusion**

L'implication des neurones GABAergiques du mésencéphale ventral dans l'étiologie de pathologies jusqu'ici réservée aux seuls neurones DAergiques semble de plus en plus évidente. Bien que minoritaire, le pouvoir régulateur de ces neurones est certain et justifie l'obtention d'un supplément d'information sur leurs propriétés intrinsèques. Les résultats présentés dans la présente thèse s'intègrent dans cette perspective.

Nous avons démontré que l'activation des récepteurs cholinergiques, et particulièrement celle du récepteur muscarinique M3, a un effet excitateur sur les neurones GABAergiques du mésencéphale ventral en culture primaire. Cet effet dépend d'un influx de  $\text{Ca}^{2+}$  à partir du milieu extracellulaire et passe par des canaux activés par ces récepteurs. Il est fort probable qu'il s'agisse de canaux appartenant à la famille des TRPC, même si la preuve définitive de leur identité n'a pu être apportée. Nous avons également démontré que la clozapine a un effet inhibiteur sur les courants synaptiques GABAergiques.

Les projections cholinergiques du tronc cérébral innervent les neurones des noyaux DAergiques. Cette innervation induit une stimulation des interneurones GABAergiques qui vont inhiber les neurones DAergiques. En parallèle, ces derniers seront aussi stimulés par les afférences cholinergiques. Il en résulte un équilibre entre excitation et inhibition qui va réguler le taux de décharge des neurones DAergiques et la concentration de dopamine dans les zones cibles. L'influence pathophysiologique de ces régulations est au cœur de certaines stratégies thérapeutiques contre la schizophrénie et la maladie de Parkinson.

## **Bibliographie**

Les références marquées par le signe \* ne sont pas répertoriées sur le serveur Pub-Med.

Abi-Dargham A, Rodenhiser J, Printz D, Zea-Ponce Y, Gil R, Kegeles LS, Weiss R, Cooper TB, Mann JJ, Van Heertum RL, Gorman JM, Laruelle M (2000) Increased baseline occupancy of D2 receptors by dopamine in schizophrenia.

Proc Natl Acad Sci U S A 97:8104-8109.

Alkondon M, Pereira EF, Barbosa CT, Albuquerque EX (1997) Neuronal nicotinic acetylcholine receptor activation modulates gamma-aminobutyric acid release from CA1 neurons of rat hippocampal slices. J Pharmacol Exp Ther 283:1396-1411.

American Psychiatric Association. DSM IV, Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux. 4<sup>e</sup> édition, Masson, Paris, pp 321-341, 1996. \*

Baldessarini RJ, Centorrino F, Flood JG, Volpicelli SA, Huston-Lyons D, Cohen BM (1993) Tissue concentrations of clozapine and its metabolites in the rat. Neuropsychopharmacology 9:117-124.

Bayer VE, Pickel VM (1991) GABA-labeled terminals form proportionally more synapses with dopaminergic neurons containing low densities of tyrosine hydroxylase-immunoreactivity in rat ventral tegmental area. Brain Res 559:44-55.

Bear MF, Connors BW, Paradiso MA : Neurosciences - A la découverte du cerveau, Traduction et adaptation française André Nieoullon, Editions Pradel, 1997. \*

- Beckstead RM (1979) An autoradiographic examination of corticocortical and subcortical projections of the mediodorsal-projection (prefrontal) cortex in the rat. *J Comp Neurol* 184:43-62.
- Bergevin A, Girardot D, Bourque MJ, Trudeau LE (2002) Presynaptic mu-opioid receptors regulate a late step of the secretory process in rat ventral tegmental area GABAergic neurons. *Neuropharmacology* 42:1065-1078.
- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD (2000) The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:11-21.
- Björklund A and Lindvall O : Dopamine-containing system in the CNS. Dans: Björklund A, Hökfelt T, éditeurs. *Handbook of Chemical Neuroanatomy, Vol. 2: Classical Transmitters in the CNS, Part I*. New York: Elsevier. 55-122, 1984. \*
- Blaha CD, Allen LF, Das S, Inglis WL, Latimer MP, Vincent SR, Winn P (1996) Modulation of dopamine efflux in the nucleus accumbens after cholinergic stimulation of the ventral tegmental area in intact, pedunculopontine tegmental nucleus-lesioned, and laterodorsal tegmental nucleus-lesioned rats. *J Neurosci* 16:714-722.
- Bleuler E (1911) *Dementia Praecox or the Group of Schizophrenias*. New York: International Universities Press, 1950. \*
- Bolden C, Cusack B, Richelson E (1992) Antagonism by antimuscarinic and neuroleptic compounds at the five cloned human muscarinic cholinergic receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. *J Pharmacol Exp Ther* 260:576-580.
- Bonci A, Williams JT (1997) Increased probability of GABA release during withdrawal from morphine. *J Neurosci* 17:796-803.
- Bradley KN (2000) Muscarinic toxins from the green mamba. *Pharmacol Ther* 85:87-109.
- Brownlee C (2000) Cellular Ca<sup>2+</sup> imaging: so, what's new? *Trends Cell Biol* 10:451-457.
- Brunello N, Masotto C, Steardo L, Markstein R, Racagni G (1995) New insights into the biology of schizophrenia through the mechanism of action of clozapine. *Neuropsychopharmacology* 13:177-213.

