

Université de Montréal

Identification des canaux TRPC impliqués dans la potentialisation à long terme des interneurons de la région CA1 de l'hippocampe chez le rat

par  
André Kougioumoutzakis

Département de physiologie  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Maître ès sciences (M.Sc.)  
en sciences neurologiques

Août 2008

© André Kougioumoutzakis, 2008

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Identification des canaux TRPC impliqués dans la potentialisation à long terme des interneurons de la région CA1 de l'hippocampe chez le rat

présenté par :

André Kougioumoutzakis

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Richard Robitaille  
président-rapporteur

Dr Jean-Claude Lacaille  
directeur de recherche

Dr Réjean Dubuc  
membre du jury

## RÉSUMÉ

Le réseau neuronal de l'hippocampe joue un rôle central dans la mémoire en modifiant de façon durable l'efficacité de ses synapses. Dans les interneurons de la couche oriens/alveus (O/A), l'induction de la potentialisation à long terme (PLT) requiert les courants postsynaptiques excitateurs évoqués par les récepteurs métabotropes du glutamate de sous-type 1a (CPSE<sub>mGluR1a</sub>) et l'entrée subséquente de Ca<sup>2+</sup> via des canaux de la famille des *transient receptor potential* (TRP). Le but de ce projet était d'identifier les canaux TRP responsables des CPSE<sub>mGluR1a</sub> et d'explorer les mécanismes moléculaires régulant leur ouverture. Nous avons déterminé par des enregistrements électrophysiologiques que les CPSE<sub>mGluR1a</sub> étaient spécifiques aux interneurons O/A et qu'ils étaient indépendants de la phospholipase C. Nous avons ensuite examiné l'expression des TRPC et leur interaction avec mGluR1a par les techniques de RT-PCR, d'immunofluorescence et de co-immunoprécipitation. Nos résultats montrent que TRPC1 et mGluR1a s'associent dans l'hippocampe et que ces deux protéines sont présentes dans les dendrites des interneurons O/A. En revanche, TRPC4 ne semble s'associer à mGluR1a qu'en système recombinant et leur colocalisation paraît limitée au corps cellulaire. Finalement, nous avons procédé à des enregistrements d'interneurones dans lesquels l'expression des TRPC a été sélectivement supprimée par la transfection d'ARN interférant et avons ainsi démontré que TRPC1, mais non TRPC4, est une sous-unité obligatoire du canal responsable des CPSE<sub>mGluR1a</sub>. Ces travaux ont permis de mieux comprendre les mécanismes moléculaires à la base de la transmission synaptique des interneurons O/A et de mettre en évidence un rôle potentiel de TRPC1 dans la PLT.

**Mots clés :** Hippocampe, transmission synaptique, potentialisation à long terme (PLT), récepteurs métabotropes du glutamate (mGluRs), canaux *transient receptor potential* (TRP), interneurons.

## SUMMARY

The hippocampal neuronal network plays a crucial role in memory by producing long lasting changes in the efficacy of its synapses. In interneurons of stratum oriens/alveus (O/A), long term potentiation (LTP) induction requires metabotropic glutamate receptor subtype 1a (mGluR1a)-evoked excitatory postsynaptic currents (EPSCs) and subsequent  $\text{Ca}^{2+}$  entry through *transient receptor potential* (TRP) channels. The objectives of this project were to identify the TRP channels that mediate mGluR1a-evoked EPSCs and to explore molecular mechanisms that underlie their activation. Electrophysiological recordings showed that mGluR1a-evoked EPSCs were specifically observed in O/A interneurons and they were phospholipase C-independent. We then examined TRPC expression and their interaction with mGluR1a by RT-PCR, immunofluorescence and co-immunoprecipitation techniques. Our results show that TRPC1 and mGluR1a associate in hippocampus and that both proteins have overlapping distributions in dendrites of O/A interneurons. In contrast, TRPC4 seems to associate with mGluR1a only in recombinant system and their co-localization appears to be limited to the cell body. Finally, we performed recordings of interneurons in which TRPC expression was selectively suppressed by small interfering RNAs and we found that TRPC1, but not TRPC4, is an obligatory subunit of the channel that mediate mGluR1a-evoked EPSCs. This work brought new insight on molecular mechanisms underlying synaptic transmission of O/A interneurons and uncovered a potential role for TRPC1 in LTP.

**Key words :** Hippocampus, synaptic transmission, long term potentiation (LTP), metabotropic glutamate receptors (mGluRs), *transient receptor potential* (TRP) channels, interneurons.

## REMERCIEMENTS

J'aimerais d'abord remercier Dr Jean-Claude Lacaille pour m'avoir offert l'opportunité d'entreprendre des études supérieures dans son laboratoire tout en me permettant de réaliser d'autres projets me tenant à cœur.

Je voudrais également remercier Dre Aude Panatier de m'avoir offert une aide inestimable pour la microscopie confocale et la réalisation des figures de même que Dre Mounia Azzi, Dre Isabel Laplante, Dr Charles Laurent, Dr José Alfredo Mendez et Dre France Morin pour m'avoir appris toutes les techniques que j'ai eu à utiliser pour obtenir les résultats présentés dans ce mémoire.

Je tiens aussi à offrir des remerciements à Julie Pépin et à Catherine Bourgeois qui se sont toujours soigneusement occupé des cultures cellulaires et organotypiques et ont grandement facilité mon travail en m'offrant leur soutien technique.

Je désire exprimer des remerciements particuliers à tous mes collègues pour leur soutien moral et pour avoir contribué à créer une atmosphère agréable durant mes quatre années passées au laboratoire.

Finalement, un grand merci à mes parents et à ma famille à qui je dois ma passion pour les sciences et qui m'ont toujours soutenu et encouragé dans mes études.

## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ .....	i
SUMMARY .....	ii
REMERCIEMENTS .....	iii
TABLE DES MATIÈRES .....	iv
Liste des tableaux .....	vii
Liste des figures .....	vii
Liste des figures .....	vii
Liste des abréviations .....	ix

## CHAPITRE 1

INTRODUCTION GÉNÉRALE .....	1
1.1 RÔLE DE L'HIPPOCAMPE DANS LA MÉMOIRE .....	2
1.2 ANATOMIE DE L'HIPPOCAMPE .....	3
1.2.1 Anatomie macroscopique de l'hippocampe .....	3
1.2.2 Architecture microscopique de l'hippocampe .....	4
1.3 LES TYPES CELLULAIRES DE L'HIPPOCAMPE .....	6
1.3.1 Le circuit trisynaptique des cellules principales de l'hippocampe .....	6
1.3.2 Les interneurons de l'hippocampe .....	7
1.3.2.1 Morphologie des interneurons de couche O/A de la région CA1... ..	8
1.3.2.2 Fonctions des interneurons de l'hippocampe .....	9
1.4 LA TRANSMISSION SYNAPTIQUE GLUTAMATERGIQUE DANS L'HIPPOCAMPE .....	10
1.4.1 Les récepteurs ionotropes du glutamate .....	10
1.4.2 Les récepteurs métabotropes du glutamate .....	10
1.4.2.1 Les mGluR de groupe I dans la transmission synaptique des interneurons O/A .....	12
1.4.2.2 Signalisation des mGluR de groupe I dans les interneurons O/A .....	13
1.5 LA PLASTICITÉ SYNAPTIQUE DANS L'HIPPOCAMPE .....	14
1.5.1 La plasticité synaptique dans les cellules principales de l'hippocampe .....	14
1.5.2 La plasticité synaptique dans les interneurons O/A de l'hippocampe .....	16
1.6 LES CANAUX TRP DANS LA TRANSMISSION ET LA PLASTICITÉ SYNAPTIQUE .....	19
1.6.1 La superfamille des canaux TRP .....	19
1.6.2 Les canaux TRP dans la signalisation des récepteurs mGluR .....	20
1.6.3 Rôle des canaux TRP dans la plasticité synaptique des interneurons O/A .....	22
1.6.4 La famille TRPC .....	22
1.6.4.1 Expression des canaux TRPC dans le cerveau .....	23
1.6.4.2 Mécanismes d'activation des canaux TRPC .....	24
1.7 OBJECTIFS DU MÉMOIRE .....	29
1.8 CONTRIBUTION DES COAUTEURS DE L'ARTICLE .....	30

<b>CHAPITRE 2</b>	
<b>LA TRANSMISSION SYNAPTIQUE EXCITATRICE LENTE DES INTERNEURONES HIPPOCAMPIQUES DE L'ORIENS/ALVEUS DÉPEND DE TRPC1.....</b>	
	<b>31</b>
2.1	<b>ABSTRACT .....</b>
	<b>34</b>
2.2	<b>INTRODUCTION .....</b>
	<b>35</b>
2.3	<b>METHODS .....</b>
	<b>37</b>
2.3.1	<b>Acute hippocampal slices .....</b>
	<b>37</b>
2.3.2	<b>Organotypic hippocampal slice culture and biolistic transfection ..</b>
	<b>37</b>
2.3.3	<b>Electrophysiological recordings .....</b>
	<b>37</b>
2.3.4	<b>Pharmacology .....</b>
	<b>38</b>
2.3.5	<b>RT-PCR.....</b>
	<b>38</b>
2.3.6	<b>Multiplex single-cell RT-PCR .....</b>
	<b>39</b>
2.3.7	<b>Immunoprecipitation assays.....</b>
	<b>40</b>
2.3.8	<b>TRPC1 and mGluR1a double-label immunofluorescence.....</b>
	<b>41</b>
2.3.9	<b>Western blots .....</b>
	<b>41</b>
2.4	<b>RESULTS .....</b>
	<b>43</b>
2.4.1	<b>mGluR1a-evoked EPSCs are independent of PLC pathway.....</b>
	<b>43</b>
2.4.2	<b>TRPC mRNA expression in CA1 region and in single O/A interneurons .....</b>
	<b>44</b>
2.4.3	<b>mGluR1a physically associates with TRPC1 and TRPC4 in HEK-293 cells and with TRPC1 in hippocampus .....</b>
	<b>44</b>
2.4.4	<b>TRPC1 and TRPC4 co-localize with mGluR1a in O/A interneurons .....</b>
	<b>45</b>
2.4.5	<b>TRPC1, but not TRPC4, is necessary for mGluR1a-dependent EPSCs in O/A interneurons.....</b>
	<b>46</b>
2.5	<b>DISCUSSION .....</b>
	<b>47</b>
2.5.1	<b>TRPC expression and association with mGluR1a.....</b>
	<b>47</b>
2.5.2	<b>TRPC1 is involved in mGluR1a-evoked EPSCs in O/A interneurons .....</b>
	<b>49</b>
2.5.3	<b>Mechanisms underlying mGluR1a activation of TRPC1 .....</b>
	<b>49</b>
2.5.4	<b>Functional implications.....</b>
	<b>50</b>
2.6	<b>REFERENCES .....</b>
	<b>52</b>
2.7	<b>TABLES.....</b>
	<b>56</b>
2.8	<b>FIGURES .....</b>
	<b>58</b>
2.9	<b>FIGURE LEGENDS .....</b>
	<b>64</b>

<b>CHAPITRE 3</b>	
<b>DISCUSSION GÉNÉRALE .....</b>	
	<b>67</b>
3.1	<b>RAPPEL DES PRINCIPAUX RÉSULTATS .....</b>
	<b>68</b>
3.2	<b>MÉCANISMES D'ACTIVATION DES CANAUX TRPC DANS LES INTERNEURONES O/A DE L'HIPPOCAMPE .....</b>
	<b>68</b>
3.2.1	<b>Voies de signalisation des protéines G et des tyrosine kinases.....</b>
	<b>68</b>
3.2.2	<b>Voie de signalisation de la PLC.....</b>
	<b>70</b>

<b>3.3</b>	<b>MÉCANISMES D'INDUCTION DE LA PLT AUX SYNAPSES EXCITATRICES DES INTERNEURONES O/A DE L'HIPPOCAMPE .....</b>	<b>71</b>
3.3.1	Mécanismes d'induction de la PLT hebbienne.....	72
3.3.2	Mécanismes d'induction de la PLT anti-hebbienne.....	73
3.3.3	La PLT des interneurons O/A est-elle hebbienne ou anti-hebbienne ? .....	73
<b>3.4</b>	<b>PERSPECTIVES FUTURES .....</b>	<b>78</b>
<b>CHAPITRE 4</b>		
<b>BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE.....</b>		<b>80</b>

**LISTE DES TABLEAUX****CHAPITRE 1**

Tableau 1.1	Position de la formation hippocampique dans le cerveau de rat. ....	27
Tableau 1.2	Photomicrographie d'une coupe transversale de l'hippocampe.....	28

**CHAPITRE 2**

Table 2.1	TRP channel-mediated mGluR1a-evoked EPSCs are PLC-independent and specific to O/A interneurons. ....	56
Table 2.2	TRPC mRNA expression in whole CA1 hippocampal region and in individual O/A interneurons.....	57

## LISTE DES FIGURES

### CHAPITRE 1

Figure 1.1	Position de la formation hippocampique dans le cerveau de rat. ....	4
Figure 1.2	Photomicrographie d'une coupe transversale de l'hippocampe. ....	5
Figure 1.3	Illustration du circuit trisynaptique sur une coupe transversale de l'hippocampe. ....	7
Figure 1.4	Morphologie d'un interneurone O-LM de la région CA1. ....	8
Figure 1.5	Illustration de la localisation des différents récepteurs du glutamate en rapport avec les transporteurs du glutamate. ....	12
Figure 1.6	Structure d'un canal TRP. ....	20
Figure 1.7	Illustration du mécanisme d'ouverture du canal TRPC1 suivant la stimulation d'un récepteur métabotrope. ....	26

### CHAPITRE 2

Figure 2.1	TRP channel-mediated mGluR1a-evoked EPSCs are PLC-independent and specific to O/A interneurons. ....	58
Figure 2.2	TRPC mRNA expression in whole CA1 hippocampal region and in individual O/A interneurons. ....	59
Figure 2.3	Molecular interaction of mGluR1a with TRPC1 and TRPC4 in HEK-293 cells and with TRPC1 in hippocampus. ....	60
Figure 2.4	mGluR1a co-localizes with TRPC1 and TRPC4 in O/A interneurons. .	61
Figure 2.5	2.5 siRNA transfection selectively reduced TRPC1 and TRPC4 expression in hippocampal organotypic slice cultures. ....	62
Figure 2.6	Selective knock-down of TRPC1, but not TRPC4, reduces mGluR1a-evoked EPSCs. ....	63

### CHAPITRE 3

Figure 3.1	Mécanismes d'induction de la PLT hebbienne aux synapses excitatrices des interneurons O/A. ....	76
Figure 3.2	Mécanismes d'induction de la PLT anti-hebbienne aux synapses excitatrices des interneurons O/A. ....	77

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACSF :	<i>artificial cerebrospinal fluid</i>
AMPA :	acide $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionique
AMPAR :	récepteur AMPA
CA1 :	corne d'Ammon 1
CA3 :	corne d'Ammon 3
CCDV	canaux calciques dépendants du voltage
CaMKII :	protéine kinase $\text{Ca}^{2+}$ -calmoduline II
CP-AMPAR :	récepteur AMPA perméable au calcium
CPSE :	courant postsynaptique exciteur
DAG :	diacylglycérol
DLT :	dépression à long terme
EPSC	<i>excitatory postsynaptic current</i>
ERK	<i>extracellular-signal regulated kinase</i>
GABA :	acide $\gamma$ -amino butyrique
GPCR	G protein-coupled receptor
HFS	<i>high frequency stimulation</i>
iGluR	récepteur ionotrope du glutamate
IP <sub>3</sub> :	inositol-1,4,5-triphosphate
IP <sub>3</sub> R :	récepteur de l'inositol-1,4,5-triphosphate
NMDA :	N-méthyl-D-aspartate
NMDAR :	récepteur NMDA
LM	couche lacunosum-moleculare
LTP	<i>long term potentiation</i>
mGluR :	récepteur métabotrope du glutamate
O/A :	couche oriens/alveus
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PKA :	protéine kinase A
PKC :	protéine kinase C
PLC :	phospholipase C
PLT :	potentialisation à long terme
Rad :	couche radiatum
RCPG	récepteur couplé aux protéines G
RE	réticulum endoplasmique
RTK	récepteur tyrosine kinase
RT-PCR	<i>reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
RyR :	récepteur de la ryanodine
SBT	stimulation en bouffée thêta
STIM1	<i>stromal interactin molecule 1</i>
TRP :	<i>transient receptor potential</i>
TRPC	<i>transient receptor potential classical</i>
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>

## **CHAPITRE 1**

### **INTRODUCTION GÉNÉRALE**

## 1.1 RÔLE DE L'HIPPOCAMPE DANS LA MÉMOIRE

L'apprentissage est le processus par lequel de nouvelles connaissances ou de nouveaux comportements sont acquis. La mémoire réfère quant à elle aux procédés par lesquels les informations sont entreposées dans les structures cérébrales les rendant ainsi accessibles pour utilisation ultérieure. Il n'existe pas un site d'entreposage unique pour tous les types d'informations mémorisées. Par exemple, les comportements moteurs sont entreposés dans un site différent des souvenirs olfactifs. La mémoire n'est donc pas une unité monolithique, elle est formée de plusieurs systèmes qui agissent en interaction (Kandel *et al.*, 2000).

Les premiers indices suggérant une contribution du lobe temporal médian dans l'apprentissage et la mémoire proviennent d'études neuropsychologiques menées sur des patients ayant subi une ablation plus ou moins importante des structures de ce lobe (Scoville & Milner, 1957). Cette étude rapporte entre autres le cas d'un patient, désigné par ses initiales « H.M. », ayant subi une exérèse bilatérale du lobe temporal médian incluant les cortex périrhinal et entorhinal, l'amygdale et la majeure partie de l'hippocampe (Scoville & Milner, 1957; Corkin *et al.*, 1997). Cette opération n'eut que peu d'effet sur la perception, l'intelligence et la personnalité de H.M., mais elle causa chez lui une amnésie antérograde sévère et une amnésie rétrograde partielle se limitant aux trois années précédant l'opération. Ce déficit mnésique était cependant limité à sa mémoire déclarative à long terme, c'est-à-dire la mémoire des faits et événements, et n'affectait ni sa mémoire à court terme ni sa mémoire procédurale. Les auteurs de cette étude ont identifié l'hippocampe comme structure nécessaire à la formation de nouveaux souvenirs déclaratifs et à la rétention de souvenirs récents, car les déficits mnésiques n'étaient observés que dans les cas où l'hippocampe était endommagé (Scoville & Milner, 1957). Cependant, comme d'autres structures avaient été touchées lors de cette intervention, des recherches supplémentaires furent nécessaires pour clarifier le rôle de l'hippocampe dans la mémoire.

Des études réalisées chez les rongeurs et les singes ont permis une analyse plus précise des structures impliquées dans la mémoire. Ces travaux ont montré que l'ablation de l'amygdale ne causait pas de déficit de la mémoire déclarative. Par contre, la résection de l'hippocampe seul est suffisante pour induire un déficit mnésique et la lésion concomitante des structures corticales adjacentes (cortex entorhinal, périrhinal et parahippocampique) exacerbe ce déficit. De façon générale, l'ampleur du déficit semble augmenter avec l'étendue des lésions du lobe temporal médian (Squire & Zola-Morgan, 1991).

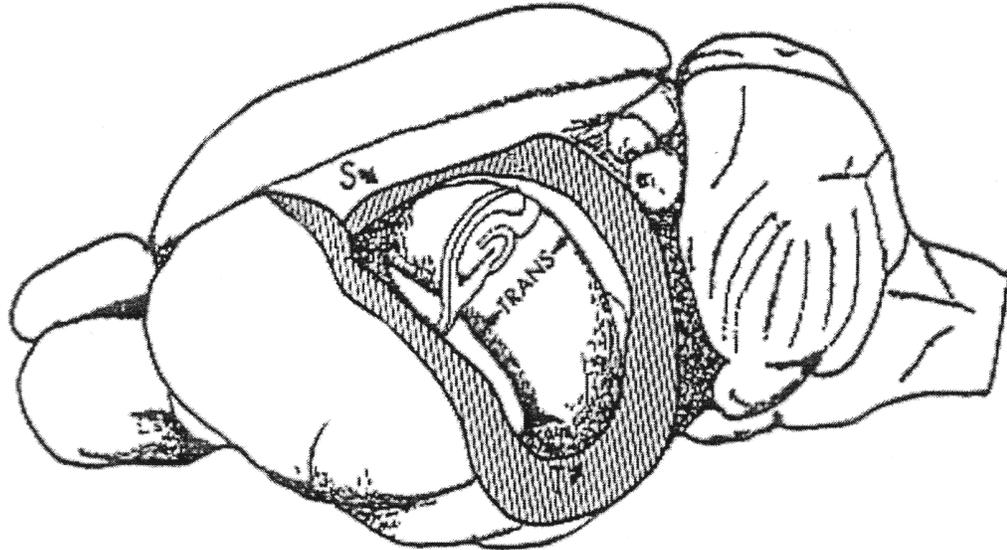
L'amnésie rétrograde présente chez les patients ayant subi une ablation du lobe temporal médian est limitée à la période précédant l'intervention chirurgicale. Cette période varie de quelques mois à plusieurs dizaines d'années et semble proportionnelle à l'étendue des lésions (Scoville & Milner, 1957; Squire *et al.*, 2001). Cette observation mena au modèle selon lequel l'hippocampe et les aires corticales adjacentes jouent un rôle temporaire dans la mémoire déclarative. Des études d'imagerie cérébrale fonctionnelle ont d'ailleurs démontré que suite à l'apprentissage d'une tâche, l'activité métabolique de l'hippocampe diminuait avec le temps alors que celle de certaines aires corticales augmentait. L'hippocampe serait donc nécessaire à l'encodage et à la consolidation des informations alors que le néocortex serait responsable de l'entreposage permanent et de la remémoration (Bontempi *et al.*, 1999). Il semble cependant que cette ségrégation fonctionnelle ne soit pas absolue, car chez les sujets sains, l'hippocampe serait aussi impliqué dans la remémoration des souvenirs anciens (Nadel *et al.*, 2000).

## **1.2 ANATOMIE DE L'HIPPOCAMPE**

### **1.2.1 Anatomie macroscopique de l'hippocampe**

La formation hippocampique est une structure tridimensionnelle, bilatérale et symétrique enfouie sous le cortex inférotemporal. Chez les rongeurs, elle est positionnée transversalement aux deux hémisphères et recourbée ventro-postérieurement (Fig. 1.1). Quatre régions constituent la formation hippocampique :

le gyrus dentelé, la corne d'Ammon, le subiculum et le cortex entorhinal (Amaral & Witter, 1989). De façon générale, le terme hippocampe désigne la structure formée du gyrus dentelé et de la corne d'Ammon.



**Figure 1.1**

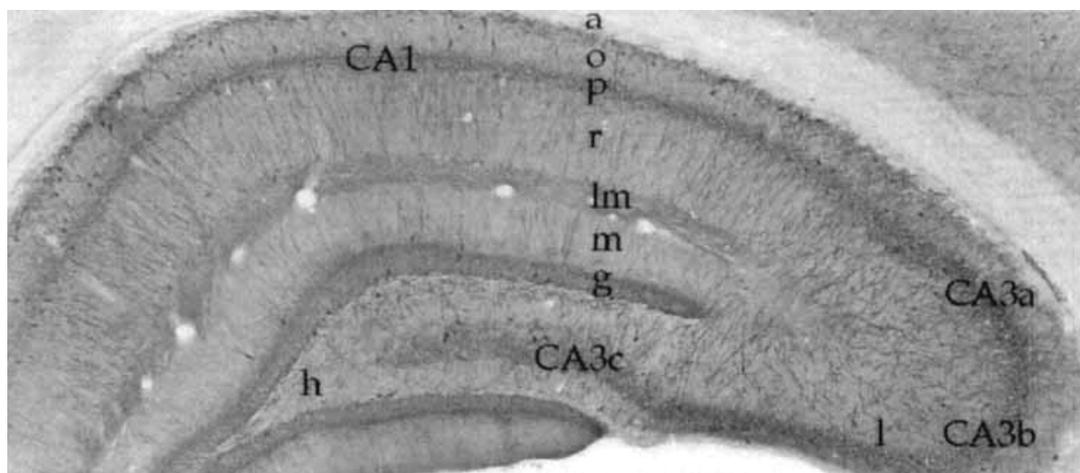
**Position de la formation hippocampique dans le cerveau de rat.** Sur cette illustration, le cortex cérébral recouvrant la formation hippocampique a été retiré pour permettre l'observation de cette structure. Son axe septotemporal s'étend du noyau septal (S) au cortex temporal (T) et son axe transversal (TRANS) est orienté perpendiculairement à l'axe septotemporal. Figure adaptée d'Amaral & Witter, 1989.

### 1.2.2 Architecture microscopique de l'hippocampe

L'observation d'une coupe transversale d'hippocampe révèle une organisation très structurée où les corps cellulaires et les zones de connexions sont disposés en couches superposées (Fig. 1.2).

Le gyrus dentelé comprend trois couches :

- 1) La couche moléculaire (ou dendritique).
- 2) La couche granulaire formée par les corps cellulaires des cellules granulaires.
- 3) La couche polymorphique (ou région du hile) composée de neurones polymorphiques dispersés (Amaral & Witter, 1989; Lopes da Silva *et al.*, 1990).



**Figure 1.2**

**Photomicrographie d'une coupe transversale de l'hippocampe.** Les régions CA1, CA3a, CA3b et CA3c sont indiquées. Les lettres minuscules correspondent aux différentes couches : (a) alveus, (o) oriens, (p) pyramidale, (r) radiatum, (lm) lacunosum-moleculare, (m) moléculaire, (g) granulaire, (h) hile. Figure tirée, avec permission, de Freund & Buzsáki, 1996.