- Buchhalter JR and Dichter MA. Neurons. in Boulton AA, Baker GB, Walz W, éditeurs. Practical cell culture techniques. New Jersey: The Humana Press Inc. 241-264, 1992. \*
- Bymaster FP, Shannon HE, Rasmussen K, Delapp NW, Mitch CH, Ward JS, Calligaro DO, Ludvigsen TS, Sheardown MJ, Olesen PH, Swedberg MD, Sauerberg P, Fink-Jensen A (1998) Unexpected antipsychotic-like activity with the muscarinic receptor ligand (5R,6R)6-(3-propylthio-1,2,5-thiadiazol-4-yl)-1-azabicyclo[3.2.1]octane. *Eur J Pharmacol* 356:109-119.
- Bymaster FP, Shannon HE, Rasmussen K, Delapp NW, Ward JS, Calligaro DO, Mitch CH, Whitesitt C, Ludvigsen TS, Sheardown M, Swedberg M, Rasmussen T, Olesen PH, Jeppesen L, Sauerberg P, Fink-Jensen A (1999) Potential role of muscarinic receptors in schizophrenia. *Life Sci* 64:527-534.
- Calabresi P, Lacey MG, North RA (1989) Nicotinic excitation of rat ventral tegmental neurones in vitro studied by intracellular recording. *Br J Pharmacol* 98:135-140.
- Cameron DL, Williams JT (1993) Dopamine D1 receptors facilitate transmitter release. *Nature* 366:344-347.
- Cameron DL, Williams JT (1994) Cocaine inhibits GABA release in the VTA through endogenous 5-HT. *J Neurosci* 14:6763-6767.
- Cameron DL, Williams JT (1995) Opposing roles for dopamine and serotonin at presynaptic receptors in the ventral tegmental area. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 22:841-845.
- Cannon TD, Rosso IM, Hollister JM, Bearden CE, Sanchez LE, Hadley T (2000) A prospective cohort study of genetic and perinatal influences in the etiology of schizophrenia. *Schizophr Bull* 26:351-366.
- Cardozo DL (1993) Midbrain dopaminergic neurons from postnatal rat in long-term primary culture. *Neuroscience* 56:409-421.
- Carlsson A and Lindqvist M (1963) Effect of chlorpromazine or haloperidol on formation of 3H-methoxytyramine and normetanephrine in mouse brain. *Acta Pharmacol Toxicol* ; 20 : 140-144. \*

- Carr DB, Sesack SR (2000) GABA-containing neurons in the rat ventral tegmental area project to the prefrontal cortex. *Synapse* 38:114-123.
- Caulfield MP, Birdsall NJ (1998) International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev* 50:279-290.
- Changeux JP, Bertrand D, Corringer PJ, Dehaene S, Edelstein S, Lena C, Le Novère N, Marubio L, Picciotto M, Zoli M (1998) Brain nicotinic receptors: structure and regulation, role in learning and reinforcement. *Brain Res Brain Res Rev* 26:198-216.
- Charpentier E, Barneoud P, Moser P, Besnard F, Sgard F (1998) Nicotinic acetylcholine subunit mRNA expression in dopaminergic neurons of the rat substantia nigra and ventral tegmental area. *NeuroReport* 9:3097-3101.
- Chiodo LA, Bunney BS (1983) Typical and atypical neuroleptics: differential effects of chronic administration on the activity of A9 and A10 midbrain dopaminergic neurons. *J Neurosci* 3:1607-1619.
- Christie MJ, Bridge S, James LB, Beart PM (1985) Excitotoxin lesions suggest an aspartatergic projection from rat medial prefrontal cortex to ventral tegmental area. *Brain Res* 333:169-172.
- Churchill L, Dilts RP, Kalivas PW (1992) Autoradiographic localization of gamma-aminobutyric acidA receptors within the ventral tegmental area. *Neurochem Res* 17:101-106.
- Clapham DE, Runnels LW, Strubing C (2001) The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci* 2:387-396.
- Crocker AD (1994) Dopamine - mechanisms of action. *Aust Prescr* ; 17 : 17-20 \*
- Dahlström A and Fuxe K (1964) Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. *Acta Physiol Scand* 62 (Suppl. 232): 1-55. \*
- Dale HH (1914) The action of certain esters and ethers of choline, and their relation to muscarine. *J Pharmacol Exp Ther* ; 6 : 147-190. \*
- Dong GZ, Kameyama K, Rincken A, Haga T (1995) Ligand binding properties of muscarinic acetylcholine receptor subtypes (m1-m5) expressed in baculovirus-infected insect cells. *J Pharmacol Exp Ther* 274:378-384.