La corne d'Ammon se compose de trois régions nommées CA1, CA2 et CA3. La région CA3 est elle-même subdivisée en CA3a, CA3b et CA3c. La corne d'Ammon comprend sept couches :

- 1) La couche moléculaire (*moleculare*) juxtapose la fissure hippocampique et contient principalement des fibres et des dendrites terminales des cellules principales.
- 2) La couche lacunosum est constituée principalement de faisceaux de fibres parallèles dont certaines sont des collatérales des cellules pyramidales alors que d'autres sont extrinsèques à l'hippocampe. Cette couche contient aussi de rares interneurons. Ces deux couches sont souvent regroupées sous le nom de lacunosum-moleculare (LM).
- 3) La couche radiatum est composée de quelques interneurons et de nombreuses fibres parallèles dont les dendrites apicales de cellules pyramidales et les collatérales de Schaffer. Au niveau du CA3, une couche mince, la couche lucidum, s'insère entre les couches pyramidale et radiatum et contient les fibres moussues provenant des cellules granulaires.

- 4) La couche pyramidale est formée des corps cellulaires des cellules pyramidales.
- 5) La couche oriens contient les dendrites basales des cellules pyramidales ainsi que des interneurons de morphologie variée et certaines des collatérales des cellules pyramidales.
- 6) La couche alveus est composée des axones des cellules pyramidales et on y retrouve quelques interneurons. Ces deux couches sont souvent regroupées sous le nom d'oriens-alveus (O/A).
- 7) La couche épithéliale forme une délimitation entre l'hippocampe et le ventricule à sa surface. (Amaral & Witter, 1989; Lopes da Silva *et al.*, 1990)

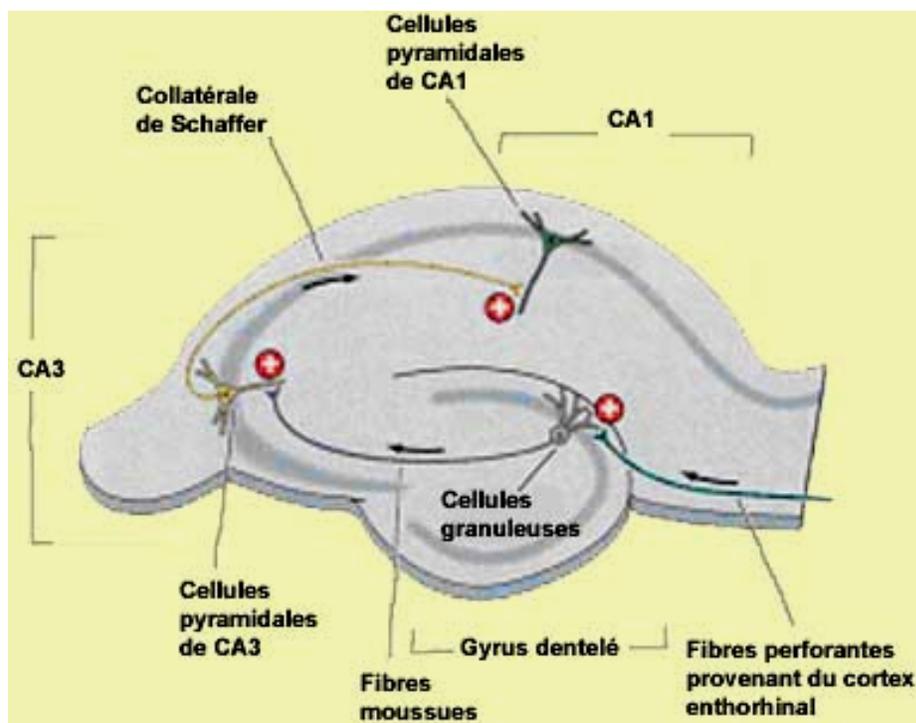
### **1.3 LES TYPES CELLULAIRES DE L'HIPPOCAMPE**

#### **1.3.1 Le circuit trisynaptique des cellules principales de l'hippocampe**

Les cellules principales de l'hippocampe sont les cellules granulaires du gyrus dentelé et les cellules pyramidales des différentes régions de la corne d'Ammon. Dans leur région respective, ces cellules possèdent des caractéristiques électrophysiologiques et morphologiques homogènes. Elles forment ensemble un circuit neuronal excitateur trisynaptique en boucle par lequel l'information provenant principalement du cortex entorhinal retourne finalement à cette structure après avoir emprunté le réseau de l'hippocampe (Fig. 1.3) (Amaral & Witter, 1989; Freund & Buzsaki, 1996).

Les axones provenant du cortex entorhinal pénètrent la couche moléculaire du gyrus dentelé et leurs terminaisons font synapse sur les cellules granulaires. Ces afférences, appelées voie perforante, constituent le premier relais du circuit. Les cellules granulaires projettent à leur tour des axones, appelés fibres moussues, qui quittent le hile et longent la couche pyramidale du CA3. Ces axones forment des terminaisons particulières, les boutons « en passant », qui contactent les dendrites proximales des cellules pyramidales du CA3 au niveau de la couche lucidum, établissant ainsi le deuxième relais du circuit. À leur tour, les cellules pyramidales du CA3 émettent des

axones, appelés collatérales de Schaffer, qui courent principalement dans le radiatum où ils contactent les cellules pyramidales du CA1, terminant ainsi le circuit trisynaptique. Finalement, les axones des cellules pyramidales du CA1 émettent des axones qui cheminent le long de l'alveus et projettent dans le subiculum et le cortex entorhinal. Ce circuit constitue une représentation très simplifiée du réseau hippocampique qui possède en réalité une organisation beaucoup plus complexe (Freund & Buzsaki, 1996).



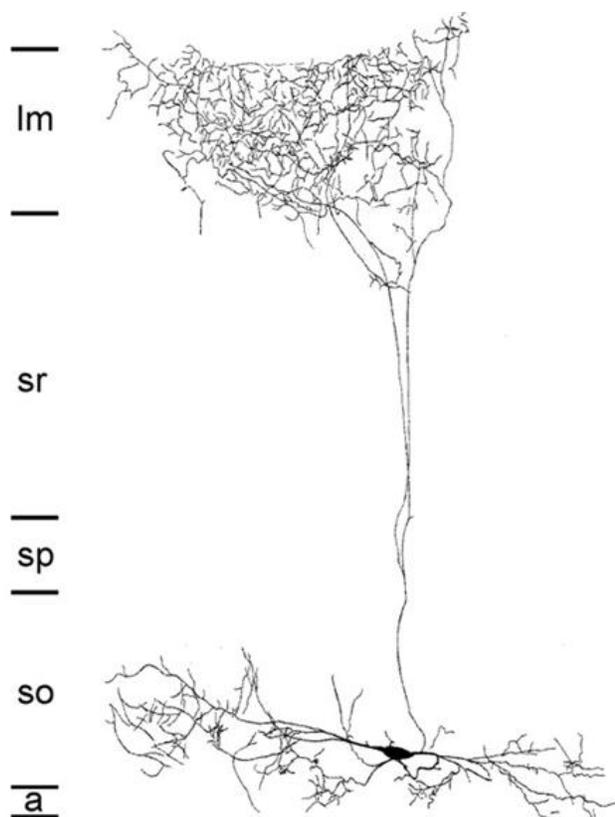
**Figure 1.3**  
**Illustration du circuit trisynaptique sur une coupe transversale de l'hippocampe.** Figure tirée de : <http://lecerveau.mcgill.ca>

### 1.3.2 Les interneurones de l'hippocampe

L'hippocampe contient également un vaste réseau d'interneurones inhibiteurs utilisant l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) comme neurotransmetteur. Contrairement aux cellules principales qui forment une population très homogène dans une même région, les interneurones possèdent des propriétés morphologiques et électrophysiologiques très diversifiées (Freund & Buzsaki, 1996). Pour cette raison, nous ne décrivons que les interneurones de la couche O/A de la région CA1 dont il est question dans cet ouvrage.

### 1.3.2.1 Morphologie des interneurones de couche O/A de la région CA1

La majeure partie des interneurones de la couche O/A sont dits « horizontaux », car ils possèdent un corps cellulaire fusiforme et une arborisation dendritique parallèles à la couche pyramidale. Les interneurones « verticaux » sont plus rares et possèdent une ou quelques dendrites qui traversent perpendiculairement la couche pyramidale et se ramifient dans les couches radiatum ou LM. Il est possible de distinguer au moins huit types d'interneurones selon l'organisation de leurs projections et la localisation de leurs terminaisons axonales (Maccaferri, 2005). Le sous-type d'interneurone le plus représenté est probablement l'O-LM dont le corps cellulaire est localisé dans l'oriens et dont l'axone chemine perpendiculairement à cette couche pour se ramifier presque exclusivement dans la couche LM (Fig. 1.4). Ces interneurones forment des synapses inhibitrices avec les dendrites distales des cellules pyramidales.



**Figure 1.4**  
**Morphologie d'un interneurone O-LM de la région CA1.** Les différentes couches sont représentées par les lettres suivantes : (lm) lacunosum-moléculaire, (sr) radiatum, (sp) pyramidale, (so) oriens, (a) alveus. Figure adaptée de Huang *et al.*, 2004.

### 1.3.2.2 Fonctions des interneurons de l'hippocampe

Les interneurons gabaergiques, par leur action inhibitrice, contrôlent l'excitabilité des cellules principales de l'hippocampe. Trois types d'inhibition ont été répertoriés : proactive, rétroactive et mixte. Le mode d'inhibition des interneurons dépend en grande partie de la nature de leurs afférences (Freund & Buzsaki, 1996).

Des enregistrements de paires de cellules ont démontré que les cellules pyramidales du CA1 excitaient directement les interneurons de la couche O/A qui à leur tour induisaient des potentiels postsynaptiques inhibiteurs dans ces cellules pyramidales. Les interneurons de l'O/A reçoivent également d'autres afférences excitatrices et inhibitrices, probablement des collatérales de Schaffer et des cellules en panier (respectivement) (Lacaille *et al.*, 1987). Des études de dégénération sélective des cellules pyramidales du CA1 ont ensuite démontré que la majorité des synapses excitatrices contactant les interneurons horizontaux provenaient des collatérales des cellules pyramidales suggérant un circuit d'inhibition rétroactive entre ces interneurons et les cellules pyramidales du CA1 (Blasco-Ibanez & Freund, 1995).

Le contrôle de l'excitabilité des cellules pyramidales par les interneurons est un mécanisme primordial dans l'induction et le maintien des rythmes oscillatoires de l'hippocampe (Freund & Buzsaki, 1996). Les décharges des interneurons permettraient de définir des fenêtres temporelles durant lesquelles les cellules pyramidales peuvent atteindre un niveau d'excitation suffisant pour déclencher des potentiels d'action et permettraient ainsi la synchronisation d'une population de cellules pyramidales. Cette synchronisation serait nécessaire à l'induction de modifications à long terme de l'efficacité des synapses à l'intérieur d'un réseau neuronal (Chrobak & Buzsaki, 1998).

Bien que les interneurons gabaergiques soient inhibiteurs, ils ne suppriment pas de façon globale et généralisée l'activité des cellules pyramidales. Au contraire, chaque type d'interneurone a un effet spécifique selon les afférences qu'il reçoit et les domaines cellulaires qu'il contacte. Ceci est illustré par les différents patrons de

décharge des divers types d'interneurones survenant durant un mode oscillatoire donné. L'activité des cellules pyramidales est donc finement orchestrée par le réseau d'interneurones gabaergiques de l'hippocampe (Somogyi & Klausberger, 2005).

#### **1.4 LA TRANSMISSION SYNAPTIQUE GLUTAMATERGIQUE DANS L'HIPPOCAMPE**

Le glutamate est le principal neurotransmetteur excitateur du système nerveux central. Il exerce son action via deux types de récepteurs : les récepteurs ionotropes (iGluR) responsables de la transmission synaptique rapide et les récepteurs métabotropes (mGluR) responsables de la transmission synaptique lente.

##### **1.4.1 Les récepteurs ionotropes du glutamate**

Les récepteur ionotropes du glutamate comprennent les récepteurs de l'acide  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionique (AMPA), du kainate (KA) et du N-méthyl-D-aspartate (NMDA). Ces trois types de récepteurs sont des récepteurs canaux perméables aux cations monovalents ( $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$ ). Les récepteurs NMDA sont aussi perméables aux ions  $\text{Ca}^{2+}$ . De plus, certains récepteurs AMPA sont eux aussi perméables aux ions  $\text{Ca}^{2+}$ . Cette propriété dépend de l'épissage alternatif de l'ARN messenger de la sous-unité GluR2 du récepteur (Kew & Kemp, 2005).

Les récepteurs NMDA sont dépendants du voltage, car à des potentiels membranaires négatifs, leur canal est bloqué par les ions  $\text{Mg}^{2+}$  (Nowak *et al.*, 1984). Les récepteurs AMPA perméables au  $\text{Ca}^{2+}$  possèdent quant à eux une dépendance au voltage inversée par rapport aux récepteurs NMDA. À des potentiels membranaires positifs, le canal de ces récepteurs est bloqué par les polyamines intracellulaires (Bowie & Mayer, 1995; Donevan & Rogawski, 1995).

##### **1.4.2 Les récepteurs métabotropes du glutamate**

Les récepteurs mGluR ont été découverts suite à l'observation que des agonistes glutamatergiques pouvaient provoquer une augmentation de la production d'inositol-1,4,5-triphosphate ( $\text{IP}_3$ ) dans les neurones (Sladeczek *et al.*, 1985). Depuis, huit

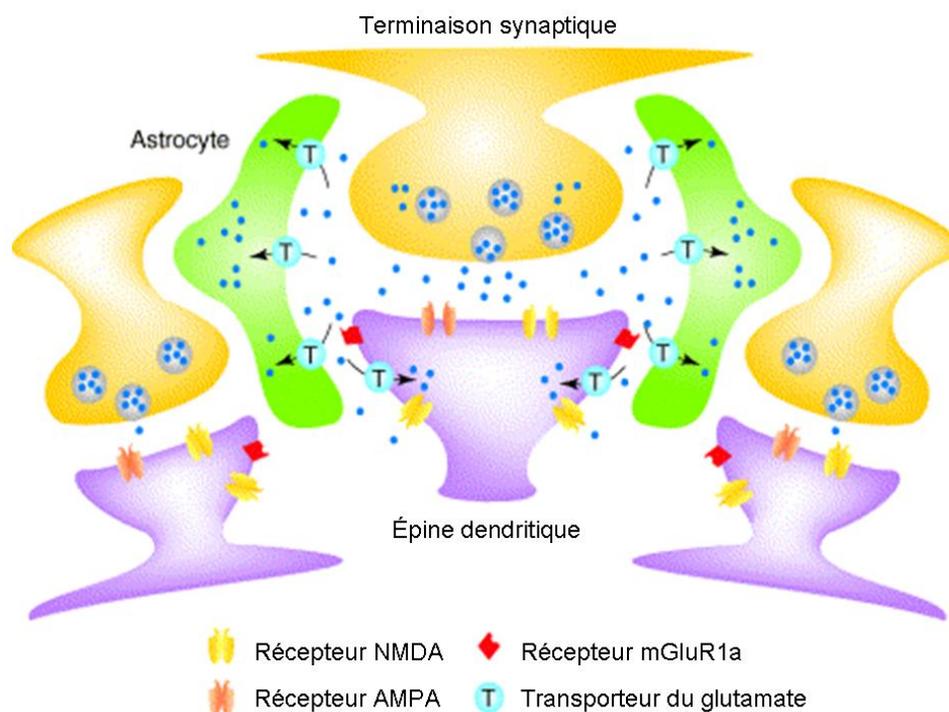
membres de cette famille (mGluR1 à mGluR8) ont été identifiés. Ils sont catégorisés en trois groupes selon l'homologie de leur séquence d'acides aminés, leurs mécanismes de transduction et leurs propriétés pharmacologiques (Pin & Duvoisin, 1995).

Les mGluR sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires capables d'activer les protéines G hétérotrimériques. Les mGluR de groupe I (mGluR1 et mGluR5) activent préférentiellement la voie de la phospholipase C (PLC) tandis que les mGluR des groupes II (mGluR2 et mGluR3) et III (mGluR4, mGluR6, mGluR7, mGluR8) inhibent l'adénylate cyclase (Pin & Duvoisin, 1995).

Il est généralement admis que les mGluR de groupe I sont essentiellement postsynaptiques alors que les mGluR de groupe III sont principalement présynaptique (Shigemoto *et al.*, 1997). Les mGluR de groupe II quant à eux peuvent adopter une localisation pré- et postsynaptique (Fagni *et al.*, 2000). La distribution des différents mGluR a été étudiée de façon approfondie dans l'hippocampe. La distribution des récepteurs mGluR1 varie selon l'isoforme. Les mGluR1a semblent exprimés exclusivement par les interneurons GABAergiques et préférentiellement par les interneurons de la couche O/A de la région CA1 (Baude *et al.*, 1993; Lujan *et al.*, 1996; Petralia *et al.*, 1997; Shigemoto *et al.*, 1997; Lapointe *et al.*, 2004). Les autres isoformes se distribuent principalement dans les dendrites et corps cellulaires des cellules granulaires et des cellules pyramidales du CA3, mais semblent peu exprimés par les cellules pyramidales du CA1 (Lujan *et al.*, 1996; Shigemoto *et al.*, 1997). Des études électrophysiologiques ont cependant mis en évidence la présence des récepteurs mGluR1 dans les cellules pyramidales du CA1 malgré leur expression apparemment indétectable (Mannaioni *et al.*, 2001). Les mGluR5 quant à eux sont exprimés de façon diffuse dans l'hippocampe (Lujan *et al.*, 1996; Shigemoto *et al.*, 1997). Leur niveau d'expression est élevé dans les dendrites des cellules pyramidales et certains interneurons semblent aussi les exprimer (Lujan *et al.*, 1996; Lujan *et al.*, 1997; Shigemoto *et al.*, 1997; van Hooft *et al.*, 2000; Lopez-Bendito *et al.*, 2002).

### 1.4.2.1 Les mGluR de groupe I dans la transmission synaptique des interneurons O/A

La stimulation à basse fréquence des afférences excitatrices des interneurons O/A produit typiquement des réponses rapides dépendantes des iGluR (Kew & Kemp, 2005). La stimulation à haute fréquence de ces mêmes afférences produit des réponses à deux composantes : l'une rapide et dépendante des iGluR et l'autre plus lente et dépendante du récepteur mGluR1a (Huang *et al.*, 2004). Ces courants postsynaptiques excitateurs (CPSE) lents ne sont évoqués que par des stimulations de haute fréquence et leur amplitude est augmentée par le blocage des transporteurs du glutamate. Ces phénomènes s'expliqueraient par le fait que le glutamate doit fuir hors de la fente synaptique pour atteindre les récepteurs mGluR1a dont la localisation est principalement pérисynaptique (Fig. 1.5) (Lujan *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 2004).



**Figure 1.5**

**Illustration de la localisation des différents récepteurs du glutamate en rapport avec les transporteurs du glutamate.** Les transporteurs du glutamate sont situés à la membrane des astrocytes qui enveloppent les synapses. Ces transporteurs font compétition aux récepteurs mGluR pérисynaptiques pour la liaison du glutamate. Figure adaptée de Huang & Bergles, 2004.

#### 1.4.2.2 Signalisation des mGluR de groupe I dans les interneurons O/A

Les mGluR de groupe I s'associent préférentiellement à la protéine  $G_{q/11}$  et activent la phospholipase C (PLC) produisant ainsi du diacylglycérol et de l' $IP_3$ . L' $IP_3$ , en se liant à son récepteur situé sur la membrane du réticulum endoplasmique (RE), provoque la libération d'ions  $Ca^{2+}$  à partir des réserves intracellulaires tandis que le DAG, conjointement avec les ions  $Ca^{2+}$ , active la protéine kinase C (PKC) (Pin & Duvoisin, 1995). Il est maintenant bien connu que les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) ne s'associent pas exclusivement à une voie de signalisation (Rajagopal *et al.*, 2005). Ainsi, les mGluR de groupe I peuvent aussi s'associer aux protéines  $G_s$  et  $G_{i/o}$  ou activer des cascades indépendantes des protéines G telles que la voie des tyrosines kinases de la famille Src (Heuss *et al.*, 1999; Hermans & Challiss, 2001).

Dans les interneurons O/A de la région CA1, l'application d'agonistes des mGluR produit une dépolarisation et des oscillations calciques. Ces dernières dépendent des canaux calciques dépendants du voltage et des récepteurs de la ryanodine (RyR) (Carmant *et al.*, 1997; Woodhall *et al.*, 1999). Ces effets ont été attribués spécifiquement à la stimulation des récepteurs mGluR1a et la voie de signalisation en cause semble indépendante des protéines G (Gee & Lacaille, 2004). L'application locale d'agonistes et l'utilisation d'antagonistes spécifiques des mGluR1a et mGluR5 ont permis de mettre en évidence des mécanismes de signalisation différents pour mGluR1a et mGluR5. Les courants postsynaptiques excitateurs (CPSE) et les réponses calciques induits par la stimulation de mGluR1a sont de grande amplitude et relativement rapides. Les réponses calciques possèdent deux composantes : la libération de  $Ca^{2+}$  à partir des réserves intracellulaires (probablement via les RyR) et l'entrée à partir de canaux cationiques non sélectifs de la famille *transient receptor potential* (TRP). Ce dernier mécanisme constitue la source principale de  $Ca^{2+}$  et semble dépendre de l'activation des tyrosines kinases de la famille Src et de l'activation de l'*extracellular-signal regulated kinase* (ERK). L'activation de mGluR5, quant à elle, produit des CPSE et des réponses calciques de faible amplitude et relativement lentes. Ces réponses n'impliquent que la libération de  $Ca^{2+}$

à partir des réserves intracellulaires. Suite à l'observation d'une activation d'ERK dépendante de Src et de mGluR1a, une voie de signalisation mGluR1a → Src → ERK → TRP a été proposée. Cette cascade de signalisation serait spécifique au récepteur mGluR1a et ne serait pas activée par le récepteur mGluR5 (Topolnik *et al.*, 2006).

On a d'abord cru que les mGluR du même groupe avaient des fonctions redondantes lorsqu'ils étaient coexprimés au sein d'une même cellule. Le développement d'antagonistes pharmacologiques sélectifs des mGluR1 et mGluR5 a permis de mettre en évidence une nette ségrégation de leurs fonctions dans plusieurs populations neuronales. Les mécanismes par lesquels ces récepteurs, qui semblent associés aux mêmes voies de signalisation *in vitro*, accomplissent des fonctions différentes *in vivo* sont encore peu explorés. La phosphorylation, la modulation par les *regulators of G protein signalling* (RGS) et l'interaction avec des protéines d'échafaudage, telles que celles de la famille Homer, ont été proposés comme mécanismes de régulation permettant aux mGluR de produire des effets distincts (Valenti *et al.*, 2002).

## **1.5 LA PLASTICITÉ SYNAPTIQUE DANS L'HIPPOCAMPE**

La plasticité synaptique est un changement de l'efficacité synaptique à la suite de l'activation des neurones concernés (Nicoll & Malenka, 1995). Il existe plusieurs formes de plasticité qui diffèrent selon leur durée (court ou long terme) et selon la nature du changement (augmentation ou diminution de l'efficacité synaptique). L'observation de modifications durables de l'efficacité des synapses a mené au modèle selon lequel la plasticité à long terme serait la base cellulaire et moléculaire de l'apprentissage et de la mémoire (Bliss & Collingridge, 1993; Martin *et al.*, 2000).

### **1.5.1 La plasticité synaptique dans les cellules principales de l'hippocampe**

C'est dans l'hippocampe qu'a été démontrée la première forme de potentialisation à long terme (PLT) (Bliss & Lomo, 1973). Depuis, la PLT du circuit trisynaptique a été

abondamment étudiée et a servi de modèle pour les formes de plasticité observées dans d'autres réseaux neuronaux (Nicoll & Malenka, 1995).

La principale forme de PLT des synapses excitatrices dépend de l'activation des récepteurs NMDA. Cette forme de plasticité est observée aux synapses de la voie perforante sur les cellules granulaires du gyrus dentelé et aux synapses des collatérales de Schaffer sur les cellules pyramidales du CA1 (Bliss & Collingridge, 1993; Nicoll & Malenka, 1995; Malenka & Nicoll, 1999). L'induction de cette PLT est dite associative ou hebbienne parce qu'elle nécessite une activité pré- et postsynaptique concomitantes. La dépolarisation du neurone postsynaptique lève l'inhibition du  $Mg^{2+}$  sur les récepteurs NMDA, ce qui permet leur activation par le glutamate libéré et l'entrée subséquente de  $Ca^{2+}$  dans le neurone postsynaptique. Les ions  $Ca^{2+}$  agissent ensuite comme seconds messagers pour activer des cascades de signalisation dont le complexe  $Ca^{2+}$ /calmoduline/kinase II (CaMK II), ainsi que les protéines kinases A (PKA) et C (PKC) ce qui mène à l'expression de la PLT (Malenka & Nicoll, 1999; Bennett, 2000). L'activation des mGluR peut aussi participer à l'augmentation postsynaptique de  $Ca^{2+}$  et ainsi contribuer à l'induction de la PLT (Malenka & Nicoll, 1999). Suite à l'activation des différentes voies de signalisation intracellulaires, le nombre de récepteurs AMPA à la membrane postsynaptique est augmenté et leur conductivité est accrue. À plus long terme, une modification des synapses se produit au niveau des épines dendritiques. La PLT semble aussi due à des changements présynaptiques. Un messenger rétrograde augmenterait la probabilité de fusion des vésicules synaptiques augmentant ainsi la quantité de neurotransmetteur libéré (Nicoll & Malenka, 1995).

Une forme différente de PLT existe aux synapses des fibres moussues sur les cellules pyramidales du CA3 (Nicoll & Malenka, 1995). Cette forme de PLT est non associative, car elle ne nécessite ni dépolarisation ni élévation de  $Ca^{2+}$  dans le neurone postsynaptique. Elle nécessite cependant une élévation de  $Ca^{2+}$  et l'activation de la PKA dans les terminaisons présynaptiques (Castillo *et al.*, 1994).

Cette forme de PLT est donc présynaptique et elle est due à l'augmentation de la libération de neurotransmetteur (Nicoll & Malenka, 1995).

### **1.5.2 La plasticité synaptique dans les interneurons O/A de l'hippocampe**

L'activité des cellules principales est grandement influencée par le réseau d'interneurones de l'hippocampe. Ceux-ci contrôlent leur excitabilité, participent à leur synchronisation et à leur activité oscillatoire (Freund & Buzsaki, 1996). La modification de l'efficacité des synapses des interneurons est donc susceptible d'avoir des répercussions sur l'activité des cellules principales. Par exemple, l'induction d'une PLT aux synapses excitatrices des interneurons O/A augmente l'amplitude des réponses inhibitrices polysynaptiques des cellules pyramidales du CA1 (Lapointe *et al.*, 2004). De façon générale, la plasticité aux synapses des interneurons augmenterait considérablement la capacité computationnelle du réseau neuronal de l'hippocampe, c'est-à-dire sa capacité à encoder l'information (Kullmann & Lamsa, 2007). Par exemple, la PLT aux synapses de certains interneurons est essentielle à la détection précise de la coïncidence temporelle des entrées des cellules principales (Lamsa *et al.*, 2005).

La tétanisation des afférences excitatrices des interneurons O/A du CA1 couplée à une dépolarisation postsynaptique induit une PLT dans ces cellules. Cette PLT dépend d'une activation des récepteurs NMDA, des récepteurs mGluR, d'une élévation postsynaptique de  $Ca^{2+}$  et de l'activité de la NO synthétase (Ouardouz & Lacaille, 1995). Cependant, ce type de stimulation recrute autant les afférences excitatrices faisant synapse sur les cellules pyramidales que celles faisant synapse sur les interneurons. Il est donc possible que la plasticité observée soit due à une propagation passive via les collatérales des cellules pyramidales contactant les interneurons (Maccaferri & McBain, 1995, 1996). L'utilisation de techniques stimulant les interneurons de façon monosynaptique a cependant permis de démontrer que cette plasticité pouvait être induite directement aux synapses des interneurons (Alle *et al.*, 2001; Perez *et al.*, 2001; Lapointe *et al.*, 2004; Lamsa *et al.*, 2005; Lamsa *et al.*, 2007).

L'utilisation d'un protocole de stimulation minimale a permis de démontrer que la PLT pouvait être induite directement aux synapses des interneurons O/A (Perez *et al.*, 2001). Cette PLT semble cependant posséder des mécanismes d'induction différents de celle obtenue par téτανisation des afférences. Bien qu'elle nécessite la stimulation du récepteur mGluR1a et une élévation postsynaptique de  $Ca^{2+}$ , cette PLT est indépendante des récepteurs NMDA (Perez *et al.*, 2001; Lapointe *et al.*, 2004). L'étude des réponses calciques dendritiques provoquées par la stimulation synaptique des interneurons a permis d'établir que les récepteurs mGluR de groupe I/II contribuent aux élévations calciques lorsque la stimulation en bouffées thêta est couplée à une dépolarisation (Topolnik *et al.*, 2005). L'étude des réponses calciques produites par la stimulation du récepteur mGluR1a a permis d'identifier deux sources principales contribuant à l'élévation postsynaptique de  $Ca^{2+}$  : la libération à partir des réserves intracellulaires du réticulum endoplasmique (RE) et l'entrée via les canaux cationiques non sélectifs de la famille des *transient receptor potential* (TRP) (Topolnik *et al.*, 2006). La déplétion des réserves intracellulaires seule ne semble pas interférer avec l'induction de la PLT tandis que le blocage des canaux TRP mène à l'induction d'une DLT plutôt que d'une PLT. Cela suggère que les canaux TRP sont la source principale de  $Ca^{2+}$  postsynaptique et qu'ils sont essentiels à l'induction de la PLT. L'induction d'une DLT suggère également que la plasticité aux synapses des interneurons est bidirectionnelle et que la concentration postsynaptique de  $Ca^{2+}$  détermine la nature du changement de l'efficacité synaptique.

La PLT peut également être induite aux synapses excitatrices des interneurons par l'application d'un agoniste des mGluR de groupe I (Le Vasseur *et al.*, 2008). Cette PLT ne semble pas uniquement dépendre du récepteur mGluR1, car la stimulation du récepteur mGluR5 seule est suffisante pour induire la PLT. Cette divergence pourrait être expliquée par le fait que la stimulation synaptique en bouffées thêta stimulerait préférentiellement les récepteurs mGluR1a pérисynaptiques, mais serait insuffisante pour stimuler les récepteurs mGluR5 dont la localisation est principalement extrasynaptique (Lujan *et al.*, 1997). Il existerait donc plus d'une forme de PLT : une

dépendant de mGluR1a et induite par des stimulations d'intensité modérée et une autre dépendant à la fois de mGluR1a et de mGluR5 et survenant lors de stimulations à haute fréquence (Le Vasseur *et al.*, 2008). Cette hypothèse reste cependant à confirmer.

Récemment, une autre forme de PLT a été démontrée dans les interneurons O/A. Contrairement à la PLT associative décrite plus haut, cette PLT « anti-hebbienne » n'est induite que lorsque la stimulation présynaptique est couplée à la quiescence ou à l'hyperpolarisation postsynaptique (Lamsa *et al.*, 2007). Cette caractéristique dépendrait du profil de rectification des récepteurs AMPA perméables au  $\text{Ca}^{2+}$  (CP-AMPA), car la PLT anti-hebbienne ne peut être induite que lorsque les polyamines intracellulaires sont préservées. En absence de polyamines, les CP-AMPA perdent leur rectification entrante et la PLT devient hebbienne. Les auteurs ont émis l'hypothèse que cette forme de PLT pourrait être induite *in vivo* par les *sharp wave ripples*. Durant ces périodes d'activité, les cellules pyramidales déchargent de façon prononcée alors que les interneurons O/A, qui reçoivent la majorité de leurs afférences excitatrices des cellules pyramidales, par un mécanisme encore inconnu, demeurent silencieux (Klausberger *et al.*, 2003). Étonnamment, la PLT anti-hebbienne dépend aussi des mGluR de groupe I, mais leur rôle dans cette forme de PLT est encore inconnu. Il est possible que les formes hebbienne et anti-hebbienne représentent la même PLT, mais que les conditions nécessaires à son induction dépendent du niveau de polyamines intracellulaires (Lamsa *et al.*, 2007). Une autre possibilité serait que ces deux formes existent indépendamment l'une de l'autre. La première surviendrait durant les périodes de quiescence postsynaptique où le  $\text{Ca}^{2+}$  provient principalement des CP-AMPA et l'autre serait induite durant les périodes d'activité post-synaptique où les mGluR contribuent de façon significative aux élévations calciques (Topolnik *et al.*, 2005).

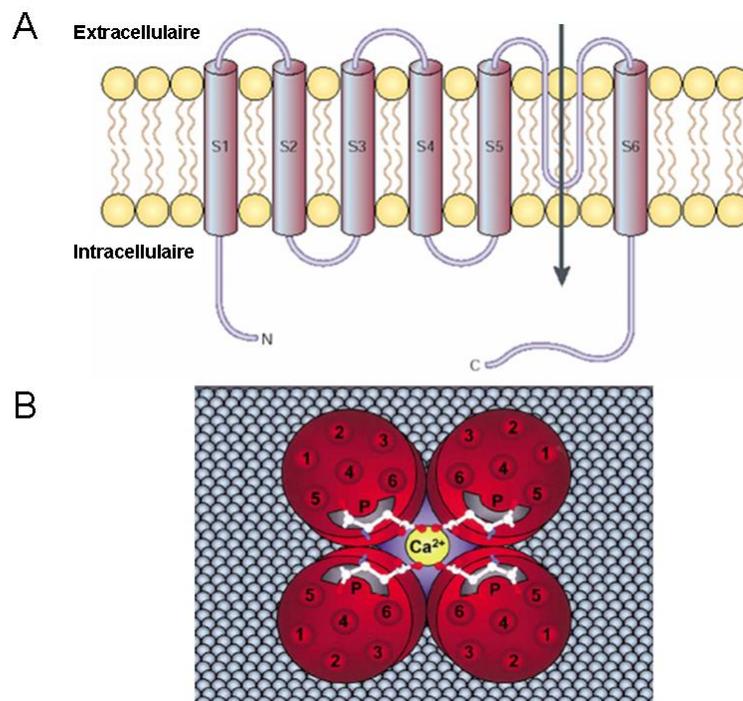
## 1.6 LES CANAUX TRP DANS LA TRANSMISSION ET LA PLASTICITÉ SYNAPTIQUE

### 1.6.1 La superfamille des canaux TRP

Le premier membre de la superfamille des canaux *transient receptor potential* (TRP) a été identifié en tant que gène essentiel à la phototransduction chez la drosophile (Montell & Rubin, 1989). Il a été baptisé ainsi suite à l'observation que les drosophiles mutantes pour ce gène produisaient des potentiels de récepteur transitoires plutôt que soutenus en réponse à la lumière. Des travaux ont ensuite montré que ce gène codait une protéine formant un canal perméable aux ions  $\text{Ca}^{2+}$  (Vaca *et al.*, 1994).

Chez les mammifères, 28 membres de la superfamille TRP ont été identifiés à ce jour (Venkatachalam & Montell, 2007). Contrairement à d'autres familles de canaux ioniques telles que les  $\text{Ca}_v$ ,  $\text{Na}_v$  et  $\text{K}_v$ , les TRP ont été regroupés au sein de la même famille non pas sur la base de leurs propriétés, mais plutôt selon l'homologie de leur séquence d'acides aminés. Ils sont classés en six familles selon leur degré d'homologie : classique (TRPC), mélastatine (TRPM), vanilloïde (TRPV), *ankyrin transmembrane protein 1* (TRPA), polycystine (TRPP) et mucolipine (TRPML). Ces protéines possèdent six passages transmembranaires. Leurs régions N- et C-terminales sont cytoplasmiques et la région formant le pore se situe entre le cinquième et le sixième segment transmembranaire (Fig. 1.6A). Elles s'assemblent en homo- ou hétérotétramères (Fig. 1.6B) pour former des canaux perméables aux cations dont la plupart sont perméables aux ions  $\text{Ca}^{2+}$ . Mis à part ces similitudes, les différents membres de la superfamille TRP montrent une grande diversité dans leurs mécanismes d'activation, leur sélectivité ionique et leurs fonctions. De façon générale, ils sont peu sensibles au potentiel membranaire et peu sélectifs. Une caractéristique générale semble aussi se dégager concernant leurs mécanismes d'activation : ils sont activés par des changements dans leur environnement local. Cette propriété fait en sorte que ces canaux jouent un rôle clé dans la transduction des principaux stimuli externes (lumineux, chimiques, mécaniques et thermiques), dans la détection des changements du milieu interne (osmolarité, pH, concentration en ions

$\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$ ) ainsi que dans la signalisation intracellulaire associée aux récepteurs métabotropes (RCPG et récepteurs à tyrosine kinase).



**Figure 1.6**

**Structure d'un canal TRP.** **A.** Les sous-unités des canaux TRP possèdent six segments transmembranaires (S1-S6), des régions N- et C-terminales intracellulaires et une région formant le pore entre les segments S5 et S6. **B.** Les protéines TRP s'assemblent en tétramères pour former un canal perméable aux ions  $\text{Ca}^{2+}$ . Figure adaptée de (A) Clapham *et al.*, 2001 et (B) den Dekker *et al.*, 2003.

### 1.6.2 Les canaux TRP dans la signalisation des récepteurs mGluR

La stimulation des récepteurs mGluR provoque des CPSE lents dans de nombreux types cellulaires dont les cellules pyramidales de la région CA3 de l'hippocampe (Gee *et al.*, 2003), les cellules de Purkinje du cervelet (Kim *et al.*, 2003), les neurones dopaminergiques du mésencéphale (Tozzi *et al.*, 2001), les cellules pyramidales de l'amygdale latérale (Faber *et al.*, 2006) et les interneurons O/A de la région CA1 de l'hippocampe (Huang *et al.*, 2004). Ces CPSE sont tous produits par des canaux TRP.

Malgré le fait que ces courants soient tous produits par des canaux TRP, il existe de nombreuses différences entre les types cellulaires quant aux sous-types de récepteurs impliqués, aux mécanismes de régulation et aux canaux TRP activés. Le tableau 1.1

résume les caractéristiques des CPSE lents dans les différents types cellulaires énumérés plus haut.

Les mécanismes par lesquels les récepteurs mGluR activent les canaux TRP sont encore méconnus. Les récepteurs mGluR sont reconnus pour activer la voie de signalisation de la PLC via la protéine  $G\alpha_{q/11}$  (Pin & Duvoisin, 1995; Hermans & Challiss, 2001). Cette voie est d'ailleurs nécessaire aux CPSE mGluR dans les cellules pyramidales de l'amygdale latérale (Faber *et al.*, 2006). Cependant, l'activité de la PLC ne semble pas requise dans d'autres types cellulaires tels que les neurones dopaminergiques du mésencéphale (Tozzi *et al.*, 2001) et les cellules de Purkinje (Hirono *et al.*, 1998; Tempia *et al.*, 1998; Canepari & Ogden, 2003). Certains travaux montrent même un mécanisme indépendant des protéines G hétérotrimériques dans les cellules pyramidales de la région CA3 (Heuss *et al.*, 1999) et dans les interneurones O/A de la région CA1 (Gee & Lacaille, 2004).

Des études utilisant des inhibiteurs pharmacologiques des différentes voies de signalisation intracellulaires ont permis d'identifier d'autres molécules impliquées dans la régulation des canaux TRP. Les inhibiteurs des tyrosines kinases de la famille Src, diminuent les CPSE mGluR dans les cellules pyramidales de la région CA3 (Heuss *et al.*, 1999), dans les neurones dopaminergiques du mésencéphale (Tozzi *et al.*, 2001) et dans les interneurones O/A de la région CA1 (Topolnik *et al.*, 2006), mais ils potentialisent ces réponses dans les cellules de Purkinje (Canepari & Ogden, 2003). En revanche, les inhibiteurs des tyrosines phosphatases inhibent les CPSE mGluR dans les cellules de Purkinje suggérant une modulation bidirectionnelle par la régulation de la phosphorylation sur les résidus tyrosine (Canepari & Ogden, 2003). Les inhibiteurs d'ERK diminuent également les CPSE mGluR dans les interneurones O/A de la région CA1. Suite à l'observation d'une activation d'ERK dépendante de Src et de mGluR1a, une voie de signalisation mGluR1a  $\rightarrow$  Src  $\rightarrow$  ERK  $\rightarrow$  TRP a été proposée. Cette cascade de signalisation serait spécifique au récepteur mGluR1a et ne serait pas activée par le récepteur mGluR5 aussi exprimé par ces cellules (Topolnik *et al.*, 2006).

### 1.6.3 Rôle des canaux TRP dans la plasticité synaptique des interneurons O/A

L'induction de la PLT et de la DLT requiert une hausse de la concentration cytoplasmique de  $\text{Ca}^{2+}$  dans plusieurs types cellulaires dont les interneurons O/A de la région CA1 de l'hippocampe (Lapointe *et al.*, 2004). Dans ces cellules, la stimulation des récepteurs mGluR1a produit un signal calcique nécessaire à l'induction de la PLT (Perez *et al.*, 2001; Lapointe *et al.*, 2004; Topolnik *et al.*, 2006). Cette hausse de la concentration intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$  est produite par deux phénomènes distincts : la libération à partir des réserves intracellulaires et l'entrée via les canaux TRP de la membrane plasmique. Ce dernier mécanisme semble être la source principale de  $\text{Ca}^{2+}$ . En effet, l'application d'un antagoniste des canaux TRP produit une diminution marquée des signaux calciques tandis que la déplétion des réserves par un inhibiteur de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase du RE ne produit qu'une faible diminution de ces réponses. De plus, le blocage des canaux TRP empêche l'induction de la PLT tandis que la déplétion des réserves intracellulaires n'a aucun effet. Par leur perméabilité aux ions  $\text{Ca}^{2+}$ , les canaux TRP permettent donc l'induction de la PLT dépendante des récepteurs mGluR1a aux synapses excitatrices des interneurons O/A (Topolnik *et al.*, 2006). Un mécanisme similaire pourrait être à l'origine de l'induction de la DLT dans les cellules de Purkinje du cervelet (Kim *et al.*, 2003).

### 1.6.4 La famille TRPC

L'absence actuelle d'antagonistes bloquant spécifiquement certains TRP complique l'identification des membres responsables des CPSE mGluR. Cependant, plusieurs membres de la famille TRPC sont exprimés à des niveaux élevés dans le cerveau et leurs mécanismes de régulation suggèrent qu'ils pourraient être impliqués dans la signalisation des récepteurs métabotropes (Venkatachalam & Montell, 2007).

La famille des canaux TRPC comprend sept membres nommés TRPC1 à TRPC7 (Montell *et al.*, 2002). Chez l'humain, on ne compte que six membres, car TRPC2 est un pseudogène (Wes *et al.*, 1995). Les TRPC sont eux-mêmes classés en trois groupes selon leur degré d'homologie : TRPC1/4/5, TRPC3/6/7 et TRPC2. D'autres auteurs classent TRPC1 dans un quatrième groupe. Certains membres comme TRPC1

sont ubiquitaires tandis que d'autres, comme TRPC5, sont principalement exprimés dans le système nerveux (Venkatachalam & Montell, 2007). Les tissus possédant les plus hauts niveaux d'expression de chacun des TRPC sont indiqués dans le tableau 1.2.

Les TRPC s'assemblent en homo- ou hétérotétramères pour former des canaux non sélectifs perméables aux ions  $\text{Ca}^{2+}$ . Cette association semble se faire de façon préférentielle entre les membres les plus apparentés (Goel *et al.*, 2002; Hofmann *et al.*, 2002; Schaefer, 2005). Cette règle n'est toutefois pas absolue, car des interactions entre les membres de familles différentes ont été rapportées (Bai *et al.*, 2008). L'hétéromérisation des canaux TRPC forme des canaux possédant des propriétés distinctes des canaux homomériques. Par exemple, les canaux hétéromériques formés par les sous-unités TRPC1 et TRPC5 ont un mécanisme d'activation semblable à celui de TRPC5, mais des propriétés électrophysiologiques différentes des homomères de TRPC1 et de TRPC5 (Strubing *et al.*, 2001).

#### *1.6.4.1 Expression des canaux TRPC dans le cerveau*

Plusieurs études rapportent que les ARN messagers (ARNm) et les protéines des différents membres de la famille TRPC sont tous, à l'exception de TRPC2, présents dans l'hippocampe chez les rongeurs (Philipp *et al.*, 1998; Liman *et al.*, 1999; Strubing *et al.*, 2001; von Bohlen Und Halbach *et al.*, 2005; Chung *et al.*, 2006; Fowler *et al.*, 2007; Zechel *et al.*, 2007). Les niveaux d'expression, la localisation cellulaire et subcellulaire semble cependant varier d'un membre à l'autre. De façon générale, ces études ont mis l'accent sur les cellules pyramidales. Une seule rapporte l'expression des TRPC1, 4 et 5 dans certains interneurons de la couche O/A de la région CA1 (Chung *et al.*, 2006). Ces travaux n'ont cependant pas pu établir leur localisation subcellulaire précise.

Des études d'expression des TRPC ont également été menées dans d'autres régions du cerveau où des CPSE mGluR sont présents. La microscopie électronique a permis de mettre en évidence la colocalisation de mGluR1a et de TRPC1 à la densité

postsynaptique des cellules de Purkinje (Kim *et al.*, 2003). Dans les neurones dopaminergiques de la substance noire, une étude en RT-PCR sur cellule unique a montré la présence des ARNm des TRPC1, 3, 4, 5 et 6 (Bengtson *et al.*, 2004). Des études d'immunolocalisation ont ensuite permis de déterminer que TRPC1 et TRPC6 sont présents dans le corps cellulaire et les dendrites où ils colocalisent avec mGluR1a. De plus, TRPC1 est présent à la densité postsynaptique, mais aussi à la membrane du RE (Martorana *et al.*, 2006; Giampa *et al.*, 2007). TRPC5 est également présent dans ces cellules, mais sa distribution semble limitée au noyau (De March *et al.*, 2006). Dans les cellules pyramidales de l'hippocampe et de l'amygdale, une distribution préférentielle de TRPC1 au niveau dendritique et de TRPC5 au niveau somatique est également rapportée (von Bohlen Und Halbach *et al.*, 2005; Chung *et al.*, 2006).

Les interactions entre les récepteurs mGluR et les canaux TRPC ont également été étudiées d'un point de vue moléculaire en utilisant la co-immunoprécipitation. mGluR1a s'associe avec TRPC1 lorsque ces deux protéines sont surexprimées dans des cellules CHO. Cette interaction ne semble pas se produire avec les autres membres de la famille TRPC. De plus, aucun TRPC ne semble s'associer avec le récepteur mGluR5 dans ces cellules. In vivo, mGluR1a interagit avec TRPC1 dans le cervelet (Kim *et al.*, 2003).

#### 1.6.4.2 Mécanismes d'activation des canaux TRPC

Il est généralement admis que les TRPC requièrent la voie de signalisation de la phospholipase C (PLC) pour leur activation. Il y a cependant des variations dans les mécanismes couplant la PLC avec l'activation du canal. Les différents mécanismes d'activation proposés pour chacun des TRPC sont énumérés dans le tableau 1.2.

La stimulation d'un récepteur couplé aux protéines  $G\alpha_{q/11}$  ou d'un récepteur tyrosine kinase, recrute la PLC à la membrane plasmique et provoque l'hydrolyse des phospholipides membranaires produisant ainsi de l'inositol-1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>) et du diacylglycérol (DAG). Dans la plupart des types cellulaires, l'IP<sub>3</sub> produit une

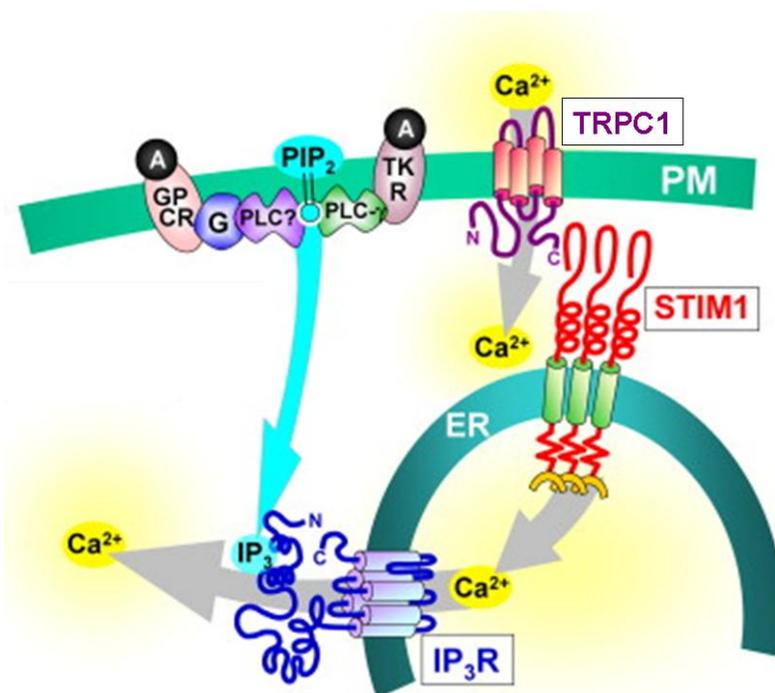
libération des ions  $\text{Ca}^{2+}$  du réticulum endoplasmique (RE) et une entrée subséquente de  $\text{Ca}^{2+}$  à partir de canaux membranaires. Cette entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  a été nommée *store-operated calcium entry* (Clapham *et al.*, 2001). D'un point de vue expérimental, elle peut être provoquée par la déplétion passive des réserves intracellulaires de  $\text{Ca}^{2+}$  produite par l'application de thapsigargine, un inhibiteur de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase du RE. Tous les TRPC, sauf TRPC2, peuvent être activés de cette façon. Une hypothèse concernant ce mécanisme d'activation est que les canaux seraient activés par un mécanisme de couplage conformationnel avec les deux types de canaux libérant le  $\text{Ca}^{2+}$  du RE, c'est-à-dire les récepteurs de l' $\text{IP}_3$  ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) (Boulay *et al.*, 1999; Kiselyov *et al.*, 1999) et les récepteurs de la ryanodine (RyR) (Kiselyov *et al.*, 2000). Ce couplage dépendrait des protéines de la famille Homer (Yuan *et al.*, 2003).

Un autre mécanisme par lequel la PLC pourrait activer les canaux TRPC est la production de seconds messagers et ce, indépendamment de l'état des réserves de  $\text{Ca}^{2+}$ . Ce mécanisme a été nommé *receptor-operated calcium entry* (Clapham *et al.*, 2001). Les TRPC 2, 3, 6 et 7 sont directement activés par le DAG. TRPC 4 et 5 peuvent également être activés par la stimulation de récepteurs, mais ils ne sont pas activés par le DAG, ce qui suggère l'existence d'autres seconds messagers dont l'identité est encore inconnue (Venkatachalam & Montell, 2007).

La stimulation d'un récepteur peut également provoquer l'activation des canaux TRPC par exocytose. Par exemple, l'*epidermal growth factor* (EGF) produit la phosphorylation de TRPC4 sur des résidus tyrosine par la kinase Src, ce qui permet son interaction avec la protéine d'échafaudage NHERF et son insertion membranaire (Odell *et al.*, 2005).