- Eglen RM, Choppin A, Dillon MP, Hegde S (1999) Muscarinic receptor ligands and their therapeutic potential. *Curr Opin Chem Biol* 3:426-432.
- Fonnum F, Walaas I, Iversen E (1977) Localization of GABAergic, cholinergic and aminergic structures in the mesolimbic system. *J Neurochem* 29:221-230.
- Forster GL, Blaha CD (2000) Laterodorsal tegmental stimulation elicits dopamine efflux in the rat nucleus accumbens by activation of acetylcholine and glutamate receptors in the ventral tegmental area. *Eur J Neurosci* 12:3596-3604.
- Forster GL, Blaha CD (2003) Pedunculopontine tegmental stimulation evokes striatal dopamine efflux by activation of acetylcholine and glutamate receptors in the midbrain and pons of the rat. *Eur J Neurosci* 17:751-762.
- Forster GL, Yeomans JS, Takeuchi J, Blaha CD (2002) M5 muscarinic receptors are required for prolonged accumbal dopamine release after electrical stimulation of the pons in mice. *J Neurosci* 22:RC190
- Futami T, Takakusaki K, Kitai ST (1995) Glutamatergic and cholinergic inputs from the pedunculopontine tegmental nucleus to dopamine neurons in the substantia nigra pars compacta. *Neurosci Res* 21:331-342.
- Fuxe K, Hokfelt T, Ljungdahl A, Agnati L, Johansson O, Perez dlM (1975) Evidence for an inhibitory gabergeric control of the meso-limbic dopamine neurons: possibility of improving treatment of schizophrenia by combined treatment with neuroleptics and gabergeric drugs. *Med Biol* 53:177-183.
- Garcia-Rill E, Biedermann JA, Chambers T, Skinner RD, Mrak RE, Husain M, Karson CN (1995) Mesopontine neurons in schizophrenia. *Neuroscience* 66:321-335.
- Garzon M, Vaughan RA, Uhl GR, Kuhar MJ, Pickel VM (1999) Cholinergic axon terminals in the ventral tegmental area target a subpopulation of neurons expressing low levels of the dopamine transporter. *J Comp Neurol* 410:197-210.
- Geddes JR, Verdoux H, Takei N, Lawrie SM, Bovet P, Eagles JM, Heun R, McCreadie RG, McNeil TF, O'Callaghan E, Stober G, Willinger U, Murray RM (1999) Schizophrenia and complications of pregnancy and labor: an individual patient data meta-analysis. *Schizophr Bull* 25:413-423.