Récemment, des travaux ont suggéré un nouveau mécanisme de régulation des canaux TRPC. La protéine *stromal interacting molecule 1* (STIM1) est une protéine de la membrane du RE dont le domaine luminal agit comme senseur de  $\text{Ca}^{2+}$ , permettant ainsi la détection du contenu du RE. Suite à la déplétion du RE, STIM1 se multimérise et forme des agrégats dans des régions du RE en apposition étroite avec

la membrane plasmique où elle interagit avec les canaux responsables du *store-operated calcium entry* pour provoquer leur ouverture (Fig. 1.7) (Liou *et al.*, 2005; Roos *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2006). Ce mécanisme de régulation a été démontré pour TRPC1. La suppression de l'expression de STIM1 ou la surexpression d'un dominant négatif ne pouvant interagir avec TRPC1 inhibe l'activation de ce canal. Inversement, la surexpression d'un mutant de STIM1 qui se multimérise de façon constitutive active TRPC1 et augmente son activité spontanée (Huang *et al.*, 2006). TRPC 4 et 5 interagissent aussi avec STIM1 et sont régulés par le même mécanisme que TRPC1. STIM1 n'interagit pas avec TRPC3 et 6, mais il régule indirectement leur fonction en permettant l'hétéromérisation de TRPC3 avec TRPC1 et de TRPC6 avec TRPC4. Ce nouveau modèle permettrait d'expliquer la coexistence des mécanismes de type *store-operated* et *receptor-operated calcium entry*. En l'absence de STIM1, TRPC3 et 6 fonctionnent comme des canaux de type *receptor-operated* tandis qu'en présence de niveaux suffisants de STIM1, TRPC 3 et 6 s'associeraient avec d'autres TRPC pour former des canaux de type *store-operated* (Yuan *et al.*, 2007).



**Figure 1.7**

**Illustration du mécanisme d'ouverture du canal TRPC1 suivant la stimulation d'un récepteur métabotrope.** (A) agoniste, (GPCR) récepteur couplé aux protéines G, (TKR) récepteur tyrosine kinase, (PM) membrane plasmique, (ER) réticulum endoplasmique. Figure adaptée de Hewavitharana *et al.*, 2007.

**Tableau 1.1 Comparaison des CPSE mGluR dans différents types neuronaux**

Neurones	Récepteurs	Canaux TRP	Voies de signalisation impliquées	Voies de signalisation non impliquées	Références
Interneurones O/A du CA1	mGluR1a <sup>1</sup>	?	Src <sup>3</sup> ERK <sup>3</sup>	Protéines G <sup>2</sup> PLC <sup>2</sup> PKC <sup>2</sup>	<sup>1</sup> Huang <i>et al.</i> , 2004 <sup>2</sup> Gee & Lacaille, 2004 <sup>3</sup> Topolnik <i>et al.</i> , 2006
Neurones dopaminergiques de la substance noire	mGluR1a <sup>4</sup>	?	Protéines G <sup>4</sup> Tyrosine kinases <sup>4</sup>	PLC <sup>4</sup> ERK <sup>4</sup>	<sup>4</sup> Tozzi <i>et al.</i> , 2001
Cellules de Purkinje du cervelet	mGluR1a <sup>6,8</sup>	TRPC1 <sup>10</sup>	PLC <sup>5</sup> Protéines G <sup>5,6,7,9</sup> Tyrosine phosphatases (↑) <sup>9</sup> Src (↓) <sup>9</sup>	PLC <sup>6,7,9</sup> PKC <sup>6,9</sup> PKA <sup>9</sup> PKG <sup>9</sup>	<sup>5</sup> Netzeband <i>et al.</i> , 1997 <sup>6</sup> Tempia <i>et al.</i> , 1998 <sup>7</sup> Hirono <i>et al.</i> , 1998 <sup>8</sup> Canepari <i>et al.</i> , 2001 <sup>9</sup> Canepari & Ogden, 2003 <sup>10</sup> Kim <i>et al.</i> , 2003
Cellules pyramidales du CA3	mGluR1a <sup>8</sup> mGluR5 <sup>8</sup>	?	Src <sup>11</sup> Protéines G <sup>12</sup>	Protéines G <sup>11</sup>	<sup>11</sup> Heuss & Gerber, 1999 <sup>12</sup> Gee <i>et al.</i> , 2003
Cellules pyramidales de l'amygdale latérale	mGluR1a <sup>13</sup> mGluR5 <sup>13</sup>	TRPC1 <sup>13</sup> TRPC5 <sup>13</sup>	Protéines G <sup>13</sup> PLC <sup>13</sup>		<sup>13</sup> Faber <i>et al.</i> , 2006

↑ : Modulation des réponses à la hausse

↓ : Modulation des réponses à la baisse

**Tableau 1.2 Expression et mécanismes d'activation des membres de la famille TRPC**

<b>TRPC</b>	<b>Mécanismes d'activation proposés</b>	<b>Tissus possédant les plus hauts niveaux d'expression</b>
<b>TRPC1</b>	Déplétion des réserves intracellulaires de Ca <sup>2+</sup> , couplage conformationnel, étirement mécanique	Cœur, cerveau, testicule, ovaire, foie, rate
<b>TRPC2</b>	Diacylglycérol (Marsch <i>et al.</i> )	Organe voméronasal, testicule
<b>TRPC3</b>	Déplétion des réserves intracellulaires de Ca <sup>2+</sup> Couplage conformationnel, diacylglycérol (Marsch <i>et al.</i> ), exocytose	Cerveau
<b>TRPC4</b>	Déplétion des réserves intracellulaires de Ca <sup>2+</sup> , exocytose	Cerveau, endothélium, glande surrénale, rétine, testicule
<b>TRPC5</b>	Déplétion des réserves intracellulaires de Ca <sup>2+</sup> , sphingosine-1-phosphate, exocytose	Cerveau
<b>TRPC6</b>	Couplage conformationnel, diacylglycérol (Marsch <i>et al.</i> ), phosphatidylinositol triphosphate (PIP <sub>3</sub> )	Poumon, cerveau, placenta, ovaire
<b>TRPC7</b>	Déplétion des réserves intracellulaires de Ca <sup>2+</sup> , diacylglycérol (Marsch <i>et al.</i> )	Œil, cœur, poumon

Tableau adapté de Venkatachalam & Montell, 2007.

## 1.7 OBJECTIFS DU MÉMOIRE

La stimulation des afférences excitatrices des interneurons O/A de l'hippocampe peut produire l'activation des récepteur mGluR1a (Huang *et al.*, 2004), lesquels participent à l'induction de la PLT en provoquant une entrée de  $Ca^{2+}$  via les canaux de la superfamille TRP (Topolnik *et al.*, 2006). Le(s) TRP responsables de ces réponses synaptiques ainsi que le mécanisme par lequel les récepteurs mGluR1a provoquent leur ouverture sont encore mal connus. Le but de ce mémoire était donc d'identifier le(s) TRPC impliqués dans cette forme de transmission synaptique et d'explorer les mécanismes régulant leur activité.

Pour répondre à ces objectifs, nous avons d'abord exploré l'expression des différents membres de la famille TRPC spécifiquement dans les interneurons O/A du rat par la technique de RT-PCR multiplex sur cellule unique. Après avoir identifié les TRPC exprimés par ces cellules, nous avons déterminé lesquels étaient susceptibles de participer à leurs réponses synaptiques. Pour ce faire, nous avons examiné leur localisation subcellulaire et leur interaction moléculaire avec le récepteurs mGluR1a par des expériences d'immunofluorescence et de co-immunoprécipitation. Nous avons ensuite testé directement l'implication de deux membres de la famille TRPC en pratiquant des enregistrements électrophysiologiques sur des interneurons de cultures organotypiques d'hippocampe dans lesquelles l'expression de ces canaux a été sélectivement supprimée. Finalement, nous avons utilisé une approche pharmacologique pour explorer l'un des mécanismes par lequel les récepteurs mGluR1a sont susceptibles de moduler l'activation des canaux TRPC.

Dans l'ensemble, ce mémoire a permis de mieux comprendre la transmission synaptique excitatrice des interneurons de l'hippocampe. Ces connaissances serviront entre autres à mieux saisir les mécanismes moléculaires à la base de la plasticité synaptique, un phénomène physiologique important pour l'apprentissage et la mémoire.

### **1.8 CONTRIBUTION DES COAUTEURS DE L'ARTICLE**

Ce projet de recherche a été réalisé sous la direction du Dr Jean-Claude Lacaille. L'étudiant a effectué la totalité des expériences d'immunofluorescence. Les expériences de RT-PCR ont été faites par l'étudiant, en collaboration avec Dr Joe Guillaume Pelletier. Dr Pelletier a également effectué la totalité des expériences d'électrophysiologie. Les expériences de co-immunoprécipitation et d'immunoblot ont été faites par l'étudiant, en collaboration avec Dr Isabel Laplante. Le texte du présent manuscrit a été rédigé par l'étudiant et révisé par les coauteurs. L'étudiant a réalisé les figures 2.2 à 2.5 de l'article et Dr Pelletier a réalisé les figures 2.1 et 2.6.

**CHAPITRE 2**

**LA TRANSMISSION SYNAPTIQUE EXCITATRICE LENTE DES  
INTERNEURONES HIPPOCAMPIQUES DE L'ORIENTS/ALVEUS DÉPEND  
DE TRPC1**

**TRPC1-mediated slow excitatory synaptic transmission in oriens/alveus  
hippocampal interneurons**

André Kougioumoutzakis, Joe Guillaume Pelletier, Isabel Laplante  
and Jean-Claude Lacaille

Département de physiologie, Centre de recherche en sciences neurologiques,  
Université de Montréal, C.P. 6128, Succ. Centre-ville,  
Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

Article préparé pour soumission à *The Journal of Physiology*

## ACCORD DES COAUTEURS D'UN ARTICLE

### 1. Identification de l'étudiant et du programme

André Kougioumoutzakis  
M.Sc. Sciences neurologiques

### 2. Description de l'article

Auteurs : André Kougioumoutzakis, Joe Guillaume Pelletier, Isabel Laplante et Jean-Claude Lacaille.

Titre : TRPC1-mediated slow excitatory synaptic transmission in oriens/alveus hippocampal interneurons.

Revue : The Journal of Physiology (en préparation)

### 3. Déclaration des coauteurs

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour qu'André Kougioumoutzakis inclue cet article dans son mémoire de maîtrise intitulé *Identification des canaux TRPC impliqués dans la transmission synaptique des interneurons hippocampiques chez le rat.*

Joe Guillaume Pelletier

Coauteur

Signature masquée

30 juillet 2008

Date

Isabel Laplante

Coauteur

Signature masquée

30 juillet 08

Date

**JEAN-CLAUDE LACAILLE, Ph.D.**

Coauteur

Signature masquée

30 juillet 2008

Date

## 2.1 ABSTRACT

Hippocampal interneurons play a crucial role in controlling pyramidal cell activity and this is regulated by long lasting changes in the efficacy of their synapses. In oriens/alveus (O/A) interneurons, long term potentiation (LTP) induction requires metabotropic glutamate receptor subtype 1a (mGluR1a)-evoked excitatory postsynaptic currents (EPSCs) and subsequent  $\text{Ca}^{2+}$  entry through *transient receptor potential* (TRP) channels. TRP channels involved in this form of synaptic transmission and molecular mechanisms underlying their activation are still largely unknown. We used electrophysiological recordings to show that mGluR1a-evoked EPSCs were specifically observed in O/A interneurons and that they were phospholipase C-independent. We then examined TRPC expression and their interaction with mGluR1a using RT-PCR, immunofluorescence and co-immunoprecipitation techniques. Our results showed that TRPC1 and mGluR1a associate in hippocampus and that both proteins have an overlapping distributions in dendrites of O/A interneurons. In contrast, TRPC4 seems to associate with mGluR1a only in recombinant system and their co-localization appears to be limited to the cell body of O/A interneurons. Finally, we performed recordings of interneurons in which TRPC expression was selectively suppressed by small interfering RNAs and we found that TRPC1, but not TRPC4, is an obligatory subunit of the channel that mediate mGluR1a-evoked EPSCs. This work brought new insight on molecular mechanisms underlying synaptic transmission of O/A interneurons and uncovered a potential role for TRPC1 in LTP.

## 2.2 INTRODUCTION

Interneurons of the hippocampus play a central role in information processing by precisely controlling pyramidal cells activity (Klausberger & Somogyi, 2008). Long lasting changes at interneuron synapses are thought to enhance the computational capacity of the hippocampal network (Kullmann & Lamsa, 2007). Among these changes, interneurons of the oriens/alveus (O/A) show a Hebbian form of long term potentiation (LTP) at their excitatory synapses that is dependent on metabotropic glutamate receptor subtype 1a (mGluR1a) and postsynaptic  $\text{Ca}^{2+}$  elevation (Perez *et al.*, 2001; Lapointe *et al.*, 2004). This mGluR1a-dependent LTP is specific to O/A interneurons and does not occur in interneurons of radiatum/lacunosum-moleculare (Perez *et al.*, 2001).

High frequency stimulation (HFS) of O/A interneurons afferents is known to produce mGluR1a-evoked excitatory postsynaptic currents (EPSCs) that are mediated by non-selective cationic channels of the *transient receptor potential* (TRP) family (Huang *et al.*, 2004). Moreover,  $\text{Ca}^{2+}$  entry through TRP channels following mGluR1a activation has been shown to be an essential mechanism underlying LTP induction at O/A interneuron excitatory synapses (Topolnik *et al.*, 2006). However, the current lack of pharmacological compounds that selectively block specific TRP members largely prevented the identification of TRP members involved in this form of synaptic transmission and plasticity.

At least twenty-eight members of the TRP family have been identified in mammals (Venkatachalam & Montell, 2007). Among them, the TRPC subfamily comprises seven members (TRPC1-7) that can be activated upon G-protein-coupled receptors (GPCR) stimulation, such as mGluRs, often through the phospholipase C signalling cascade (Trebak *et al.*, 2007). Members of the TRPC subfamily mediate mGluR-evoked synaptic responses in cerebellum Purkinje cells and in pyramidal cells of the lateral amygdala (Kim *et al.*, 2003; Faber *et al.*, 2006). Moreover, TRPC1 is known to physically associate with mGluR1a in cerebellum and both proteins have

overlapping subcellular localizations in neurons showing mGluR1a-evoked synaptic responses (Kim *et al.*, 2003; Martorana *et al.*, 2006). Distribution of the TRPC members has been studied in many brain areas including hippocampus (Philipp *et al.*, 1998; Liman *et al.*, 1999; Strubing *et al.*, 2001; von Bohlen Und Halbach *et al.*, 2005; Chung *et al.*, 2006; Fowler *et al.*, 2007; Zechel *et al.*, 2007), but little information is available concerning their expression and molecular interactions with mGluR1a in interneurons.

Thus our goals were to identify TRPC members that mediate mGluR1a-evoked synaptic responses in O/A interneurons and to explore molecular mechanisms underlying their activation.

## 2.3 METHODS

### 2.3.1 Acute hippocampal slices

All animal procedures conformed to the animal welfare guidelines at Université de Montréal. Three- to four-week-old Sprague-Dawley rats (Charles-River, St-Laurent, Quebec, Canada) were deeply anaesthetized with isoflurane. After decapitation, the brain was quickly removed and placed in ice-cold oxygenated sucrose solution containing (in mM): 2 KCl, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 7 MgSO<sub>4</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 10 glucose, 250 sucrose, 0.5 CaCl<sub>2</sub>. Transverse sections (300 µm) of hippocampus were obtained using a vibratome (Leica VT1000S, Germany). Slices were then allowed to recover 1 h at room temperature in oxygenated artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing (in mM): 124 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.3 MgSO<sub>4</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 10 glucose, 2.5 CaCl<sub>2</sub> before being transferred to the recording chamber.

### 2.3.2 Organotypic hippocampal slice culture and biolistic transfection

Organotypic hippocampal slice cultures were prepared and biolistically co-transfected with siRNAs and a plasmid for YFP expression as previously described (Bourdeau *et al.*, 2007). Slices were transfected after 3 d *in vitro* and used for experiments 2 d after transfection. All small interfering RNAs (siRNAs) were purchased from Dharmacon (Lafayette, CO). Commercial siControl was used as nontargeting control siRNA. TRPC1 siRNA was a combination of four target sequences whereas TRPC4 siRNA was a single sequence. All sequences are listed in Table 2.1.

### 2.3.3 Electrophysiological recordings

During experiments, slices were perfused continuously (2.5 ml min<sup>-1</sup>) with ACSF at 31-33 °C. CA1 interneurons of stratum oriens/alveus were identified with the aid of an infrared camera (70 Series, DAGE-MTI, MI) mounted on an upright microscope (Eclipse E600FN, Nikon, Japan) equipped with long-range water-immersion objective (40×, numerical aperture 0.8). YFP transfected cells recorded in organotypic slices were identified using an X-Cite120 arc lamp (EXFO Photonic Solutions Inc., Mississauga, ON, Canada). Whole-cell voltage-clamp recordings

were made from somata using a Multiclamp 700A amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA). Recording pipettes (4–5 M $\Omega$ ) were filled with a solution containing (in mM): 130 CsMeSO<sub>3</sub>, 5 CsCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 5 di-sodium phosphocreatine, 10 HEPES, 10 EGTA, 2 ATPTris, 0.4 GTPTris and 1 QX-314, pH 7.3. Cells were voltage clamped at –60 mV. Membrane currents were low-pass filtered at 2 KHz, digitized at 10 KHz and stored on a microcomputer using a data acquisition board (Digidata1440A, Axon Instruments) and pCLAMP 10.1 software (Axon Instruments).

### 2.3.4 Pharmacology

Postsynaptic currents were examined in the presence of GABAzine (5  $\mu$ M), 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX; 20  $\mu$ M), DL-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (AP-5; 50  $\mu$ M) (all from Sigma, Oakville, ON, Canada) and the glutamate transporter blocker (DL-*threo*-*b*-benzyloxyaspartic acid) (TBOA; 30  $\mu$ M) (Tocris, Ellisville, MO). All compounds were prepared as stock solutions, frozen at –20 °C, and diluted on the day of experiment. In some experiments the mGluR1a antagonist (*S*)(+)- $\alpha$ -amino-4-carboxy-2-methylbenzeneacetic acid (LY367385; 100  $\mu$ M), the TRP channel antagonist 1-2-(4-methoxyphenyl)-2-[3-(4-methoxyphenyl)propoxy]ethyl-1H-imidazole (SKF96365; 30  $\mu$ M) (both from Tocris) or the PLC inhibitor 1-[6-[[[(17 $\beta$ )-3-methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl]amino]hexyl]-1*H*-pyrrole-2,5-dione (U73122; 10  $\mu$ M) (Calbiochem, Gibbstown, NJ, USA), were added to the extracellular solution.

### 2.3.5 RT-PCR

Rat brains were dissected into HBSS (Invitrogen, Carlsbad, CA). Transverse corticohippocampal slices (600  $\mu$ m thick) were cut using a McIlwain tissue chopper (Campden Instruments, Lafayette, IN) and CA1 regions from each slice was surgically isolated under a dissection microscope.

Total RNA was isolated from 20 mg of CA1 tissue with a GenElute Mammalian Total RNA Miniprep kit (Sigma). Reverse transcription was performed with 5  $\mu$ g of

CA1 RNA using M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen) following the manufacturer's protocol. All procedures were performed under RNase free conditions. cDNAs were then amplified by PCR in separate reactions for each member of the TRPC family. Two microliters of the reverse transcription product were mixed with 0.1  $\mu$ M of each primer, 1 U of *Taq* DNA polymerase (NEB), 0.1 mM of each dNTP, and 2 mM MgSO<sub>4</sub> and amplified for 35 cycles using the following program: 93 °C, 30 s; 55 °C, 30s; 72 °C 45s. Sequences of PCR primers and expected product sizes are listed in Table 2.2. Amplification of genomic DNA was excluded by intron-overspanning location of all primers.

### 2.3.6 Multiplex single-cell RT-PCR

After whole-cell patch clamp recording of O/A interneurons from acute hippocampal slices, negative pressure was applied to the patch pipette for 10 min. After withdrawal from the slice, pipette solution (5-6  $\mu$ l) was expelled into a microtube containing the reverse transcriptase mixture: 20 U RNaseOUT (Invitrogen) and 10 mM DTT, (12  $\mu$ l final volume). Reverse transcription procedure was as described above. cDNAs were then amplified by a two-step PCR. For the first round PCR, the whole reverse transcription product was split in 2 separate tubes: the first one containing primers for TRPC 1, 4, 5, 7 and the other containing primers for TRPC 3, 6 and glial fibrillary acidic protein (GFAP). Each tube contained 0.1  $\mu$ M of each primer, 2.5 U of *Taq* DNA polymerase, 2 mM MgSO<sub>4</sub> and no dNTP were added (50  $\mu$ l final volume). PCR was run as described above for 22 cycles. For the second round PCR, amplifications were performed in seven separate reactions. Each reaction contained: 2.5  $\mu$ l of the appropriate first round PCR product, 1  $\mu$ M of each primer, 1 U of *Taq* DNA polymerase, 0.1 mM of each dNTP and 2 mM MgSO<sub>4</sub> (25  $\mu$ l final volume). PCR was run as described above for 35 cycles. For TRPC3 and GFAP, the second round PCR required semi-nested and nested PCR, respectively. The sequences of internal primers are listed in Table 2.2.

PCR products were visualized on an ethidium bromide-stained agarose gel. Positive controls using 100 ng of total CA1 RNA were carried out in parallel for each single-cell amplification. GFAP primers were added as a control for glial RNA

contamination and only cells that were GFAP negative were kept for data analysis. Controls for other contamination artefacts were performed by advancing a pipette into the slice without aspiration.

### **2.3.7 Immunoprecipitation assays**

Isolated hippocampus was homogenized (Polytron, 3 × 2 sec., setting 4) (Glenn Mills, Clifton, NJ) in ice-cold buffer containing: PBS, 1% Triton X-100, 1 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> and protease inhibitors (Cocktail inhibitor set I; Calbiochem). Homogenate was centrifuged at 20 000 g for 20 min. at 4 °C and the resulting supernatant was assayed for protein concentration using BCA (Pierce, Rockford, IL). One milligram of proteins was incubated with 2 µg of rabbit polyclonal anti-TRPC1 (Sigma) for 30 min at 4 °C. The specificity of the immunoprecipitation was controlled by preadsorption of the antibody with equivalent amount of the antigen peptide overnight at 4 °C before incubation with tissue homogenate. Immune complexes were precipitated with 50 µl of a 50% protein-G sepharose (Sigma) slurry for 90 min at 4 °C. The beads were washed three times for 10 min in PBS-1% Triton X-100 and proteins were eluted by the addition of electrophoresis sample buffer and heated at 65 °C for 7 min. Western blot detection was as previously described (Topolnik *et al.*, 2006) using rabbit polyclonal anti-mGluR1a (1/500; Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) and HRP-conjugated anti-rabbit IgG (1/10 000; Jackson Immunoresearch, West Grove, PA).

HEK-293 cells were grown and transfected as described previously (Bourdeau *et al.*, 2007). In brief, cells were cultured in 6-well dishes and transfected with 1 µg of pRK5-mGluR1a (from Dr. J.P. Pin, Montpellier), and 1 µg of pcDNA3.1-FLAG-TRPC1 (from Dr. C. Montell, Baltimore) or pcDNA3.1-myc-TRPC4 (from Dr. L. Méry, Paris) constructs. Two days after transfection, cells were collected in lysis buffer containing: 50 mM Tris pH 7.4, 120 mM NaCl, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 1 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> and protease inhibitors. One well of confluent cells were used for each immunoprecipitation assay. Cleared supernatants were incubated with 2 µg of anti-FLAG (Sigma) or anti-mGluR1a (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY). The rest of the procedure was the same as described above. The specificity of

the immunoprecipitation was controlled by omitting to transfect the construct coding the immunoprecipitated protein. Western blot detection was performed using rabbit polyclonal anti-mGluR1a or mouse monoclonal anti-myc (1/5000, Sigma) and HRP-conjugated anti-rabbit or anti-mouse IgGs.

### **2.3.8 TRPC1 and mGluR1a double-label immunofluorescence**

Eighteen- to twenty-one-day-old rats were deeply anaesthetized intra-peritoneally with sodium pentobarbital (MTC Pharmaceuticals, Cambridge, Ontario, Canada) and perfused intracardially with a fixative solution containing 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.4). The brain was dissected, postfixed for 4 h at room temperature and cryoprotected overnight in 30% sucrose. Transversal sections (45  $\mu$ m) were cut on a freezing microtome (Leica SM 2000R, Germany). Free floating sections were permeabilized 15 min in PBS-0.2% Triton X-100 and blocked 1 h at room temperature in PBS containing 10% NGS and 0.1% Triton X-100. Sections were incubated 4 d at 4 °C in a mixture of mouse monoclonal anti-mGluR1a (1/100 BD BioSciences, Oakville, ON, Canada) and rabbit polyclonal anti-TRPC1 (1/250) or rabbit anti-TRPC4 (1/100; Alomone Labs, Jerusalem, Israel). Sections were incubated 1h30 at room temperature in biotinylated goat anti-rabbit IgG (1/200, Jackson ImmunoResearch) and overnight at 4 °C in a mixture of Streptavidin-Alexa Fluor 488 (1/200, Invitrogen) and Texas Red conjugated goat anti-mouse (1/200; Jackson ImmunoResearch). Sections were thoroughly rinsed between incubations. All antibodies were diluted in PBS containing 2% NGS and 0.1% Triton X-100 (0.01% NaN<sub>3</sub> was added for primary antibodies). Sections were mounted in ProLong Gold antifade reagent (Invitrogen) and observed with a Zeiss LSM 510 confocal microscope system (Axioskop; Coherent, Santa Clara, CA) using appropriate filters.

### **2.3.9 Western blots**

For siRNA efficacy assessment, slices were homogenized by sonication in 50  $\mu$ l of homogenization buffer containing: 50 mM Tris pH 7.4, 120 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 2 mM EDTA, 1mM NaF, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> and protease inhibitors. The homogenate was then centrifuged at 20 000 g for 20 min and protein concentration in the supernatant was determined as described above.