- Gibb AJ and Edwards FA : Patch clamp recordings from cells in sliced tissues. Dans: Ogden D, éditeur. *Microelectrode Techniques*, 2nd edition. London: The Company of Biologists Limited. 255-274, 1994. \*
- Gonzalez-Hernandez T, Rodriguez M (2000) Compartmental organization and chemical profile of dopaminergic and GABAergic neurons in the substantia nigra of the rat. *J Comp Neurol* 421:107-135.
- Grace AA (1991) Phasic versus tonic dopamine release and the modulation of dopamine system responsivity: a hypothesis for the etiology of schizophrenia. *Neuroscience* 41:1-24.
- Grace AA and Bunney BS. (1979) Paradoxical GABA excitation of nigral dopaminergic cells: indirect mediation through reticulata inhibitory neurons. *Eur J Pharmacol.* 59(3-4):211-8.
- Grace AA and Bunney BS (1985) Opposing effects of striatonigral feedback pathways on midbrain dopamine cell activity. *Brain Res.* 333(2):271-84.
- Grace AA, Onn SP (1989) Morphology and electrophysiological properties of immunocytochemically identified rat dopamine neurons recorded in vitro. *J Neurosci* 9:3463-3481.
- Grace AA, Bunney BS, Moore H, Todd CL (1997) Dopamine-cell depolarization block as a model for the therapeutic actions of antipsychotic drugs. *Trends Neurosci* 20:31-37.
- Gray EG and Whittaker VP (1960) The isolation of synaptic vesicles from the central nervous system. *J Physiol* 153: 35-37. \*
- Grenhoff J, Nisell M, Ferre S, Aston-Jones G, Svensson TH (1993) Noradrenergic modulation of midbrain dopamine cell firing elicited by stimulation of the locus coeruleus in the rat. *J Neural Transm Gen Sect* 93:11-25.
- Griffon N, Crocq MA, Pilon C, Martres MP, Mayerova A, Uyanik G, Burgert E, Duval F, Macher JP, Javoy-Agid F, Tamminga CA, Schwartz JC, Sokoloff P (1996) Dopamine D3 receptor gene: organization, transcript variants, and polymorphism associated with schizophrenia. *Am J Med Genet* 67:63-70.

- Grillner P, Berretta N, Bernardi G, Svensson TH, Mercuri NB (2000) Muscarinic receptors depress GABAergic synaptic transmission in rat midbrain dopamine neurons. *Neuroscience* 96:299-307.
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260:3440-3450.
- Guerineau NC, Bossu JL, Gahwiler BH, Gerber U (1995) Activation of a nonselective cationic conductance by metabotropic glutamatergic and muscarinic agonists in CA3 pyramidal neurons of the rat hippocampus. *J Neurosci* 15:4395-4407.
- Gysling K, Wang RY (1983) Morphine-induced activation of A10 dopamine neurons in the rat. *Brain Res* 277:119-127.
- Hand TH, Hu XT, Wang RY (1987) Differential effects of acute clozapine and haloperidol on the activity of ventral tegmental (A10) and nigrostriatal (A9) dopamine neurons. *Brain Res* 415:257-269.
- Hille B: *Ionic Channels of Excitable Membranes*, 2nd edition. Massachusetts: Sinauer Associates Inc. 1992. \*
- Hofmann T, Schaefer M, Schultz G, Gudermann T (2000) Transient receptor potential channels as molecular substrates of receptor-mediated cation entry. *J Mol Med* 78:14-25.
- Hoth M, Penner R (1992) Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature* 355:353-356.
- Huttenlocher PR (1979) Synaptic density in human frontal cortex: Developmental changes and effects of aging. *Brain Res.* 163:195-205.
- Huttenlocher PR, Dabholkar AS (1997) Regional differences in synaptogenesis in human cerebral cortex. *J Comp Neurol.* 387(2):167-78.
- Huttenlocher PR, C. de Courten, L.G. Garey, and H. Van der Loos (1982) Synaptogenesis in human visual cortex: Evidence for synapse elimination during normal development. *Neurosci. Lett.* 33:247-252.
- Hyde TM and Weinberger DR 1997. Seizures and schizophrenia. *Schizophr Bull* 23 , 611-622.

- Johnson SW, North RA (1992a) Two types of neurone in the rat ventral tegmental area and their synaptic inputs. *J Physiol (Lond)* 450:455-468.
- Johnson SW, North RA (1992b) Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *J Neurosci* 12:483-488.
- Jomphe C, Tibéri M, Congar P, Michel FJ and Trudeau L-É : Differential localization of D2S and D2L dopamine receptors in transfected cultured neurons. Soc Neurosci Abstr 31th Ann Meet, San Diego, November 2001. \*
- Kalivas PW (1993) Neurotransmitter regulation of dopamine neurons in the ventral tegmental area. *Brain Res Brain Res Rev* 18:75-113.
- Kapur S, Seeman P (2001) Does fast dissociation from the dopamine D2 receptor explain the action of atypical antipsychotics? : A new hypothesis. *Am J Psychiatry* 158:360-369.
- Kenakin TP (1984) The classification of drugs and drug receptors in isolated tissues. *Pharmacol Rev* 36:165-222.
- Kiselyov K, Muallem S (1999) Fatty acids, diacylglycerol, Ins(1,4,5)P3 receptors and Ca<sup>2+</sup> influx. *Trends Neurosci* 22:334-337.
- Klink R, d'Exaerde AA, Zoli M, Changeux JP (2001) Molecular and physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors in the midbrain dopaminergic nuclei. *J Neurosci* 21:1452-1463.
- Klitenick MA, DeWitte P, Kalivas PW (1992) Regulation of somatodendritic dopamine release in the ventral tegmental area by opioids and GABA: an in vivo microdialysis study. *J Neurosci* 12:2623-2632.
- Koob GF, Le Moal M (1997) Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science* 278:52-58.
- Kuhar MJ, Couceyro PR, Lambert PD Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular And Medical Aspects, 6<sup>th</sup> Ed., edited by G.J. Siegel et al Published by Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1999. \*
- Lacey MG (1993) Neurotransmitter receptors and ionic conductances regulating the activity of neurones in substantia nigra pars compacta and ventral tegmental area. *Prog Brain Res* 99:251-276.

- Lacey MG, Mercuri NB, North RA (1989) Two cell types in rat substantia nigra zona compacta distinguished by membrane properties and the actions of dopamine and opioids. *J Neurosci* 9:1233-1241.
- Lacey MG, Calabresi P, North RA (1990) Muscarine depolarizes rat substantia nigra zona compacta and ventral tegmental neurons in vitro through M1-like receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 253:395-400.
- Laruelle M, Abi-Dargham A, Gil R, Kegeles L, Innis R (1999) Increased dopamine transmission in schizophrenia: relationship to illness phases. *Biol Psychiatry* 46:56-72.
- Laviolette SR, Van Der Kooy D (2001) GABA(A) receptors in the ventral tegmental area control bidirectional reward signalling between dopaminergic and non-dopaminergic neural motivational systems. *Eur J Neurosci* 13:1009-1015.
- Le Novere N, Zoli M, Changeux JP (1996) Neuronal nicotinic receptor alpha 6 subunit mRNA is selectively concentrated in catecholaminergic nuclei of the rat brain. *Eur J Neurosci* 8:2428-2439.
- Lewis DA, Lieberman JA (2000) Catching up on schizophrenia: natural history and neurobiology. *Neuron* 28:325-334.
- Lindvall O, Björklund A, Moore RY, Stenevi U (1974) Mesencephalic dopamine neurons projecting to neocortex. *Brain Res* 81:325-331.
- Lu Y, Grady S, Marks MJ, Picciotto M, Changeux JP, Collins AC (1998) Pharmacological characterization of nicotinic receptor-stimulated GABA release from mouse brain synaptosomes. *J Pharmacol Exp Ther* 287:648-657.
- Mailly P, Charpier S, Menetrey A, Deniau JM (2003) Three-dimensional organization of the recurrent axon collateral network of the substantia nigra pars reticulata neurons in the rat. *J Neurosci* 23:5247-5257.
- Malenka RC, Nicoll RA (1997) Silent synapses speak up. *Neuron* 19:473-476.
- Marrosu F, Portas C, Mascia MS, Casu MA, Fa M, Giagheddu M, Imperato A, Gessa GL (1995) Microdialysis measurement of cortical and hippocampal acetylcholine release during sleep-wake cycle in freely moving cats. *Brain Res* 671:329-332.

- Matsuda Y, Fujimura K (1992) Action of habenular efferents on ventral tegmental area neurons studied in vitro. *Brain Res Bull* 28:743-749.
- McDonald C, Murray RM (2000) Early and late environmental risk factors for schizophrenia. *Brain Res Brain Res Rev* 31:130-137.
- McNamara JO (1984) Kindling: an animal model of complex partial epilepsy. *Ann Neurol.* 16 Suppl:S72-6.
- Meltzer HY and Deutch AY *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular And Medical Aspects*, 6<sup>th</sup> Ed., edited by G.J. Siegel et al Published by Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1999. \*
- Mereu G, Costa E, Armstrong DM, Vicini S (1991) Glutamate receptor subtypes mediate excitatory synaptic currents of dopamine neurons in midbrain slices. *J Neurosci* 11:1359-1366.
- Mesulam MM Central cholinergic pathways: neuroanatomy and some behavioral implications. In: Avoli M, Reader TA, Dykes RW, Gloor P, eds. *Neurotransmitters and Cortical Function*. New York: Plenum Press ; 237-260; 1988. \*
- Mesulam MM, Mufson EJ, Wainer BH, Levey AI (1983) Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6). *Neuroscience* 10:1185-1201.
- Miles R, Poncer JC (1996) Paired recordings from neurones. *Curr Opin Neurobiol* 6:387-394.
- Miller AD, Forster GL, Metcalf KM, Blaha CD (2002) Excitotoxic lesions of the pedunculopontine differentially mediate morphine- and d-amphetamine-evoked striatal dopamine efflux and behaviors. *Neuroscience* 111:351-362.
- Minke B, Cook B (2002) TRP channel proteins and signal transduction. *Physiol Rev* 82:429-472.
- Moneer Z, Taylor CW (2002) Reciprocal regulation of capacitative and non-capacitative Ca<sup>2+</sup> entry in A7r5 vascular smooth muscle cells: only the latter operates during receptor activation. *Biochem J* 362:13-21.
- Monk CS, Webb SJ, Nelson CA. (2001) Prenatal neurobiological development: molecular mechanisms and anatomical change. *Dev Neuropsychol.*;19(2):211-36.