Fifty micrograms of proteins per condition were subjected to western blot analysis as previously described (Topolnik *et al.*, 2006). Membrane was horizontally cut (~60 kDa molecular weight) to separate higher and lower molecular weight proteins. Top membrane was probed with rabbit polyclonal anti-TRPC1 (1/200) while bottom membrane was probed with mouse monoclonal anti-actin (1/1000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). After immunodetection, top membrane was stripped and reprobed with anti-TRPC4 (1/1000; Alomone, Jerusalem, Israel). Immunoreactive bands were scanned with a desktop scanner and quantified with Quantity One software (Bio-Rad, Hercules, CA). The optical density of TRPC1 or TRPC4 was normalized to actin. Slices transfected with TRPC1 or TRPC4 siRNA were compared with slices transfected with scrambled siRNA. Summary data are expressed as mean  $\pm$  s.e.m. Statistical significance was determined using a two-tailed Student's *t* test.

## 2.4 RESULTS

### 2.4.1 mGluR1a-evoked EPSCs are independent of PLC pathway

In O/A interneurons, a brief high-frequency stimulation (HFS) can elicit slow excitatory postsynaptic currents (EPSCs) mediated by mGluR1a and TRP channels (Huang *et al.*, 2004). Previous reports suggest that these EPSCs are independent of the phospholipase C (PLC) pathway classically linked to group I mGluRs (Gee & Lacaille, 2004). We thus examined if mGluR1a-evoked EPSCs are sensitive to pharmacological blockade of PLC. To increase these EPSCs, we briefly depolarized interneurons before stimulation (to allow  $\text{Ca}^{2+}$  influx through voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels) and we blocked glutamate transporters with TBOA (to enhance glutamate spillover to perisynaptic mGluR1a) (Huang *et al.*, 2004). In O/A interneurons of acutely prepared slices, HFS applied in presence of TBOA evoked slow EPSCs (Fig. 2.1A;  $953,74 \pm 53,18$  pA) that were reduced by bath application of the TRP channel antagonist SKF96365 ( $41 \pm 12$  % of control;  $p < 0.05$ ) and partially recovered after antagonist washout ( $61 \pm 15$  % of control). Conversely, when the PLC inhibitor U73122 was bath applied, no effect was seen on mGluR1a-evoked EPSCs (Fig. 2.1B;  $109 \pm 4$  % of control;  $p > 0.05$ ). Under the same conditions, similar EPSCs were observed in O/A interneurons of organotypic slices (Fig. 2.1C;  $831,5 \pm 498,4$  pA) and they were also blocked by SKF ( $48,13 \pm 37,48$  pA;  $p < 0.05$ ).

Interneurons from stratum radiatum/lacunosum-moleculare only have minimal mGluR1/5-evoked depolarizations and calcium transients following agonist application (Woodhall *et al.*, 1999). We thus examined if TRP-mediated EPSCs could be synaptically evoked in these cells. HFS evoked EPSCs approximately 100-fold smaller than in O/A interneurons (Fig. 2.1C;  $16,5 \pm 9,73$  pA). These currents were not significantly decreased by SKF96365. These results indicate that mGluR1a-evoked EPSCs are specifically present in O/A interneurons of both acute and organotypic slices and that these TRP channel-mediated currents are not activated by the PLC pathway.

#### **2.4.2 TRPC mRNA expression in CA1 region and in single O/A interneurons**

Among the TRP channel superfamily, TRPCs are a subfamily of channels that are highly expressed in brain and they can be activated upon receptor stimulation (Montell, 2005). Moreover, TRPCs are involved in mGluR1-evoked slow excitatory synaptic responses in cerebellar Purkinje cells (Kim *et al.*, 2003). We thus investigated mRNA expression of the seven TRPC members (TRPC1-7) in CA1 hippocampal region and in single O/A interneurons. Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) detection of TRPC mRNAs was first performed on total RNA isolated from whole CA1 region. TRPC1, 3, 4, 5, 6 and 7 mRNAs were found to be expressed (Fig. 2.2A). We then performed simultaneous detection of these six TRPC mRNAs in O/A interneurons. After electrophysiological recording of mGluR1a-evoked EPSCs, interneuron cytoplasm was harvested into the patch pipette and multiplex single-cell RT-PCR was performed. Except for TRPC3, all TRPC mRNAs that were present in whole CA1 could also be detected in single O/A interneurons in which mGluR1a-evoked EPSCs were observed (Fig. 2.2B). Not all of them were always detected in the same cell and different combinations of TRPC transcripts were observed (ex. Fig. 2.2C). TRPC3 mRNA was probed in three cells with mGluR1a-evoked EPSCs, but it was also absent in another three O/A interneurons for which mGluR1a-evoked EPSCs were not tested (data not shown). These data indicate that O/A interneurons can express at least five TRPC mRNAs in various combinations.

#### **2.4.3 mGluR1a physically associates with TRPC1 and TRPC4 in HEK-293 cells and with TRPC1 in hippocampus**

Among the TRPC family, TRPC1 has been shown to mediate mGluR1a-evoked EPSCs in Purkinje cells (Kim *et al.*, 2003). We thus decided to focus our study on TRPC1 and on TRPC4, another member of the TRPC family that is susceptible of interacting with TRPC1 *in vivo* (Goel *et al.*, 2002). In cerebellum, mGluR1a and TRPC1 physically interact, supporting the fact that mGluR1a activates TRPC1 (Kim *et al.*, 2003). To determine if mGluR1a physically associates with other members of the TRPC family, we performed co-immunoprecipitation assays on HEK-293 cells

transiently transfected with mGluR1a along with FLAG-TRPC1 or myc-TRPC4 (Fig. 2.3A). Immunodetection of mGluR1a following immunoprecipitation of TRPC1 with FLAG antibody revealed that both proteins are physically associated. No signal was detected when the TRPC1 protein was not transfected. Similarly, immunoprecipitation of mGluR1a using a specific antibody against this receptor gave a positive signal on western blot for myc-TRPC4 using myc antibody. Again, no signal was detected when the cells were not transfected with mGluR1a. We then examined whether these interactions occur *in vivo* by assaying co-immunoprecipitation of mGluR1a from hippocampus extract using a TRPC1 antibody (Fig. 2.3B). We found that TRPC1 antibody co-immunoprecipitated mGluR1a and this signal was decreased by preadsorption of the antibody with a blocking peptide, confirming the specificity of TRPC1 antibody. Same experiment was performed with TRPC4 antibody, but we were unable to detect any positive signal for mGluR1a (data not shown). These results show that TRPC1 and TRPC4 can interact with mGluR1a *in vitro*, while in hippocampus, TRPC1 is associated with this receptor.

#### **2.4.4 TRPC1 and TRPC4 co-localize with mGluR1a in O/A interneurons**

To determine whether an interaction between mGluR1a and TRPC1 or TRPC4 could occur in O/A interneurons, we performed double-label immunofluorescence in hippocampus using antibodies against mGluR1a and either TRPC1 or TRPC4 (Fig. 2.4). TRPC1 antibody labelled neuronal processes in stratum oriens/alveus as well as cell body of interneurons, consistent with previous data (Chung *et al.*, 2006). In some cases, we were able to distinguish O/A interneuron dendrites from surrounding processes and these dendrites were positive for TRPC1 (Fig. 2.4A, left; 2.4B, top). The mGluR1a antibody also labelled O/A interneurons and their dendrites (Fig. 2.4A-B, middle), consistent with previous data (Baude *et al.*, 1993). Superimposition of the two labels showed co-localization of mGluR1a and TRPC1 in cell bodies and dendrites of O/A interneurons (Fig. 2.4A, right; 2.4B, bottom). TRPC4 labelling was also present in O/A interneurons but appeared limited to the cell body (Fig. 2.4C, left). TRPC4 was also co-localized with mGluR1a (Fig. 2.4C, right). These results

show that TRPC1 has an overlapping distribution with mGluR1a in the cell body and dendrites of O/A interneurons while TRPC4 co-localization is found mostly in the cell body.

#### **2.4.5 TRPC1, but not TRPC4, is necessary for mGluR1a-dependent EPSCs in O/A interneurons**

We then examined whether TRPC1 or TRPC4 mediate mGluR1a-evoked EPSCs in O/A interneurons by suppressing their expression using biolistic transfection of small interfering RNA (siRNA) in hippocampal organotypic cultured slices. Transfection of siRNA targeting TRPC1 (siTRPC1) (Fig. 2.5) reduced Western blot detection of total TRPC1 ( $59 \pm 13\%$  of control siRNA;  $p < 0.05$ ) but not TRPC4 ( $92 \pm 20\%$  of control siRNA;  $p > 0.05$ ;  $n = 3$ ), when compared with slices transfected with scrambled siRNA (siCTL). Conversely, transfection of siRNA targeting TRPC4 (siTRPC4) reduced TRPC4 expression ( $67 \pm 10\%$  of control siRNA;  $p < 0.05$ ), but not TRPC1 ( $100 \pm 17\%$  of control siRNA;  $p > 0.05$ ). These results confirm the specific protein knock-down of the respective target of siRNAs.

We then examined the effect of siRNA transfection on mGluR1a-evoked EPSCs in YFP-expressing O/A interneurons (Fig. 2.6). In cells transfected with TRPC1 siRNA, mGluR1a-evoked EPSCs were reduced when compared with siCTL-transfected interneurons (Fig. 2.6B-C;  $4 \pm 3\%$  of siCTL,  $p < 0.05$ ). In contrast, TRPC4 siRNA transfection did not affect mGluR1a-evoked EPSCs (Fig. 2.6B-C;  $112 \pm 18\%$  of siCTL;  $p > 0.05$ ). To rule out any unspecific effect of siRNAs on glutamatergic synaptic transmission, we examined fast ionotropic glutamate receptor-mediated EPSCs. A single stimulus delivered before bath application of ionotropic glutamate receptor antagonists CNQX and AP-5 evoked fast EPSCs in cells from all groups (Fig. 2.6B, left traces).

## 2.5 DISCUSSION

In this article, we show that TRP channel-mediated mGluR1a synaptic currents can be evoked specifically in O/A interneurons of both acute and organotypic hippocampal slices and that these EPSCs do not depend on the PLC pathway. Transcripts of six of the seven TRPC members are present in the CA1 region and O/A interneurons can express at least five of them in different combinations (TRPC1, 4-7). TRPC1 protein co-localizes with mGluR1a in cell body and dendrites of O/A interneurons while TRPC4 seems to overlap with mGluR1a mostly in the cell body. Molecular interactions occur between mGluR1a and TRPC1 in HEK-293 cells and in hippocampus, but association of mGluR1a with TRPC4 was only observed in HEK-293. Finally, specific protein knock-down by siRNA in hippocampal slice cultures revealed that TRPC1, but not TRPC4, is involved in mGluR1a-evoked EPSCs. Thus, TRPC1 plays a critical role in mediating mGluR1a-evoked synaptic responses and may be a key component in LTP induction at O/A interneuron excitatory synapses.

### 2.5.1 TRPC expression and association with mGluR1a

TRPC channels are widely expressed in brain and they mediate mGluR-dependent synaptic transmission in many cell types (Gee *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2003; Bengtson *et al.*, 2004; Huang *et al.*; Faber *et al.*, 2006). At present, no pharmacological tool allows blockade of specific members of this family. Studies that look at the expression and molecular interactions of TRPC channels with mGluRs are thus useful for the identification of TRPC members involved in this form of synaptic transmission.

RT-PCR analysis of TRPC expression revealed that, except for TRPC2, all TRPC transcripts are present in the CA1 region of hippocampus. These results are consistent with previous expression studies in rodents (Philipp *et al.*, 1998; Liman *et al.*, 1999; Strubing *et al.*, 2001; von Bohlen Und Halbach *et al.*, 2005; Chung *et al.*, 2006; Fowler *et al.*, 2007; Zechel *et al.*, 2007). However, these studies mostly focused on pyramidal cells and none of them specifically examined TRPC expression in

interneurons. Single-cell RT-PCR revealed that O/A interneurons express TRPC1, 4, 5, 6, and 7 mRNAs in various combinations. TRPC3 was not detected and, thus, this member of TRPC family may be absent or less frequent in O/A interneurons. However, given the small number of cells harvested, these results should be interpreted with caution.

Immunofluorescence labelling showed that TRPC1 protein is expressed in neuronal processes of stratum oriens/alveus, consistent with previous reports (Chung *et al.*, 2006). Our results also show that TRPC1 is present in the cell body and dendrites of O/A interneurons where it co-localizes with mGluR1a. Such overlapping localization was also shown in cerebellar Purkinje cells (Kim *et al.*, 2003) and in midbrain dopamine neurons (Martorana *et al.*, 2006) which present similar mGluR1a-evoked EPSCs. Moreover, molecular interactions between mGluR1a and TRPC1 occur in recombinant systems and in cerebellum (Kim *et al.*, 2003). Here, we show that mGluR1a associates with TRPC1 in HEK-293 cells and in hippocampus. Taken together, our findings strongly indicate the presence of both mGluR1a and TRPC1 in somato-dendritic compartment of O/A interneurons, a localization consistent with their functional interaction underlying EPSCs.

O/A interneurons also express TRPC4 protein. However, its immunolocalization appeared limited to cell body and we did not detect a molecular interaction with mGluR1a in hippocampus. These are in agreement with our finding that this channel is not required for mGluR1a-evoked EPSC in O/A interneurons. TRPC1 has previously been shown to be the only TRPC member to interact with mGluR1a in CHO cells (Kim *et al.*, 2003), however, in our hands, TRPC4 associated with mGluR1a in HEK-293 cells. This discrepancy could be explained by the variable levels expression that can be achieved in heterologous systems. Moreover, TRPC4, as well as TRPC5, may be involved in group I mGluR responses in other cell types (Faber *et al.*, 2006; Fowler *et al.*, 2007).

### 2.5.2 TRPC1 is involved in mGluR1a-evoked EPSCs in O/A interneurons

In O/A interneurons, HFS evokes a slow EPSC that is mediated by mGluR1a and TRP channels (Huang *et al.*, 2004). This EPSC is reminiscent of the previously described agonist-induced mGluR1a current, also mediated by TRP channels (Topolnik *et al.*, 2006). In this work, we showed that this current is specifically present in O/A interneurons of both acute and organotypic slices and we identified TRPC1 as an obligatory subunit of the channel mediating mGluR1a-evoked EPSCs. Similarly, TRPC1 was shown to be involved in mGluR1a-evoked EPSCs in cerebellar Purkinje cells (Kim *et al.*, 2003).

Functional TRPC channels are formed of four subunits (Clapham *et al.*, 2001) and different members of this family are thought to co-assemble *in vivo* to form heterotetrameric channels with properties distinct from homomeric channels (Strubing *et al.*, 2001). Among TRPC family, TRPC4 and TRPC5 were found to associate with TRPC1 in brain synaptosomes (Goel *et al.*, 2002). In pyramidal cells of the lateral amygdala, mixed mGluR1/5-evoked EPSCs involve both TRPC1 and TRPC5 (Faber *et al.*, 2006). Here, we show that TRPC4 is not necessary for mGluR1a-evoked EPSCs in O/A interneurons. However, other members of the TRPC family are expressed in these cells (TRPC5-7) and they could contribute to mGluR1a-evoked EPSCs by forming heteromeric channels with TRPC1.

### 2.5.3 Mechanisms underlying mGluR1a activation of TRPC1

Mechanisms involved in mGluR1a activation of TRP channels in O/A interneurons are still largely unknown. Here, we showed that mGluR1a-evoked EPSCs are independent of the PLC pathway classically linked to group I mGluRs. In cerebellar Purkinje cells and in midbrain dopamine neurons, mGluR1a-evoked currents are also PLC-independent (Tempia *et al.*, 1998; Tozzi *et al.*, 2001; Canepari & Ogden, 2003) while mixed mGluR1/5 currents in lateral amygdala are PLC-dependent (Faber *et al.*, 2006). Mechanisms underlying mGluR activation of TRP channels seem to be different across cell types and they might depend, in part, on receptor subtype and on

subunit composition of TRP channels. These variations are probably necessary to allow cell type-specific and possibly synapse-specific responses to mGluR activation.

Modulation of mGluR1a-evoked currents by Src family tyrosine kinases and extracellular signal-regulated kinase (ERK) was reported in O/A interneurons (Topolnik *et al.*, 2006). Interestingly, PLC-independent mGluR1a-evoked currents of Purkinje cells and midbrain dopamine neurons also show tyrosine kinase modulation (Tozzi *et al.*, 2001; Canepari & Ogden, 2003) and TRPV1 channel was shown to be regulated by ERK (Firner *et al.*, 2006). The role of these kinases in the gating or modulation of TRP channels in O/A interneurons has not been addressed and will be interesting to resolve.

Recently, stromal interacting molecule 1 (STIM1), a calcium sensor protein of the endoplasmic reticulum, was shown to gate TRPC1 channel upon receptor stimulation in HEK-293 cells (Huang *et al.*, 2006; Yuan *et al.*, 2007). Activation of the channel was dependent on a lysine-rich region in the cytoplasmic domain of STIM1, but the exact mechanisms of this gating remain to be elucidated. TRPC channels are also gated by conformational coupling with inositol-1,4,5-triphosphate receptors (IP<sub>3</sub>Rs) (Boulay *et al.*, 1999; Kiselyov *et al.*, 1999) and ryanodine receptors (RyRs) (Kiselyov *et al.*, 2000). This coupling is thought to be regulated by Homer proteins (Yuan *et al.*, 2003), a family of proteins that also interact with mGluR1a (Worley *et al.*, 2007). Further investigations will be required to determine if these mechanisms underlie mGluR1a activation of TRPC1 in O/A interneurons.

#### **2.5.4 Functional implications**

O/A interneurons express an mGluR1a-dependent hebbian form of long term potentiation (LTP) at their excitatory synapses (Perez *et al.*, 2001). This form of LTP requires cytoplasmic calcium elevation (Lapointe *et al.*, 2004). In O/A interneurons, cytoplasmic calcium following mGluR1a activation arises from two different sources: entry through plasma membrane TRP channels and release from intracellular stores (Topolnik *et al.*, 2006). The first one was shown to be the main component of

mGluR1a-evoked calcium transients and it is required for LTP induction. mGluR1a-evoked EPSCs are thus likely to participate in LTP induction by allowing calcium influx through TRP channels. This mechanism of induction seems to be cell type-specific, as interneurons of stratum radiatum and lacunosum-moleculare, which only display minimal mGluR1a-evoked EPSCs and calcium transients (Carmant *et al.*, 1997; Woodhall *et al.*, 1999), have different mechanisms of LTP induction (Perez *et al.*, 2001; Lamsa *et al.*, 2005). Here, we show that mGluR1a-evoked EPSCs in O/A interneurons are dependent on TRPC1, uncovering a new role for this channel in hippocampal synaptic transmission. Further investigations will determine if this TRPC member is also involved in LTP induction in these interneurons.

In conclusion, O/A interneurons express numerous members of the TRPC channel family. Among them, TRPC1 plays a critical role in mediating mGluR1a-evoked EPSCs and may therefore be a key component of LTP induction at interneuron excitatory synapses.

## 2.6 REFERENCES

- Baude A, Nusser Z, Roberts JD, Mulvihill E, McIlhinney RA & Somogyi P. (1993). The metabotropic glutamate receptor (mGluR1 alpha) is concentrated at perisynaptic membrane of neuronal subpopulations as detected by immunogold reaction. *Neuron* **11**, 771-787.
- Bengtson CP, Tozzi A, Bernardi G & Mercuri NB. (2004). Transient receptor potential-like channels mediate metabotropic glutamate receptor EPSCs in rat dopamine neurones. *J Physiol* **555**, 323-330.
- Boulay G, Brown DM, Qin N, Jiang M, Dietrich A, Zhu MX, Chen Z, Birnbaumer M, Mikoshiba K & Birnbaumer L. (1999). Modulation of Ca(2+) entry by polypeptides of the inositol 1,4, 5-trisphosphate receptor (IP3R) that bind transient receptor potential (TRP): evidence for roles of TRP and IP3R in store depletion-activated Ca(2+) entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14955-14960.
- Bourdeau ML, Morin F, Laurent CE, Azzi M & Lacaille JC. (2007). Kv4.3-mediated A-type K+ currents underlie rhythmic activity in hippocampal interneurons. *J Neurosci* **27**, 1942-1953.
- Canepari M & Ogden D. (2003). Evidence for protein tyrosine phosphatase, tyrosine kinase, and G-protein regulation of the parallel fiber metabotropic slow EPSC of rat cerebellar Purkinje neurons. *J Neurosci* **23**, 4066-4071.
- Carmant L, Woodhall G, Ouardouz M, Robitaille R & Lacaille JC. (1997). Interneuron-specific Ca2+ responses linked to metabotropic and ionotropic glutamate receptors in rat hippocampal slices. *Eur J Neurosci* **9**, 1625-1635.
- Chung YH, Sun Ahn H, Kim D, Hoon Shin D, Su Kim S, Yong Kim K, Bok Lee W & Ik Cha C. (2006). Immunohistochemical study on the distribution of TRPC channels in the rat hippocampus. *Brain Res* **1085**, 132-137.
- Clapham DE, Runnels LW & Strubing C. (2001). The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci* **2**, 387-396.
- Cowan AI, Stricker C, Reece LJ & Redman SJ. (1998). Long-term plasticity at excitatory synapses on aspiny interneurons in area CA1 lacks synaptic specificity. *J Neurophysiol* **79**, 13-20.
- Faber ES, Sedlak P, Vidovic M & Sah P. (2006). Synaptic activation of transient receptor potential channels by metabotropic glutamate receptors in the lateral amygdala. *Neuroscience* **137**, 781-794.

- Firner M, Greffrath W & Treede RD. (2006). Phosphorylation of extracellular signal-related protein kinase is required for rapid facilitation of heat-induced currents in rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* **143**, 253-263.
- Fowler MA, Sidiropoulou K, Ozkan ED, Phillips CW & Cooper DC. (2007). Corticolimbic expression of TRPC4 and TRPC5 channels in the rodent brain. *PLoS ONE* **2**, e573.
- Gee CE, Benquet P & Gerber U. (2003). Group I metabotropic glutamate receptors activate a calcium-sensitive transient receptor potential-like conductance in rat hippocampus. *J Physiol* **546**, 655-664.
- Gee CE & Lacaille JC. (2004). Group I metabotropic glutamate receptor actions in oriens/alveus interneurons of rat hippocampal CA1 region. *Brain Res* **1000**, 92-101.
- Goel M, Sinkins WG & Schilling WP. (2002). Selective association of TRPC channel subunits in rat brain synaptosomes. *J Biol Chem* **277**, 48303-48310.
- Huang GN, Zeng W, Kim JY, Yuan JP, Han L, Muallem S & Worley PF. (2006). STIM1 carboxyl-terminus activates native SOC, I(crac) and TRPC1 channels. *Nat Cell Biol* **8**, 1003-1010.
- Huang YH, Sinha SR, Tanaka K, Rothstein JD & Bergles DE. (2004). Astrocyte glutamate transporters regulate metabotropic glutamate receptor-mediated excitation of hippocampal interneurons. *J Neurosci* **24**, 4551-4559.
- Kim SJ, Kim YS, Yuan JP, Petralia RS, Worley PF & Linden DJ. (2003). Activation of the TRPC1 cation channel by metabotropic glutamate receptor mGluR1. *Nature* **426**, 285-291.
- Kiselyov K, Mignery GA, Zhu MX & Muallem S. (1999). The N-terminal domain of the IP3 receptor gates store-operated hTrp3 channels. *Mol Cell* **4**, 423-429.
- Kiselyov KI, Shin DM, Wang Y, Pessah IN, Allen PD & Muallem S. (2000). Gating of store-operated channels by conformational coupling to ryanodine receptors. *Mol Cell* **6**, 421-431.
- Klausberger T & Somogyi P. (2008). Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science* **321**, 53-57.
- Kullmann DM & Lamsa KP. (2007). Long-term synaptic plasticity in hippocampal interneurons. *Nat Rev Neurosci* **8**, 687-699.

- Lamsa K, Heeroma JH & Kullmann DM. (2005). Hebbian LTP in feed-forward inhibitory interneurons and the temporal fidelity of input discrimination. *Nat Neurosci* **8**, 916-924.
- Lapointe V, Morin F, Ratte S, Croce A, Conquet F & Lacaille JC. (2004). Synapse-specific mGluR1-dependent long-term potentiation in interneurons regulates mouse hippocampal inhibition. *J Physiol* **555**, 125-135.
- Liman ER, Corey DP & Dulac C. (1999). TRP2: a candidate transduction channel for mammalian pheromone sensory signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 5791-5796.
- Martorana A, Giampa C, DeMarch Z, Viscomi MT, Patassini S, Sancesario G, Bernardi G & Fusco FR. (2006). Distribution of TRPC1 receptors in dendrites of rat substantia nigra: a confocal and electron microscopy study. *Eur J Neurosci* **24**, 732-738.
- Montell C. (2005). The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE* **2005**, re3.
- Ouardouz M & Lacaille JC. (1995). Mechanisms of selective long-term potentiation of excitatory synapses in stratum oriens/alveus interneurons of rat hippocampal slices. *J Neurophysiol* **73**, 810-819.
- Perez Y, Morin F & Lacaille JC. (2001). A hebbian form of long-term potentiation dependent on mGluR1a in hippocampal inhibitory interneurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9401-9406.
- 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**, 4274-4282.
- Strubing C, Krapivinsky G, Krapivinsky L & Clapham DE. (2001). TRPC1 and TRPC5 form a novel cation channel in mammalian brain. *Neuron* **29**, 645-655.
- Tempia F, Miniaci MC, Anchisi D & Strata P. (1998). Postsynaptic current mediated by metabotropic glutamate receptors in cerebellar Purkinje cells. *J Neurophysiol* **80**, 520-528.
- Topolnik L, Azzi M, Morin F, Kougioumoutzakis A & Lacaille JC. (2006). mGluR1/5 subtype-specific calcium signalling and induction of long-term potentiation in rat hippocampal oriens/alveus interneurons. *J Physiol* **575**, 115-131.