- Montell C (1999) Visual transduction in *Drosophila*. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15:231-268.
- Montell C, Rubin GM (1989) Molecular characterization of the *Drosophila* *trp* locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* 2:1313-1323.
- Montell C, Birnbaumer L, Flockerzi V (2002) The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell* 108:595-598.
- Moriya H, Takagi Y, Nakanishi T, Hayashi M, Tani T, Hirotsu I (1999) Affinity profiles of various muscarinic antagonists for cloned human muscarinic acetylcholine receptor (mAChR) subtypes and mAChRs in rat heart and submandibular gland. *Life Sci* 64:2351-2358.
- Mugnaini E, Oertel WH: An atlas of the distribution of GABAergic neurons and terminals in the rat CNS as revealed by GAD immunohistochemistry. Dans: Björklund A, Hokfelt T, éditeurs. *Handbook of Chemical Neuroanatomy*, vol. 4: GABA and Neuropeptides in the CNS, Part I. New York: Elsevier. 436-608, 1985. \*
- Nader K, Bechara A, Van Der Kooy D (1997) Neurobiological constraints on behavioral models of motivation. *Annu Rev Psychol* 48:85-114.
- Nagai T, McGeer PL, McGeer EG (1983) Distribution of GABA-T-intensive neurons in the rat forebrain and midbrain. *J Comp Neurol* 218:220-238.
- Neher E, Sakmann B (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260:799-802.
- Oakman SA, Faris PL, Kerr PE, Cozzari C, Hartman BK (1995) Distribution of pontomesencephalic cholinergic neurons projecting to substantia nigra differs significantly from those projecting to ventral tegmental area. *J Neurosci* 15:5859-5869.
- Okada R, Moshe SL, Wong BY, Sperber EF, Zhao DY. (1986) Age-related substantia nigra-mediated seizure facilitation. *Exp Neurol*. 93(1):180-7.
- Olds ME and Olds J (1963) Approach-avoidance analysis of rat diencephalon. *J Comp Neurol* 120: 259-295. \*
- Pacia, S.V. and Devinsky, O. 1994. Clozapine-related seizures: experience with 5,629 patients. *Neurology* 44 , 2247-2249.

- Parent A, Sato F, Wu Y, Gauthier J, Lévesque M, Parent M (2000) Organization of the basal ganglia: the importance of axonal collateralization. *Trends Neurosci* 23:S20-S27
- Pearlson GD (2000) Neurobiology of schizophrenia. *Ann Neurol* 48:556-566.
- Perry E, Walker M, Grace J, Perry R (1999) Acetylcholine in mind: a neurotransmitter correlate of consciousness? *Trends Neurosci* 22:273-280.
- Phillipson OT (1979) The cytoarchitecture of the interfascicular nucleus and ventral tegmental area of Tsai in the rat. *J Comp Neurol* 187:85-98.
- Putney JWJ (1986) A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* 7:1-12.
- Raiteri M, Marchi M, Paudice P, Pittaluga A (1990) Muscarinic receptors mediating inhibition of gamma-aminobutyric acid release in rat corpus striatum and their pharmacological characterization. *J Pharmacol Exp Ther* 254:496-501.
- Rasmussen T, Sauerberg P, Nielsen EB, Swedberg MD, Thomsen C, Sheardown MJ, Jeppesen L, Calligaro DO, Delapp NW, Whitesitt C, Ward JS, Shannon HE, Bymaster FP, Fink-Jensen A (2000) Muscarinic receptor agonists decrease cocaine self-administration rates in drug-naive mice. *Eur J Pharmacol* 402:241-246.
- Rasmusson DD, Clow K, Szerb JC (1994) Modification of neocortical acetylcholine release and electroencephalogram desynchronization due to brainstem stimulation by drugs applied to the basal forebrain. *Neuroscience* 60:665-677.
- Richard D et Orsal D: *Neurophysiologie Tome 2*. Edition Nathan 1994. \*
- Rizzuto R (2001) Intracellular Ca<sup>2+</sup> pools in neuronal signalling. *Curr Opin Neurobiol* 11:306-311.
- Rolls ET (2000) *Precis of the brain and emotion*. *Behav Brain Sci* 23:177-191.
- Rosado JA, Sage SO (2000) Protein kinase C activates non-capacitative calcium entry in human platelets. *J Physiol* 529 Pt 1:159-169.
- Runnels LW, Yue L, Clapham DE (2002) The TRPM7 channel is inactivated by PIP(2) hydrolysis. *Nat Cell Biol* 4:329-336.
- Seeman P, Lee T, Chau-Wong M, Wong K (1976) Antipsychotic drug doses and neuroleptic/dopamine receptors. *Nature* 261:717-719.