- Tozzi A, Guatteo E, Caputi L, Bernardi G & Mercuri NB. (2001). Group I mGluRs coupled to G proteins are regulated by tyrosine kinase in dopamine neurons of the rat midbrain. *J Neurophysiol* **85**, 2490-2497.
- Trebak M, Lemonnier L, Smyth JT, Vazquez G & Putney JW, Jr. (2007). Phospholipase C-coupled receptors and activation of TRPC channels. *Handb Exp Pharmacol*, 593-614.
- Venkatachalam K & Montell C. (2007). TRP channels. *Annu Rev Biochem* **76**, 387-417.
- von Bohlen Und Halbach O, Hinz U, Unsicker K & Egorov AV. (2005). Distribution of TRPC1 and TRPC5 in medial temporal lobe structures of mice. *Cell Tissue Res* **322**, 201-206.
- Woodhall G, Gee CE, Robitaille R & Lacaille JC. (1999). Membrane potential and intracellular Ca<sup>2+</sup> oscillations activated by mGluRs in hippocampal stratum oriens/alveus interneurons. *J Neurophysiol* **81**, 371-382.
- Worley PF, Zeng W, Huang G, Kim JY, Shin DM, Kim MS, Yuan JP, Kiselyov K & Muallem S. (2007). Homer proteins in Ca<sup>2+</sup> signaling by excitable and non-excitable cells. *Cell Calcium* **42**, 363-371.
- Yuan JP, Kiselyov K, Shin DM, Chen J, Shcheynikov N, Kang SH, Dehoff MH, Schwarz MK, Seeburg PH, Muallem S & Worley PF. (2003). Homer binds TRPC family channels and is required for gating of TRPC1 by IP3 receptors. *Cell* **114**, 777-789.
- Yuan JP, Zeng W, Huang GN, Worley PF & Muallem S. (2007). STIM1 heteromultimerizes TRPC channels to determine their function as store-operated channels. *Nat Cell Biol* **9**, 636-645.
- Zechel S, Werner S & von Bohlen Und Halbach O. (2007). Distribution of TRPC4 in developing and adult murine brain. *Cell Tissue Res* **328**, 651-656.

## 2.7 TABLES

**Table 2.1 Small interfering RNA sequences**

Target	Sense (5' to 3')	Antisense (5' to 3')
TRPC1	GAACAUAAAUUGCGUAG	PAUCUACGCAAUUUAUGU
	AUUU	UCUU
	GGACUACGGUUGUCAGA	PUUUCUGACAACCGUAGUC
	AAUU	CUU
	GAAUUUAAGUCGUCUGA	PUUUCAGACGACUUAAAU
	AAUU	UCUU
	UGAACUUAGUGCUGACU	PAAAGUCAGCACUAAGUUC
UAUU	AUU	
TRPC4	GCCAUUAAGUACCGUCA	PUUUGACGGUACUUAUG
	AAUU	GCUU

**Table 2.2 PCR primers sequences and expected product size**

mRNA	Accession number	Sense primer	Antisense primer	Product size
TRPC1	NM_053558	5'-AAGAGCAGAAG GACTGCGTAG-3'	5'-GTGCTCTGCATC TTCTGTCG-3'	562 bp
TRPC2	NM_022638	5'-CCTTCGAGTCAT CAAGGCTC-3'	5'-CCTTGGTCTCCA GATCTTCC-3'	449 bp
TRPC3	NM_021771	5'-CATCTTCATTGC TGCCTTCA-3'	5'-CCACTCTACATC ACTGTCATCC-3'	622 bp
		5'-CCTGAGCGAAGT CACACTCCCAC-3' <sup>§</sup>	5'-CCACTCTACATC ACTGTCATCC-3'	529 bp
TRPC4	NM_080396	5-ATGAGGAATCTG GTGAAGCG-3'	5'-TATGTCTCTCGG AGGCAATG-3'	316 bp
TRPC5	NM_080898	5'-C(G,T)ATGTTTGG GACATACAACG-3'	5'-TGCAGCCACATA TCT(C,T)TTGAC-3'	374 bp
TRPC6	NM_053559	5'-GTGCCAAGTCCA AAGTCCCTGC-3'	5'-CTGGGCCTGCAG TACGTATC-3'	314 bp
TRPC7	XM_225159	5'-CCTGTACTCCTA CTACCGAGGTGC-3'	5'-TGGTGACATTAT AAACGCCGTAC-3'	182 bp
GFAP	NM_017009	5'-ACCTCTGCACGC CGCTCCTATG-3'	5'-TCCAGCGACTCA ACCTTCCTCT-3'	557 bp
		5'-ATTCCGCGCCTC TCCCTGTCTC-3' <sup>§§</sup>	5'-TTCATCCGCCTC CTGTCTGT-3' <sup>§§</sup>	435 bp

<sup>§</sup>: Semi-nested PCR primer

<sup>§§</sup>: Nested PCR primer

## 2.8 FIGURES

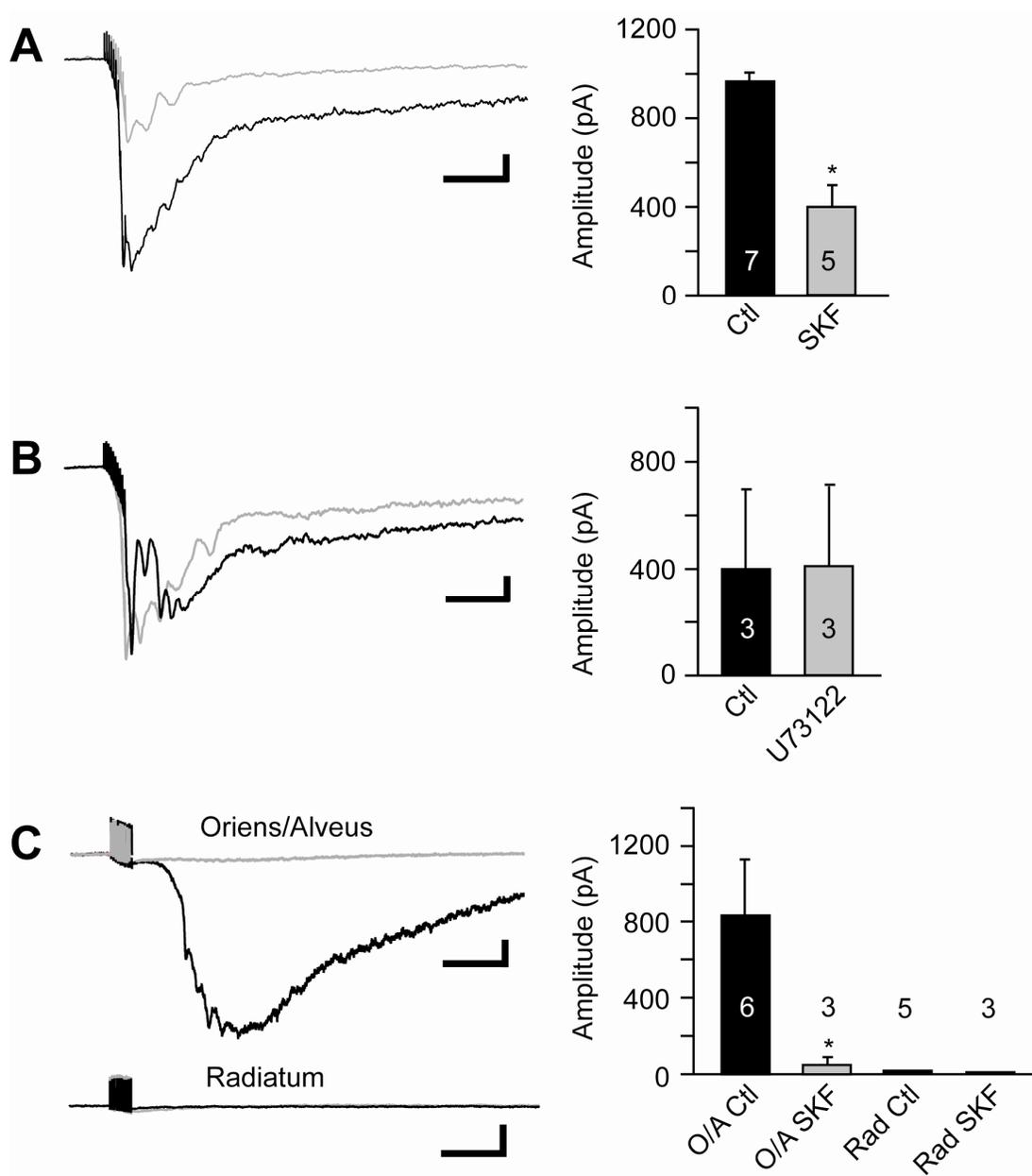
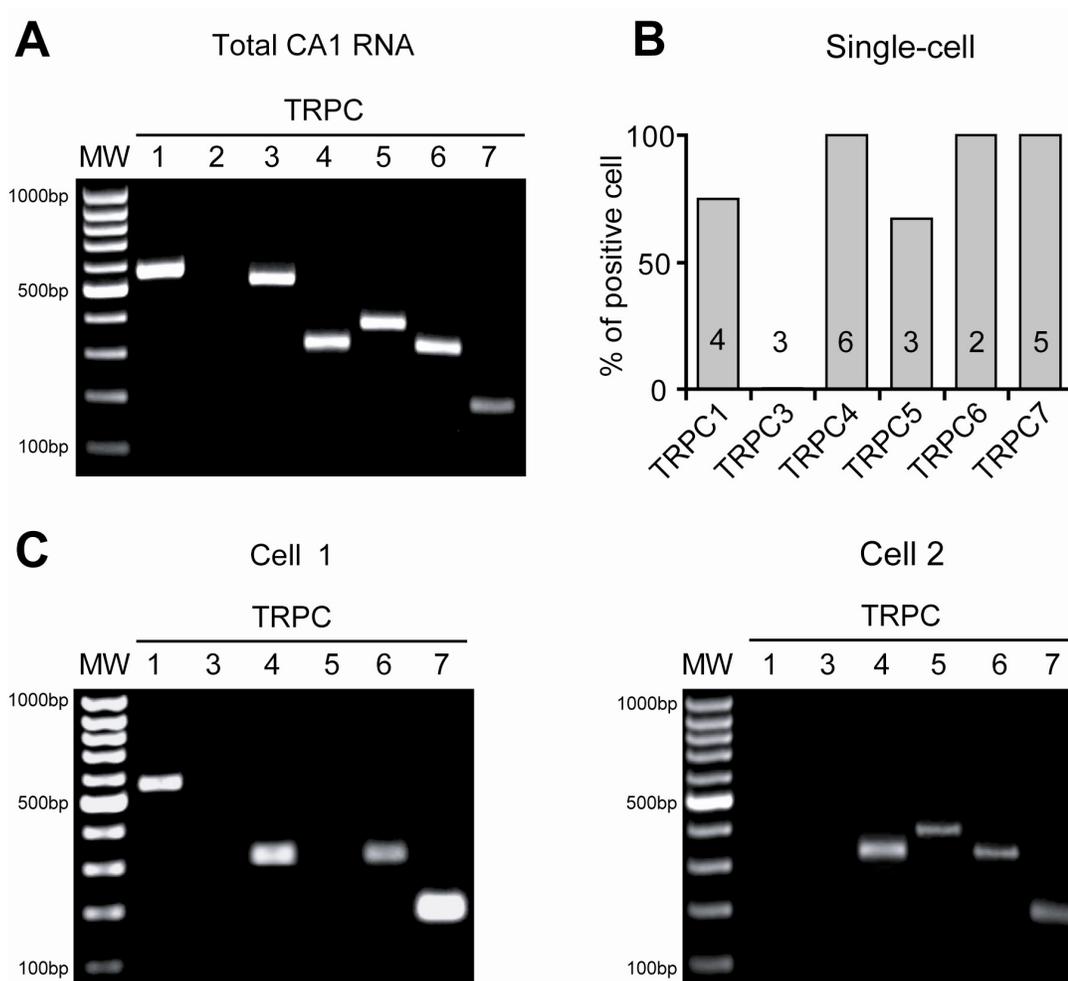


Figure 2.1



**Figure 2.2**

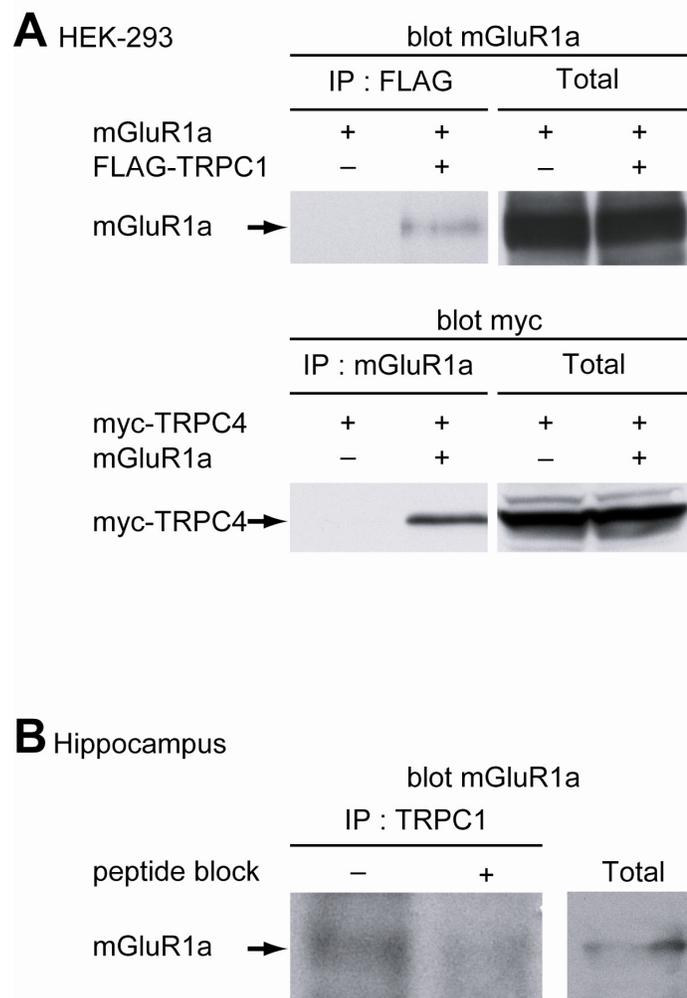


Figure 2.3

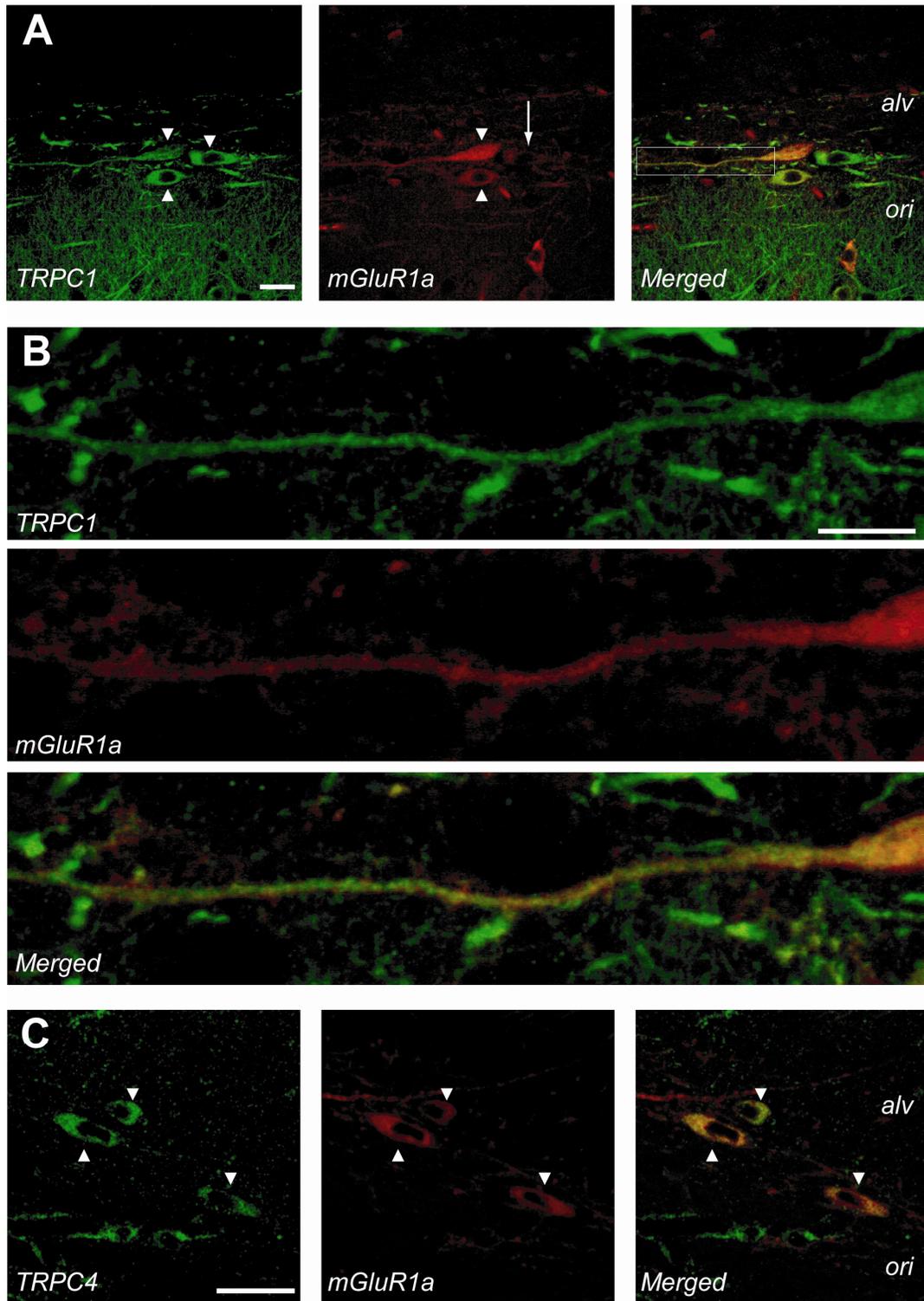


Figure 2.4

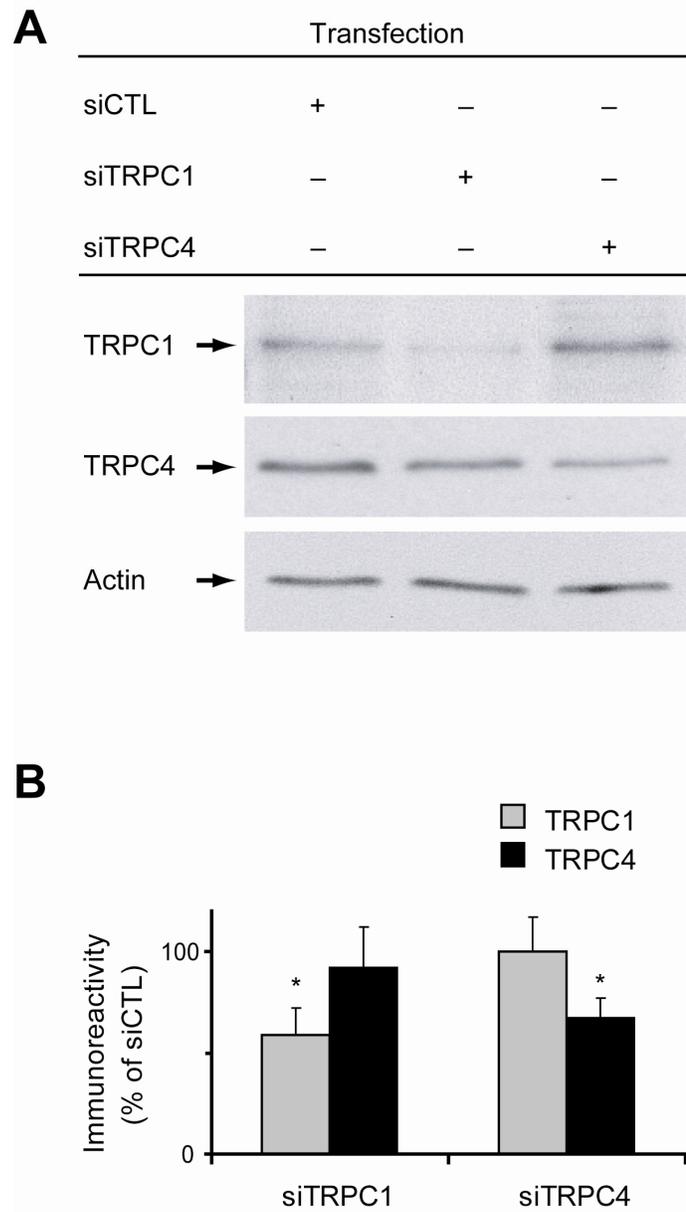


Figure 2.5

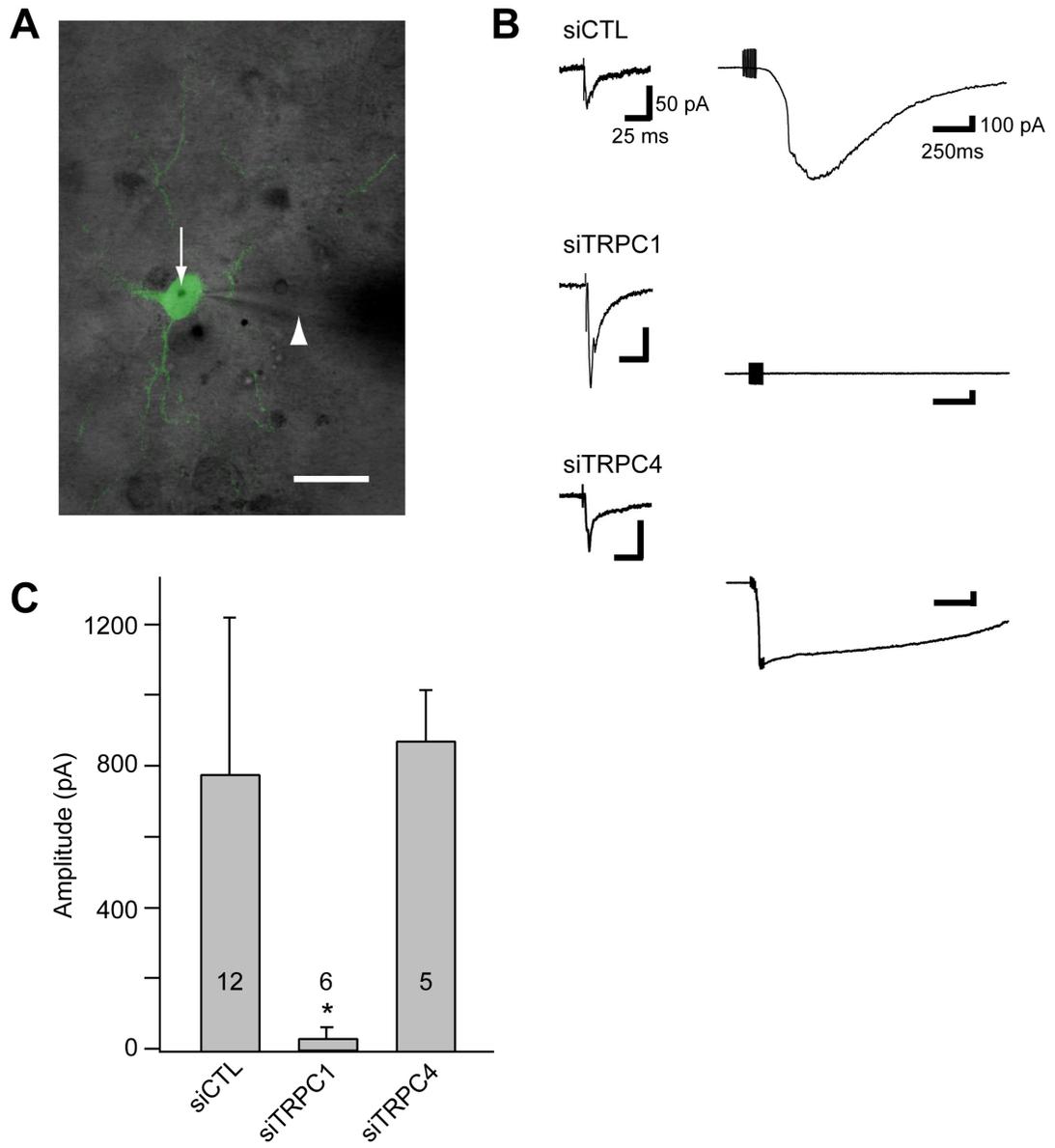


Figure 2.6

## 2.9 FIGURE LEGENDS

### **Figure 2.1 TRP channel-mediated mGluR1a-evoked EPSCs are PLC-independent and specific to O/A interneurons.**

**A.** Left: Recordings from an O/A interneuron of an acute hippocampal slice showing the inhibition of the mGluR1a-evoked current by the infusion of the TRP channel antagonist SKF96365 (SKF). Right: Mean amplitude for all cells. **B.** Left: Recording from an O/A interneuron of an acute hippocampal slice showing the lack of effect of the PLC inhibitor U73122. Right: Mean amplitude for all cells. **C.** Left: Recordings from organotypic slices showing mGluR1a-evoked EPSCs and the effect of SKF on either O/A interneurons (top) or interneurons recorded in stratum radiatum (bottom). Right: Mean amplitude for all cells. Numbers inside bar graphs represent the number of cells in each group. Scale bars: 250 ms, 100 pA. (\* $p < 0.05$ )

### **Figure 2.2 TRPC mRNA expression in whole CA1 hippocampal region and in individual O/A interneurons.**

**A.** RT-PCR products obtained from total CA1 RNA ( $n = 3$  separate experiments). **B.** Expression of the different TRPC mRNA detected by single-cell RT-PCR in CA1 O/A interneurons. Numbers inside each bar represent the number of cells analyzed for that TRPC member. **C.** Representative single-cell RT-PCR products obtained from two different cells. Lanes marked MW show the DNA molecular weight ladder.

### **Figure 2.3 Molecular interaction of mGluR1a with TRPC1 and TRPC4 in HEK-293 cells and with TRPC1 in hippocampus.**

**A.** Top left: Cell extracts from HEK-293 cells transfected with mGluR1a alone or mGluR1a along with FLAG-TRPC1 were immunoprecipitated with anti-FLAG and immunodetected by Western blot using anti-mGluR1a ( $n = 3$  separate experiments). Top right: Immunodetection of mGluR1a from cell extracts. Bottom left: Cell extracts from HEK-293 cells transfected with myc-TRPC4 alone or myc-TRPC4 along with mGluR1a were immunoprecipitated with anti-mGluR1a and immunodetected using anti-myc ( $n = 3$ ). Bottom right: Immunodetection of myc-

TRPC4 from cell extracts. **B.** Left: Whole hippocampus tissue extract was immunoprecipitated with anti-TRPC1 in absence or presence of TRPC1 blocking peptide and immunodetected using anti-mGluR1a ( $n = 3$ ). Right: Immunodetection of mGluR1a from whole hippocampus tissue extract.

**Figure 2.4 mGluR1a co-localizes with TRPC1 and TRPC4 in O/A interneurons.**

**A.** Double-label immunofluorescence of TRPC1 (green) and mGluR1a (red) in stratum oriens/alveus of the CA1 region. Left: TRPC1 antibody labelled the cell body and dendrites of three O/A interneurons (arrowheads), as well as other neuronal processes in stratum oriens/alveus. Middle: mGluR1a antibody also labelled cell bodies and proximal dendrites of the same interneurons. The cell body marked by an arrow showed less labelling than the two marked by arrowheads. Right: Merged images showing co-localization of TRPC1 and mGluR1a in cell bodies and proximal dendrites of O/A interneurons. **B.** Higher magnification of boxed region in A showing co-localization of TRPC1 and mGluR1a in a proximal dendrite of an O/A interneuron. **C.** Double-label of TRPC4 (green) and mGluR1a (red) in stratum oriens/alveus of the CA1 region. Left: TRPC4 antibody labelled cell bodies of O/A interneurons (arrowheads). Middle: mGluR1a antibody labelled the same cells. Right: Merged images showing co-localization of TRPC4 and mGluR1a. Scale bars: A and C, 25  $\mu\text{m}$ ; B, 10 $\mu\text{m}$ .

**Figure 2.5 siRNA transfection selectively reduced TRPC1 and TRPC4 expression in hippocampal organotypic slice cultures.**

**A.** Representative western blots of TRPC1 (top) and TRPC4 (middle) 48 h after biolistic transfection with siCTL, siTRPC1 or siTRPC4 in hippocampal organotypic slices. Actin (bottom) is shown as a loading control. **B.** Densitometric analysis of TRPC1 and TRPC4 expression normalized to actin value. Slices transfected with siTRPC1 or siTRPC4 were compared with slices transfected with siCTL. Results are expressed as mean  $\pm$  s.e.m. from at least 3 independent experiments. ( $*p < 0.05$ )

**Figure 2.6 Selective knock-down of TRPC1, but not TRPC4, reduces mGluR1a-evoked EPSCs.**

**A.** Merged fluorescence and differential infrared contrast microscopy images showing a transfected YFP-expressing O/A interneuron (excited with a 495 nm light source). The gold particle from transfection is marked by an arrow and the recording pipette is marked by an arrowhead. Scale bar: 50  $\mu\text{m}$ . **B.** Recordings from O/A interneurons that were either transfected with scrambled siRNA (siCTL), siRNA targeting TRPC1 (siTRPC1), or siRNA targeting TRPC4 (siTRPC4). Left traces: Ionotropic glutamate receptor-mediated EPSCs evoked by a single stimulus (scale bars are of equal value for all three groups). Right traces: mGluR1a-evoked EPSCs in the same cells. **C.** Mean amplitude of mGluR1a-evoked EPSCs for all cells. Numbers inside bar graphs represent the number of cells in each group. ( $*p < 0.05$ )

### **CHAPITRE 3**

#### **DISCUSSION GÉNÉRALE**

### 3.1 RAPPEL DES PRINCIPAUX RÉSULTATS

Les objectifs de ce mémoire étaient :

- 1) Identifier le(s) membres de la famille TRPC responsables des CPSE<sub>mGluR1a</sub> dans les interneurons O/A de l'hippocampe.
- 2) Explorer les mécanismes par lesquels la stimulation des récepteurs mGluR1a mène à l'ouverture de ces canaux.

Ces objectifs visaient à mieux comprendre les mécanismes de transmission synaptique nécessaires à l'induction d'une PLT aux synapses excitatrices de ces neurones.

En regard à ces objectifs, nos résultats indiquent que :

- 1) Les interneurons O/A expriment plusieurs TRPC en combinaisons variables. Parmi eux, TRPC1 s'associe à mGluR1a dans l'hippocampe et ces deux protéines sont présentes dans les dendrites des interneurons O/A. En revanche, TRPC4 ne semble s'associer à mGluR1a qu'en système recombinant et sa colocalisation paraît limitée au corps cellulaire. Finalement, TRPC1 est une sous-unité obligatoire du canal responsable des CPSE<sub>mGluR1a</sub> alors que TRPC4 ne semble pas jouer un tel rôle.
- 2) Les récepteurs mGluR1a provoquent l'ouverture d'un canal TRP par un mécanisme indépendant de la PLC.

Ces résultats suggèrent que TRPC1 est une composante clé de l'induction de la PLT aux synapses excitatrices des interneurons O/A de l'hippocampe.

### 3.2 MÉCANISMES D'ACTIVATION DES CANAUX TRPC DANS LES INTERNEURONES O/A DE L'HIPPOCAMPE

#### 3.2.1 Voies de signalisation des protéines G et des tyrosine kinases

La voie classique de signalisation des récepteurs à sept domaines transmembranaires implique les protéines G hétérotrimériques (Gilman, 1987). En ce sens, il a été montré que les récepteurs mGluR de groupe I s'associent préférentiellement aux

protéines  $G_{q/11}$  et activent ainsi la voie de la PLC (Pin & Duvoisin, 1995). Cependant, il est maintenant bien connu que ces récepteurs peuvent activer d'autres voies de signalisation dont celle des tyrosines kinases de la famille Src (Hermans & Challiss, 2001). En effet, dans les cellules pyramidales du CA3 et dans les interneurons O/A du CA1, il semble que les réponses évoquées par la stimulation de ces récepteurs ne dépendent pas uniquement des protéines G (Guerineau *et al.*, 1995; Heuss *et al.*, 1999; Gee & Lacaille, 2004). Dans ces deux cas, les tyrosines kinases de la famille Src semblent responsables des effets indépendants des protéines G (Heuss *et al.*, 1999; Topolnik *et al.*, 2006).

Gee et ses collègues (2003) ont montré qu'il y avait coexistence de voies de signalisations dépendantes et indépendantes des protéines G à l'intérieur des mêmes cellules. De plus, la voie de signalisation privilégiée semble dépendre de la concentration intracellulaire de  $Ca^{2+}$ .

Récemment, des travaux ont montré qu'à faible concentration d'agoniste, le récepteur  $\beta_2$ -adrénergique active ERK par une voie dépendant des protéines G alors qu'à forte concentration d'agoniste, l'activation de ERK se fait par une voie dépendant de Src (Sun *et al.*, 2007). Il est intéressant de noter que dans toutes les études ayant conclu à une signalisation des récepteurs mGluR indépendante des protéines G, les réponses étaient évoquées par l'application d'un agoniste dans la solution de perfusion. Dans ces conditions, les récepteurs mGluR1a activent eux aussi ERK via Src (Thandi *et al.*, 2002; Topolnik *et al.*, 2006). L'application d'un agoniste est donc susceptible de produire une stimulation massive des mGluR et de toutes leurs voies de signalisation. L'application subséquente d'un inhibiteur des protéines G ne produirait alors aucun effet, car l'activation massive de la voie de Src compenserait l'inhibition de la voie des protéines G.

Dans les cellules de Purkinje du cervelet et dans les neurones dopaminergiques de la substance noire, les CPSE<sub>mGluR1a</sub> semblent dépendre des protéines G (Netzeband *et al.*, 1997; Hirono *et al.*, 1998; Tempia *et al.*, 1998; Tozzi *et al.*, 2001; Canepari &

Ogden, 2003). Cependant, une modulation des réponses par les tyrosine kinases (Tozzi *et al.*, 2001; Canepari & Ogden, 2003) et par les tyrosine phosphatases (Canepari & Ogden, 2003) a été observée, suggérant que les mGluR activent plusieurs voies de signalisation dans ces cellules aussi.

Dans les interneurons O/A du CA1, l'étude de l'implication des protéines G dans la signalisation des récepteurs mGluR de groupe I ne s'est fait que par la perfusion d'un agoniste (Gee & Lacaille, 2004). Par la suite, l'implication de Src a été démontrée, mais l'inhibition pharmacologique de cette voie de signalisation ne produit qu'un blocage partiel des réponses du récepteur mGluR1a. De plus, l'inhibition de Src seule n'est pas suffisante pour bloquer l'induction de la PLT, elle doit être couplée à l'inhibition de la libération intracellulaire de  $Ca^{2+}$  (Topolnik *et al.*, 2006). Ceci suggère l'existence d'une autre voie de signalisation parallèle (dépendant possiblement des protéines G). Il serait donc intéressant d'examiner la contribution relative de la voie des protéines G et de la voie de Src dans la signalisation du récepteur mGluR1a et dans l'induction de la PLT. La stimulation des afférences excitatrices serait alors la méthode à privilégier pour évoquer les réponses, car elle produit une activation transitoire et localisée des récepteurs avec une concentration physiologique de glutamate, éliminant ainsi la possibilité que l'implication des protéines G soit masquée par l'activation de la voie de Src.

### 3.2.2 Voie de signalisation de la PLC

L'activation des canaux TRPC suite à la stimulation de récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) ou de récepteurs tyrosine kinase (RTK) est typiquement associée à la voie de signalisation de la PLC (Venkatachalam & Montell, 2007). Cette activation se produit suite à la déplétion des réserves intracellulaires de  $Ca^{2+}$  (*store operated calcium entry*) ou suite à la production d'un second messenger tel que le diacylglycérol (DAG) (*receptor-operated calcium entry*). Une étude a montré que la voie de la PLC était à la base de la signalisation des récepteurs mGluR de groupe I dans les cellules pyramidales de l'amygdale latérale (Faber *et al.*, 2006). En revanche, dans les interneurons O/A, de même que dans les neurones

dopaminergiques de la substance noire, il semble que l'activation des canaux TRPC se fasse par un mécanisme indépendant de la PLC (Tozzi *et al.*, 2001; Gee & Lacaille, 2004). Dans les cellules de Purkinje du cervelet, plusieurs études ont été menées à ce sujet et les résultats obtenus suggèrent soit une absence d'implication (Tempia *et al.*, 1998; Canepari *et al.*, 2001; Canepari & Ogden, 2003), une implication partielle (Hirono *et al.*, 1998) ou un rôle essentiel (Netzeband *et al.*, 1997) de la PLC. Outre le type cellulaire étudié, il semble donc que des différences méthodologiques puissent grandement influencer les résultats obtenus. Parmi ces différences, notons entre autres les moyens utilisés pour évoquer les réponses. L'application d'un agoniste est susceptible de recruter davantage de récepteurs que la stimulation des afférences excitatrices. Les récepteurs situés aux synapses interagissent avec des protéines d'échafaudage régulant leur couplage avec des effecteurs possiblement différents de ceux des récepteurs extrasynaptiques et somatiques (Enz, 2007). Il est donc possible qu'à l'intérieur d'un même neurone, certains récepteurs mGluR soient couplés à la PLC alors que d'autres utilisent une voie de signalisation différente.

Les résultats que nous avons obtenus en stimulant les afférences excitatrices des interneurons O/A indiquent que les CPSE<sub>mGluR1a</sub> sont indépendants de la voie de la PLC. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus en appliquant un agoniste des mGluR de groupe I (Gee & Lacaille, 2004). Il sera donc nécessaire d'explorer d'autres mécanismes susceptibles d'activer les canaux TRPC dans ces neurones.

### **3.3 MÉCANISMES D'INDUCTION DE LA PLT AUX SYNAPSES EXCITATRICES DES INTERNEURONES O/A DE L'HIPPOCAMPE**

À ce jour, deux formes de PLT ont été décrites aux synapses excitatrices des interneurons O/A. L'une de type hebbienne dépendant des récepteurs mGluR1a (Perez *et al.*, 2001) et l'autre anti-hebbienne dépendant des récepteurs AMPA perméables au Ca<sup>2+</sup> (CP-AMPA) et des mGluR de groupe I/II (Lamsa *et al.*, 2007). Ces deux formes de PLT requièrent une élévation postsynaptique de la concentration

cytoplasmique de  $\text{Ca}^{2+}$  (Lapointe *et al.*, 2004; Lamsa *et al.*, 2007). Les mécanismes à la base de cette élévation calcique semblent cependant différer dans ces deux types de PLT.

### 3.3.1 Mécanismes d'induction de la PLT hebbienne

L'induction de la PLT hebbienne requiert une activité pré- et postsynaptique concomitante. D'un point de vue expérimental, ces conditions sont réunies en couplant la stimulation des afférences en bouffées thêta (SBT) avec la dépolarisation du neurone postsynaptique. Ce couplage est essentiel à l'induction de la PLT, car ni la SBT ni la dépolarisation ne peut induire seule la PLT (Perez *et al.*, 2001).

Dans les interneurons O/A, les CPSE des CP-AMPA et les réponses calciques associées montrent une rectification entrante alors que ceux des mGluR ont une rectification sortante (Topolnik *et al.*, 2005). Ces récepteurs sont donc susceptibles de produire des élévations calciques lors d'états d'activation postsynaptique (potentiel membranaire) différents. La SBT seule produit des élévations calciques dépendant des CP-AMPA. Cependant, lorsque la SBT est couplée à la dépolarisation, les CP-AMPA ne semblent pas contribuer de façon significative aux élévations calciques. En revanche, le couplage de la SBT avec la dépolarisation recrute une composante dépendant des mGluR de groupe I/II (Topolnik *et al.*, 2005). Ces résultats sont en accord avec les profils de rectification observés et suggèrent que les mGluR1a jouent le rôle de détecteurs de la coïncidence de l'activité pré- et postsynaptique aux synapses des interneurons O/A.

Les mécanismes à la base du profil de rectification des  $\text{CPSE}_{\text{mGluR1a}}$  sont encore inconnus. Il pourrait s'agir de propriétés biophysiques des canaux TRPC. En effet, les  $\text{CPSE}_{\text{mGluR1a}}$  dépendent de la concentration intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$  (Huang *et al.*, 2004). L'entrée préalable de  $\text{Ca}^{2+}$  via les canaux calciques dépendants du voltage (CCDV) pourrait donc favoriser les  $\text{CPSE}_{\text{mGluR1a}}$ . Récemment, il a été montré que le récepteur mGluR1a était sensible au potentiel membranaire. Son affinité pour le glutamate augmente avec la dépolarisation, produisant ainsi des réponses de plus

grande amplitude. Cette propriété semble dépendre des acides aminés polaires présents dans les boucles intracellulaires du récepteur (Ohana *et al.*, 2006). Ce mécanisme pourrait également contribuer au profil de rectification des CPSE<sub>mGluR1a</sub>.

### 3.3.2 Mécanismes d'induction de la PLT anti-hebbienne

La PLT anti-hebbienne requiert que l'activité présynaptique soit couplée à la quiescence ou à l'hyperpolarisation postsynaptique (Lamsa *et al.*, 2007). Dans ces conditions, les élévations calciques dépendent des CP-AMPA (Topolnik *et al.*, 2005). Il est intéressant de noter que cette forme de PLT dépend aussi des récepteurs mGluR de groupe I, mais le sous-type impliqué n'a pas été déterminé et la nature de sa contribution est encore inconnue. Ce récepteur pourrait participer à l'induction de la PLT en activant des voies de signalisation n'impliquant pas l'augmentation de la concentration intracellulaire de Ca<sup>2+</sup>, telle que la voie de la PKA (Lante *et al.*, 2006).

### 3.3.3 La PLT des interneurons O/A est-elle hebbienne ou anti-hebbienne ?

Une étude rapporte qu'en absence de polyamines intracellulaires, seule la PLT hebbienne peut être induite, tandis qu'en présence de polyamines, seule la PLT anti-hebbienne peut l'être (Lamsa *et al.*, 2007). Cette observation a mené au modèle selon lequel les formes hebbienne et anti-hebbienne représentent la même PLT. Des différences entre les méthodes d'enregistrement seraient alors à l'origine de niveaux de polyamines cytoplasmiques différents et détermineraient l'état d'activation postsynaptique nécessaire à l'induction la PLT (Lamsa *et al.*, 2007).

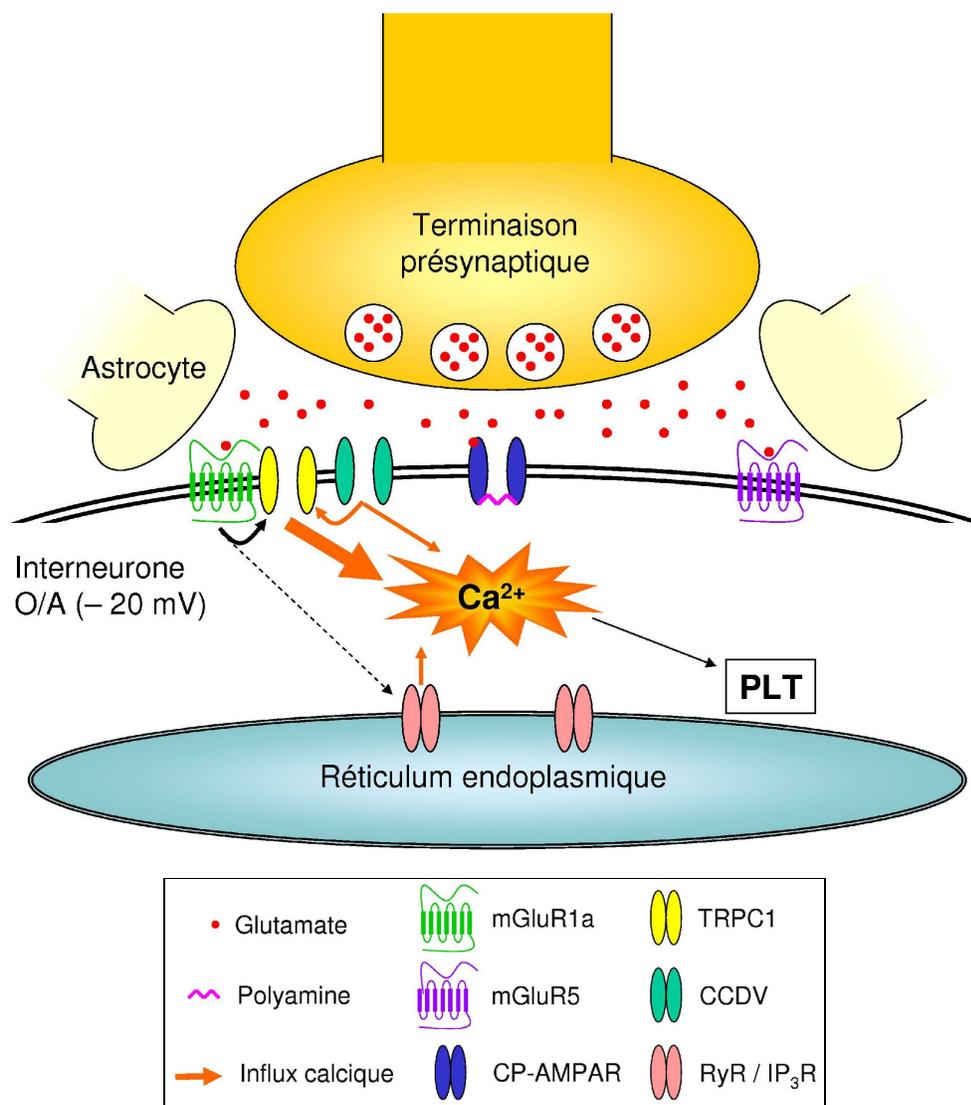
La caractérisation initiale de la PLT hebbienne dans les interneurons O/A a effectivement été faite en absence de spermine dans l'électrode d'enregistrement (Perez *et al.*, 2001; Lapointe *et al.*, 2004; Topolnik *et al.*, 2006). Cependant, des expériences préliminaires menées dans notre laboratoire ont montré que la PLT hebbienne pouvait être induite même en présence de spermine (Croce & Lacaille, 2005). De plus, la stimulation avec un agoniste des récepteurs mGluR1a couplée à la dépolarisation produit aussi une PLT (PLT<sub>mGluR1a</sub>) en présence de spermine (Le Vasseur *et al.*, 2008). Cette PLT dépend de la durée des dépolarisations d'une

manière critique. Des dépolarisations de 50 ms ne sont pas suffisantes pour induire la  $PLT_{mGluR1a}$  alors des dépolarisations de 100 ms le sont. Il est donc possible que les expériences initiales de caractérisation de la PLT hebbienne aient sous-estimé la durée des dépolarisations (60 ms) nécessaires pour induire la PLT à cause de l'absence de spermine dans l'électrode d'enregistrement. Ceci pourrait également expliquer pourquoi la PLT hebbienne n'a pas été observée par Lamsa et ses collaborateurs (2007) lorsqu'ils faisaient leurs enregistrements en présence de spermine dans l'électrode d'enregistrement ou en patch perforé. Leur protocole d'induction ne produirait pas des dépolarisations de durée ou d'amplitude optimales pour observer une PLT hebbienne. Nous suggérons donc que la PLT hebbienne existe dans les interneurons O/A, peu importe le niveau de polyamines intracellulaires, mais qu'elle requiert des dépolarisations de longue durée. Cette hypothèse devra cependant être testée en appliquant le protocole de SBT couplée à des dépolarisations de courte et de longue durée en présence de spermine dans l'électrode d'enregistrement.

Dans le paradigme d'induction de la PLT par l'application d'un agoniste couplée à la dépolarisation, il est intéressant de noter que des dépolarisations de courte durée (50 ms) étaient suffisantes pour induire la PLT lorsque ce sont les récepteurs mGluR5 qui étaient stimulés (Le Vasseur *et al.*, 2008). Malheureusement, la capacité du récepteur mGluR5 à induire une PLT en absence de dépolarisation n'a pas été testée, mais il est possible que ce récepteur agisse indépendamment du potentiel membranaire. Si tel est le cas, ce récepteur serait probablement le sous-type impliqué dans l'induction de la PLT anti-hebbienne.

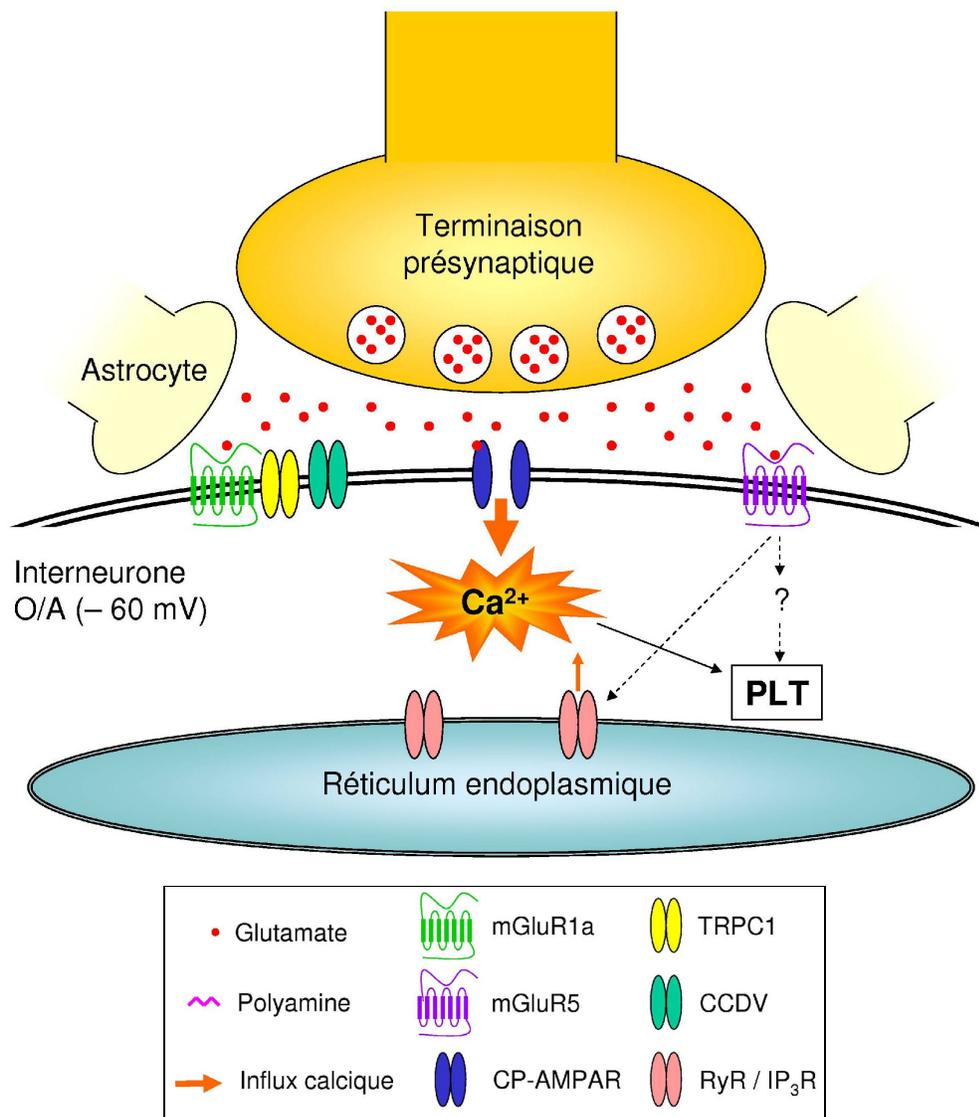
En conclusion, nous suggérons que les formes hebbienne et anti-hebbienne de PLT coexistent dans les interneurons O/A. Cette dualité permettrait aux synapses excitatrices d'être potentialisées dans des situations physiologiques distinctes. Par exemple, la PLT hebbienne pourrait être induite lorsque les cellules pyramidales du CA1 et les interneurons O/A déchargent de façon synchrone, comme lors des oscillations thêta (Klausberger *et al.*, 2003). La PLT anti-hebbienne serait quant à elle

induite lorsque les cellules pyramidales déchargent de façon soutenue, mais que les interneurons O/A demeurent silencieux, comme lors des *sharp wave ripples* (Klausberger *et al.*, 2003; Lamsa *et al.*, 2007). Les figures 3.1 et 3.2 résument les mécanismes par lesquels chacune de ces formes de PLT serait induite.