- Shahar A, de Vellis J, Vernadakis A, Haber B : éditeurs. A Dissection And Tissue Culture Manual Of The Nervous System. New York: Alan R. Liss. 1989. \*
- Shalinsky MH, Magistretti J, Ma L, Alonso AA (2002) Muscarinic activation of a cation current and associated current noise in entorhinal-cortex layer-II neurons. *J Neurophysiol* 88:1197-1211.
- Shannon HE, Hart JC, Bymaster FP, Calligaro DO, Delapp NW, Mitch CH, Ward JS, Fink-Jensen A, Sauerberg P, Jeppesen L, Sheardown MJ, Swedberg MD (1999) Muscarinic receptor agonists, like dopamine receptor antagonist antipsychotics, inhibit conditioned avoidance response in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 290:901-907.
- Smith Y, Bolam JP (1990) The output neurones and the dopaminergic neurones of the substantia nigra receive a GABA-containing input from the globus pallidus in the rat. *J Comp Neurol* 296:47-64.
- Squires RF and Saederup E (1997). Clozapine and some other antipsychotic drugs may preferentially block the same subset of GABA<sub>A</sub> receptors. *Neurochem Res* 22 , 151-162.
- Squires RF and Saederup E (1998). Clozapine and several other antipsychotic/antidepressant drugs preferentially block the same 'core' fraction of GABA<sub>A</sub> receptors. *Neurochem Res* 23 , 1283-1290.
- Steffensen SC, Svingos AL, Pickel VM, Henriksen SJ (1998) Electrophysiological characterization of GABAergic neurons in the ventral tegmental area. *J Neurosci* 18:8003-8015.
- St-Gelais F, Legault M, Rompré PP and Trudeau L-E : Role of calcium in neurotensin-evoked enhancement in firing in mesencephalic dopamine neurons. (Soumis) \*
- Sugita S, Johnson SW, North RA (1992) Synaptic inputs to GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptors originate from discrete afferent neurons. *Neurosci Lett* 134:207-211.
- Sulzer D, Joyce MP, Lin L, Geldwert D, Haber SN, Hattori T, Rayport S (1998) Dopamine neurons make glutamatergic synapses in vitro. *J Neurosci* 18:4588-4602.
- Suter KJ, Smith BN, Dudek FE (1999) Electrophysiological recording from brain slices. *Methods* 18:86-90.

- Takeuchi J, Fulton J, Jia Z, Abramov-Newerly W, Jamot L, Sud M, Coward D, Ralph M, Roder J, Yeomans J (2002) Increased drinking in mutant mice with truncated M5 muscarinic receptor genes. *Pharmacol Biochem Behav* 72:117-123.
- Tandon R (1999) Cholinergic aspects of schizophrenia. *Br J Psychiatry Suppl* 7-11.
- Tandon R, Greden JF (1989) Cholinergic hyperactivity and negative schizophrenic symptoms. A model of cholinergic/dopaminergic interactions in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 46:745-753.
- Tandon R, Shipley JE, Greden JF, Mann NA, Eisner WH, Goodson JA (1991) Muscarinic cholinergic hyperactivity in schizophrenia. Relationship to positive and negative symptoms. *Schizophr Res* 4:23-30.
- Taylor CW (2002) Controlling calcium entry. *Cell* 111:767-769.
- Tsai C (1925) The optic tracts and centers of the opossum, *didelphis virginiana*. *J Comp Neurol* 39: 173-216. \*
- Tsuang MT and Owen MJ: *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress*. Edited by KL. Davis, D Charney, JT. Coyle, and C Nemeroff. American College of Neuropsychopharmacology 2002.\*
- Ungerstedt U (1971) Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain. *Acta Physiol Scand Suppl* 367:1-48.
- Van Bockstaele EJ, Pickel VM (1995) GABA-containing neurons in the ventral tegmental area project to the nucleus accumbens in rat brain. *Brain Res* 682:215-221.
- Venkatachalam K, van Rossum DB, Patterson RL, Ma HT, Gill DL (2002) The cellular and molecular basis of store-operated calcium entry. *Nat Cell Biol* 4:E263-E272
- Vertes RP (1992) PHA-L analysis of projections from the supramammillary nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 326:595-622.
- Walaas I, Fonnum F (1980) Biochemical evidence for gamma-aminobutyrate containing fibres from the nucleus accumbens to the substantia nigra and ventral tegmental area in the rat. *Neuroscience* 5:63-72.
- Wallace DM, Magnuson DJ, Gray TS (1989) The amygdalo-brainstem pathway: selective innervation of dopaminergic, noradrenergic and adrenergic cells in the rat. *Neurosci Lett* 97:252-258.

- Weinberger DR (1987) Implications of normal brain development for the pathogenesis of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 44:660-669.
- Weinberger DR (1995) From neuropathology to neurodevelopment. *Lancet* 346:552-557.
- Weiner DM, Levey AI, Brann MR (1990) Expression of muscarinic acetylcholine and dopamine receptor mRNAs in rat basal ganglia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:7050-7054.
- Westerink BH, Kwint HF, deVries JB (1996) The pharmacology of mesolimbic dopamine neurons: a dual-probe microdialysis study in the ventral tegmental area and nucleus accumbens of the rat brain. *J Neurosci* 16:2605-2611.
- Westerink BH, Enrico P, Feimann J, De Vries JB (1998) The pharmacology of mesocortical dopamine neurons: a dual-probe microdialysis study in the ventral tegmental area and prefrontal cortex of the rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* 285:143-154.
- Whittaker VP (1968) The morphology of fractions of rat forebrain synaptosomes separated on continuous sucrose density gradients. *Biochem J* 106:412-417.
- Wise RA (1996) Neurobiology of addiction. *Curr Opin Neurobiol* 6:243-251.
- Wolf P, Olpe HR, Avrith D, Haas HL (1978) GABAergic inhibition of neurons in the ventral tegmental area. *Experientia* 34:73-74.
- Wu YN, Mercuri NB, Johnson SW (1995) Presynaptic inhibition of gamma-aminobutyric acidB-mediated synaptic current by adenosine recorded in vitro in midbrain dopamine neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 273:576-581.
- Yamamoto C, McIlwain H (1966) Electrical activities in thin sections from the mammalian brain maintained in chemically-defined media in vitro. *J Neurochem* 13:1333-1343.
- Yamashita T, Kokubun S (1999) Nonselective cationic currents activated by acetylcholine in swine tracheal smooth muscle cells. *Can J Physiol Pharmacol* 77:796-805.
- Yeomans JS (1995) Role of tegmental cholinergic neurons in dopaminergic activation, antimuscarinic psychosis and schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 12:3-16.
- Yeomans J, Baptista M (1997) Both nicotinic and muscarinic receptors in ventral tegmental area contribute to brain-stimulation reward. *Pharmacol Biochem Behav* 57:915-921.

- Yeomans JS, Takeuchi J, Baptista M, Flynn DD, Lepik K, Nobrega J, Fulton J, Ralph MR (2000) Brain-stimulation reward thresholds raised by an antisense oligonucleotide for the M5 muscarinic receptor infused near dopamine cells. *J Neurosci* 20:8861-8867.
- Yim CY, Mogenson GJ (1980) Effect of picrotoxin and nipecotic acid on inhibitory response of dopaminergic neurons in the ventral tegmental area to stimulation of the nucleus accumbens. *Brain Res* 199:466-473.
- Yung WH, Hausser MA, Jack JJ (1991) Electrophysiology of dopaminergic and non-dopaminergic neurones of the guinea-pig substantia nigra pars compacta in vitro. *J Physiol* 436:643-667.
- Zahm DS (1989) The ventral striatopallidal parts of the basal ganglia in the rat--II. Compartmentation of ventral pallidal efferents. *Neuroscience* 30:33-50.
- Zitt C, Halaszovich CR, Luckhoff A (2002) The TRP family of cation channels: probing and advancing the concepts on receptor-activated calcium entry. *Prog Neurobiol* 66:243-264.
- Zoli M, Lena C, Picciotto MR, Changeux JP (1998) Identification of four classes of brain nicotinic receptors using beta2 mutant mice. *J Neurosci* 18:4461-4472.