**Figure 3.1**  
**Mécanismes d'induction de la PLT hebbienne aux synapses excitatrices des interneurons O/A**

Lorsque l'activité présynaptique est couplée à la dépolarisation postsynaptique, les CP-AMPA ne contribuent pas de façon significative à l'augmentation de la concentration intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$ , car leur canal est bloqué par les polyamines intracellulaires. La stimulation en bouffée thêta provoque une fuite de glutamate hors de la fente synaptique et ce dernier active les récepteurs mGluR1a. À ce potentiel membranaire, la stimulation des mGluR1a provoque une entrée massive de  $\text{Ca}^{2+}$  via les canaux TRPC1, car l'entrée préalable de  $\text{Ca}^{2+}$  via les canaux calciques dépendant du voltage (CCDV) potentialise les  $\text{CPSE}_{\text{mGluR1a}}$ . Les récepteurs mGluR1a provoquent également une libération de  $\text{Ca}^{2+}$  à partir du réticulum endoplasmique, contribuant en partie à l'induction de la PLT.



**Figure 3.2**

**Mécanismes d'induction de la PLT anti-hebbienne aux synapses excitatrices des interneurons O/A**

Lorsque l'activité présynaptique est couplée à l'hyperpolarisation postsynaptique, les CP-AMPA constituent la principale source de Ca<sup>2+</sup>. À ce potentiel membranaire, la stimulation de mGluR1a ne provoque pas l'ouverture des canaux TRPC1, car les CCDV n'ont pas été ouverts. En revanche, la stimulation des récepteurs mGluR5 participe à l'induction de la PLT, soit en provoquant une libération de Ca<sup>2+</sup> à partir du réticulum endoplasmique, soit en activant une voie de signalisation encore inconnue.

### 3.4 PERSPECTIVES FUTURES

Dans la présente étude, nous avons montré que TRPC1 est une sous-unité obligatoire du canal responsable des CPSE<sub>mGluR1a</sub>. La suite logique de ces travaux serait donc de vérifier l'implication de TRPC1 dans l'induction de la PLT hebbienne en supprimant son expression par la transfection d'ARN interférant. Dans les cellules pyramidales de l'amygdale latérale, TRPC1 semble former une hétéromère avec TRPC5 (Faber *et al.*, 2006) et le canal qui en résulte possède un profil de rectification très semblable à celui des CPSE<sub>mGluR1a</sub> des interneurons O/A. Comme TRPC5 est aussi exprimé dans ces cellules, il serait intéressant d'investiguer l'implication de cette sous-unité dans les CPSE<sub>mGluR1a</sub> et dans l'induction de la PLT.

Nos travaux ont également montré que les CPSE<sub>mGluR1a</sub> étaient indépendants de la voie de la PLC, mais nous n'avons toutefois pas identifié le mécanisme menant à l'activation des canaux TRPC. Nous suggérons donc d'examiner, par une approche pharmacologique, la contribution relative de la voie des protéines G et de la voie de Src dans les CPSE<sub>mGluR1a</sub> évoqués par stimulation des afférences excitatrices.

Il serait ensuite intéressant d'investiguer le rôle de STIM1 dans la régulation de l'ouverture des canaux TRPC des interneurons. Cela devra se faire par une approche moléculaire, car il n'existe à ce jour aucun composé pharmacologique interférant avec STIM1. Par exemple, l'expression de STIM1 pourrait être supprimée par la transfection d'ARN interférant. Cependant, comme STIM1 interagit de façon constitutive avec TRPC1 (Huang *et al.*, 2006), cette manipulation est susceptible de modifier la distribution de TRPC1 et son association avec le récepteur mGluR1a. Il faudrait alors confirmer les résultats en transfectant un dominant négatif de STIM1 qui peut interagir avec TRPC1, mais qui ne possède pas la région riche en résidus lysine nécessaire à l'ouverture du canal (Huang *et al.*, 2006).

Il serait ensuite nécessaire de résoudre l'apparente contradiction qui existe entre les formes hebbienne et anti-hebbienne de PLT dans les interneurons O/A. Pour ce

faire, une courbe « dose-réponse » devrait être faite pour déterminer la durée de la dépolarisation nécessaire pour induire la PLT hebbienne en présence et en absence de spermine dans l'électrode d'enregistrement. Cette expérience confirmerait l'existence de la PLT hebbienne et fournirait une explication aux résultats divergents obtenus par les différentes équipes ayant étudié la PLT des interneurons O/A.

Finalement, il serait intéressant d'identifier, par une approche pharmacologique, le sous-type de mGluR impliqué dans la PLT anti-hebbienne. S'il s'agit de mGluR5, cela confirmerait l'hypothèse selon laquelle ce récepteur serait capable d'induire la PLT en absence de dépolarisation et éluciderait le rôle encore inconnu de ce sous-type de mGluR dans les interneurons O/A.

**CHAPITRE 4**

**BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE**

- Alle H, Jonas P & Geiger JR. (2001). PTP and LTP at a hippocampal mossy fiber-interneuron synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 14708-14713.
- Amaral DG & Witter MP. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* **31**, 571-591.
- Bai CX, Giamarchi A, Rodat-Despoix L, Padilla F, Downs T, Tsiokas L & Delmas P. (2008). Formation of a new receptor-operated channel by heteromeric assembly of TRPP2 and TRPC1 subunits. *EMBO Rep* **9**, 472-479.
- Baude A, Nusser Z, Roberts JD, Mulvihill E, McIlhinney RA & Somogyi P. (1993). The metabotropic glutamate receptor (mGluR1 alpha) is concentrated at perisynaptic membrane of neuronal subpopulations as detected by immunogold reaction. *Neuron* **11**, 771-787.
- Bengtson CP, Tozzi A, Bernardi G & Mercuri NB. (2004). Transient receptor potential-like channels mediate metabotropic glutamate receptor EPSCs in rat dopamine neurones. *J Physiol* **555**, 323-330.
- Bennett MR. (2000). The concept of long term potentiation of transmission at synapses. *Prog Neurobiol* **60**, 109-137.
- Blasco-Ibanez JM & Freund TF. (1995). Synaptic input of horizontal interneurons in stratum oriens of the hippocampal CA1 subfield: structural basis of feed-back activation. *Eur J Neurosci* **7**, 2170-2180.
- Bliss TV & Lomo T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* **232**, 331-356.
- Bontempi B, Laurent-Demir C, Destrade C & Jaffard R. (1999). Time-dependent reorganization of brain circuitry underlying long-term memory storage. *Nature* **400**, 671-675.
- Boulay G, Brown DM, Qin N, Jiang M, Dietrich A, Zhu MX, Chen Z, Birnbaumer M, Mikoshiba K & Birnbaumer L. (1999). Modulation of Ca(2+) entry by polypeptides of the inositol 1,4, 5-trisphosphate receptor (IP3R) that bind transient receptor potential (TRP): evidence for roles of TRP and IP3R in store depletion-activated Ca(2+) entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14955-14960.
- Bourdeau ML, Morin F, Laurent CE, Azzi M & Lacaille JC. (2007). Kv4.3-mediated A-type K+ currents underlie rhythmic activity in hippocampal interneurons. *J Neurosci* **27**, 1942-1953.

- Bowie D & Mayer ML. (1995). Inward rectification of both AMPA and kainate subtype glutamate receptors generated by polyamine-mediated ion channel block. *Neuron* **15**, 453-462.
- Canepari M & Ogden D. (2003). Evidence for protein tyrosine phosphatase, tyrosine kinase, and G-protein regulation of the parallel fiber metabotropic slow EPSC of rat cerebellar Purkinje neurons. *J Neurosci* **23**, 4066-4071.
- Canepari M, Papageorgiou G, Corrie JE, Watkins C & Ogden D. (2001). The conductance underlying the parallel fibre slow EPSP in rat cerebellar Purkinje neurones studied with photolytic release of L-glutamate. *J Physiol* **533**, 765-772.
- Carmant L, Woodhall G, Ouardouz M, Robitaille R & Lacaille JC. (1997). Interneuron-specific Ca<sup>2+</sup> responses linked to metabotropic and ionotropic glutamate receptors in rat hippocampal slices. *Eur J Neurosci* **9**, 1625-1635.
- Castillo PE, Weisskopf MG & Nicoll RA. (1994). The role of Ca<sup>2+</sup> channels in hippocampal mossy fiber synaptic transmission and long-term potentiation. *Neuron* **12**, 261-269.
- Chrobak JJ & Buzsaki G. (1998). Operational dynamics in the hippocampal-entorhinal axis. *Neurosci Biobehav Rev* **22**, 303-310.
- Chung YH, Sun Ahn H, Kim D, Hoon Shin D, Su Kim S, Yong Kim K, Bok Lee W & Ik Cha C. (2006). Immunohistochemical study on the distribution of TRPC channels in the rat hippocampus. *Brain Res* **1085**, 132-137.
- Clapham DE, Runnels LW & Strubing C. (2001). The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci* **2**, 387-396.
- Corkin S, Amaral DG, Gonzalez RG, Johnson KA & Hyman BT. (1997). H. M.'s medial temporal lobe lesion: findings from magnetic resonance imaging. *J Neurosci* **17**, 3964-3979.
- Croce A & Lacaille JC. (2005). *Differential mechanisms of transmission and plasticity at feedforward and feedback excitatory synapses of hippocampal oriens alveus interneurons*. Program No. 965.6. 2005. Society for Neuroscience, Washington.
- De March Z, Giampa C, Patassini S, Bernardi G & Fusco FR. (2006). Cellular localization of TRPC5 in the substantia nigra of rat. *Neurosci Lett* **402**, 35-39.
- den Dekker E, Hoenderop JG, Nilius B & Bindels RJ. (2003). The epithelial calcium channels, TRPV5 & TRPV6: from identification towards regulation. *Cell Calcium* **33**, 497-507.

- Donevan SD & Rogawski MA. (1995). Intracellular polyamines mediate inward rectification of Ca<sup>2+</sup>-permeable alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 9298-9302.
- Enz R. (2007). The trick of the tail: protein-protein interactions of metabotropic glutamate receptors. *Bioessays* **29**, 60-73.
- Faber ES, Sedlak P, Vidovic M & Sah P. (2006). Synaptic activation of transient receptor potential channels by metabotropic glutamate receptors in the lateral amygdala. *Neuroscience* **137**, 781-794.
- Fagni L, Chavis P, Ango F & Bockaert J. (2000). Complex interactions between mGluRs, intracellular Ca<sup>2+</sup> stores and ion channels in neurons. *Trends Neurosci* **23**, 80-88.
- Firner M, Greffrath W & Treede RD. (2006). Phosphorylation of extracellular signal-related protein kinase is required for rapid facilitation of heat-induced currents in rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* **143**, 253-263.
- Fowler MA, Sidiropoulou K, Ozkan ED, Phillips CW & Cooper DC. (2007). Corticolimbic expression of TRPC4 and TRPC5 channels in the rodent brain. *PLoS ONE* **2**, e573.
- Freund TF & Buzsaki G. (1996). Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* **6**, 347-470.
- Gee CE, Benquet P & Gerber U. (2003). Group I metabotropic glutamate receptors activate a calcium-sensitive transient receptor potential-like conductance in rat hippocampus. *J Physiol* **546**, 655-664.
- Gee CE & Lacaille JC. (2004). Group I metabotropic glutamate receptor actions in oriens/alveus interneurons of rat hippocampal CA1 region. *Brain Res* **1000**, 92-101.
- Giampa C, DeMarch Z, Patassini S, Bernardi G & Fusco FR. (2007). Immunohistochemical localization of TRPC6 in the rat substantia nigra. *Neurosci Lett* **424**, 170-174.
- Gilman AG. (1987). G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem* **56**, 615-649.
- Goel M, Sinkins WG & Schilling WP. (2002). Selective association of TRPC channel subunits in rat brain synaptosomes. *J Biol Chem* **277**, 48303-48310.

- 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.
- Hermans E & Challiss RA. (2001). Structural, signalling and regulatory properties of the group I metabotropic glutamate receptors: prototypic family C G-protein-coupled receptors. *Biochem J* **359**, 465-484.
- Heuss C, Scanziani M, Gahwiler BH & Gerber U. (1999). G-protein-independent signaling mediated by metabotropic glutamate receptors. *Nat Neurosci* **2**, 1070-1077.
- Hewavitharana T, Deng X, Soboloff J & Gill DL. (2007). Role of STIM and Orai proteins in the store-operated calcium signaling pathway. *Cell Calcium* **42**, 173-182.
- Hirono M, Konishi S & Yoshioka T. (1998). Phospholipase C-independent group I metabotropic glutamate receptor-mediated inward current in mouse purkinje cells. *Biochem Biophys Res Commun* **251**, 753-758.
- Hofmann T, Schaefer M, Schultz G & Gudermann T. (2002). Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 7461-7466.
- Huang GN, Zeng W, Kim JY, Yuan JP, Han L, Muallem S & Worley PF. (2006). STIM1 carboxyl-terminus activates native SOC, I(crac) and TRPC1 channels. *Nat Cell Biol* **8**, 1003-1010.
- Huang YH & Bergles DE. (2004). Glutamate transporters bring competition to the synapse. *Curr Opin Neurobiol* **14**, 346-352.
- Huang YH, Sinha SR, Tanaka K, Rothstein JD & Bergles DE. (2004). Astrocyte glutamate transporters regulate metabotropic glutamate receptor-mediated excitation of hippocampal interneurons. *J Neurosci* **24**, 4551-4559.
- Kandel ER, Schwartz JH & Jessel TM. (2000). *Principles of neural science*. The McGraw-Hill Companies Inc., New-York.
- Kew JN & Kemp JA. (2005). Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology (Berl)* **179**, 4-29.
- Kim SJ, Kim YS, Yuan JP, Petralia RS, Worley PF & Linden DJ. (2003). Activation of the TRPC1 cation channel by metabotropic glutamate receptor mGluR1. *Nature* **426**, 285-291.

- Kiselyov K, Mignery GA, Zhu MX & Muallem S. (1999). The N-terminal domain of the IP3 receptor gates store-operated hTrp3 channels. *Mol Cell* **4**, 423-429.
- Kiselyov KI, Shin DM, Wang Y, Pessah IN, Allen PD & Muallem S. (2000). Gating of store-operated channels by conformational coupling to ryanodine receptors. *Mol Cell* **6**, 421-431.
- Klausberger T, Magill PJ, Marton LF, Roberts JD, Cobden PM, Buzsaki G & Somogyi P. (2003). Brain-state- and cell-type-specific firing of hippocampal interneurons in vivo. *Nature* **421**, 844-848.
- Klausberger T & Somogyi P. (2008). Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science* **321**, 53-57.
- Kullmann DM & Lamsa KP. (2007). Long-term synaptic plasticity in hippocampal interneurons. *Nat Rev Neurosci* **8**, 687-699.
- Lacaille JC, Mueller AL, Kunkel DD & Schwartzkroin PA. (1987). Local circuit interactions between oriens/alveus interneurons and CA1 pyramidal cells in hippocampal slices: electrophysiology and morphology. *J Neurosci* **7**, 1979-1993.
- Lamsa K, Heeroma JH & Kullmann DM. (2005). Hebbian LTP in feed-forward inhibitory interneurons and the temporal fidelity of input discrimination. *Nat Neurosci* **8**, 916-924.
- Lamsa KP, Heeroma JH, Somogyi P, Rusakov DA & Kullmann DM. (2007). Anti-Hebbian long-term potentiation in the hippocampal feedback inhibitory circuit. *Science* **315**, 1262-1266.
- Lante F, de Jesus Ferreira MC, Guiramand J, Recasens M & Vignes M. (2006). Low-frequency stimulation induces a new form of LTP, metabotropic glutamate (mGlu5) receptor- and PKA-dependent, in the CA1 area of the rat hippocampus. *Hippocampus* **16**, 345-360.
- Lapointe V, Morin F, Ratte S, Croce A, Conquet F & Lacaille JC. (2004). Synapse-specific mGluR1-dependent long-term potentiation in interneurons regulates mouse hippocampal inhibition. *J Physiol* **555**, 125-135.
- Le Vasseur M, Ran I & Lacaille JC. (2008). Selective induction of metabotropic glutamate receptor 1- and metabotropic glutamate receptor 5-dependent chemical long-term potentiation at oriens/alveus interneuron synapses of mouse hippocampus. *Neuroscience* **151**, 28-42.

- Liman ER, Corey DP & Dulac C. (1999). TRP2: a candidate transduction channel for mammalian pheromone sensory signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 5791-5796.
- Liou J, Kim ML, Heo WD, Jones JT, Myers JW, Ferrell JE, Jr. & Meyer T. (2005). STIM is a Ca<sup>2+</sup> sensor essential for Ca<sup>2+</sup>-store-depletion-triggered Ca<sup>2+</sup> influx. *Curr Biol* **15**, 1235-1241.
- Lopes da Silva FH, Witter MP, Boeijinga PH & Lohman AH. (1990). Anatomic organization and physiology of the limbic cortex. *Physiol Rev* **70**, 453-511.
- Lopez-Bendito G, Shigemoto R, Fairen A & Lujan R. (2002). Differential distribution of group I metabotropic glutamate receptors during rat cortical development. *Cereb Cortex* **12**, 625-638.
- Lujan R, Nusser Z, Roberts JD, Shigemoto R & Somogyi P. (1996). Perisynaptic location of metabotropic glutamate receptors mGluR1 and mGluR5 on dendrites and dendritic spines in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* **8**, 1488-1500.
- Lujan R, Roberts JD, Shigemoto R, Ohishi H & Somogyi P. (1997). Differential plasma membrane distribution of metabotropic glutamate receptors mGluR1 alpha, mGluR2 and mGluR5, relative to neurotransmitter release sites. *J Chem Neuroanat* **13**, 219-241.
- Maccaferri G. (2005). Stratum oriens horizontal interneurone diversity and hippocampal network dynamics. *J Physiol* **562**, 73-80.
- Malenka RC & Nicoll RA. (1999). Long-term potentiation--a decade of progress? *Science* **285**, 1870-1874.
- Mannaioni G, Marino MJ, Valenti O, Traynelis SF & Conn PJ. (2001). Metabotropic glutamate receptors 1 and 5 differentially regulate CA1 pyramidal cell function. *J Neurosci* **21**, 5925-5934.
- Marsch R, Foeller E, Rammes G, Bunck M, Kossel M, Holsboer F, Zieglgansberger W, Landgraf R, Lutz B & Wotjak CT. (2007). Reduced anxiety, conditioned fear, and hippocampal long-term potentiation in transient receptor potential vanilloid type 1 receptor-deficient mice. *J Neurosci* **27**, 832-839.
- Martorana A, Giampa C, DeMarch Z, Viscomi MT, Patassini S, Sancesario G, Bernardi G & Fusco FR. (2006). Distribution of TRPC1 receptors in dendrites of rat substantia nigra: a confocal and electron microscopy study. *Eur J Neurosci* **24**, 732-738.
- Montell C. (2005). The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE* **2005**, re3.

- Montell C, Birnbaumer L, Flockerzi V, Bindels RJ, Bruford EA, Caterina MJ, Clapham DE, Harteneck C, Heller S, Julius D, Kojima I, Mori Y, Penner R, Prawitt D, Scharenberg AM, Schultz G, Shimizu N & Zhu MX. (2002). A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels. *Mol Cell* **9**, 229-231.
- Montell C & Rubin GM. (1989). Molecular characterization of the *Drosophila* *trp* locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* **2**, 1313-1323.
- Nadel L, Samsonovich A, Ryan L & Moscovitch M. (2000). Multiple trace theory of human memory: computational, neuroimaging, and neuropsychological results. *Hippocampus* **10**, 352-368.
- Netzeband JG, Parsons KL, Sweeney DD & Gruol DL. (1997). Metabotropic glutamate receptor agonists alter neuronal excitability and Ca<sup>2+</sup> levels via the phospholipase C transduction pathway in cultured Purkinje neurons. *J Neurophysiol* **78**, 63-75.
- Nicoll RA & Malenka RC. (1995). Contrasting properties of two forms of long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* **377**, 115-118.
- Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbet A & Prochiantz A. (1984). Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* **307**, 462-465.
- Odell AF, Scott JL & Van Helden DF. (2005). Epidermal growth factor induces tyrosine phosphorylation, membrane insertion, and activation of transient receptor potential channel 4. *J Biol Chem* **280**, 37974-37987.
- Ohana L, Barchad O, Parnas I & Parnas H. (2006). The metabotropic glutamate G-protein-coupled receptors mGluR3 and mGluR1a are voltage-sensitive. *J Biol Chem* **281**, 24204-24215.
- Ouardouz M & Lacaille JC. (1995). Mechanisms of selective long-term potentiation of excitatory synapses in stratum oriens/alveus interneurons of rat hippocampal slices. *J Neurophysiol* **73**, 810-819.
- Perez Y, Morin F & Lacaille JC. (2001). A hebbian form of long-term potentiation dependent on mGluR1a in hippocampal inhibitory interneurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9401-9406.
- 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**, 4274-4282.

- Pin JP & Duvoisin R. (1995). The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology* **34**, 1-26.
- Rajagopal K, Lefkowitz RJ & Rockman HA. (2005). When 7 transmembrane receptors are not G protein-coupled receptors. *J Clin Invest* **115**, 2971-2974.
- Roos J, DiGregorio PJ, Yeromin AV, Ohlsen K, Lioudyno M, Zhang S, Safrina O, Kozak JA, Wagner SL, Cahalan MD, Velicelebi G & Stauderman KA. (2005). STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca<sup>2+</sup> channel function. *J Cell Biol* **169**, 435-445.
- Schaefer M. (2005). Homo- and heteromeric assembly of TRP channel subunits. *Pflugers Arch* **451**, 35-42.
- Scoville WB & Milner B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **20**, 11-21.
- Shigemoto R, Kinoshita A, Wada E, Nomura S, Ohishi H, Takada M, Flor PJ, Neki A, Abe T, Nakanishi S & Mizuno N. (1997). Differential presynaptic localization of metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat hippocampus. *J Neurosci* **17**, 7503-7522.
- Sladeczek F, Pin JP, Recasens M, Bockaert J & Weiss S. (1985). Glutamate stimulates inositol phosphate formation in striatal neurones. *Nature* **317**, 717-719.
- Somogyi P & Klausberger T. (2005). Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. *J Physiol* **562**, 9-26.
- Squire LR, Clark RE & Knowlton BJ. (2001). Retrograde amnesia. *Hippocampus* **11**, 50-55.
- Squire LR & Zola-Morgan S. (1991). The medial temporal lobe memory system. *Science* **253**, 1380-1386.
- Strubing C, Krapivinsky G, Krapivinsky L & Clapham DE. (2001). TRPC1 and TRPC5 form a novel cation channel in mammalian brain. *Neuron* **29**, 645-655.
- Sun Y, Huang J, Xiang Y, Bastepe M, Juppner H, Kobilka BK, Zhang JJ & Huang XY. (2007). Dosage-dependent switch from G protein-coupled to G protein-independent signaling by a GPCR. *EMBO J* **26**, 53-64.

- Tempia F, Miniaci MC, Anchisi D & Strata P. (1998). Postsynaptic current mediated by metabotropic glutamate receptors in cerebellar Purkinje cells. *J Neurophysiol* **80**, 520-528.
- Thandi S, Blank JL & Challiss RA. (2002). Group-I metabotropic glutamate receptors, mGlu1a and mGlu5a, couple to extracellular signal-regulated kinase (ERK) activation via distinct, but overlapping, signalling pathways. *J Neurochem* **83**, 1139-1153.
- Topolnik L, Azzi M, Morin F, Kougioumoutzakis A & Lacaille JC. (2006). mGluR1/5 subtype-specific calcium signalling and induction of long-term potentiation in rat hippocampal oriens/alveus interneurons. *J Physiol* **575**, 115-131.
- Topolnik L, Congar P & Lacaille JC. (2005). Differential regulation of metabotropic glutamate receptor- and AMPA receptor-mediated dendritic Ca<sup>2+</sup> signals by presynaptic and postsynaptic activity in hippocampal interneurons. *J Neurosci* **25**, 990-1001.
- Tozzi A, Guatteo E, Caputi L, Bernardi G & Mercuri NB. (2001). Group I mGluRs coupled to G proteins are regulated by tyrosine kinase in dopamine neurons of the rat midbrain. *J Neurophysiol* **85**, 2490-2497.
- Trebak M, Lemonnier L, Smyth JT, Vazquez G & Putney JW, Jr. (2007). Phospholipase C-coupled receptors and activation of TRPC channels. *Handb Exp Pharmacol*, 593-614.
- Vaca L, Sinkins WG, Hu Y, Kunze DL & Schilling WP. (1994). Activation of recombinant trp by thapsigargin in Sf9 insect cells. *Am J Physiol* **267**, C1501-1505.
- Valenti O, Conn PJ & Marino MJ. (2002). Distinct physiological roles of the Gq-coupled metabotropic glutamate receptors Co-expressed in the same neuronal populations. *J Cell Physiol* **191**, 125-137.
- van Hooft JA, Giuffrida R, Blatow M & Monyer H. (2000). Differential expression of group I metabotropic glutamate receptors in functionally distinct hippocampal interneurons. *J Neurosci* **20**, 3544-3551.
- Venkatachalam K & Montell C. (2007). TRP channels. *Annu Rev Biochem* **76**, 387-417.
- von Bohlen Und Halbach O, Hinz U, Unsicker K & Egorov AV. (2005). Distribution of TRPC1 and TRPC5 in medial temporal lobe structures of mice. *Cell Tissue Res* **322**, 201-206.

- Wes PD, 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**, 9652-9656.
- Woodhall G, Gee CE, Robitaille R & Lacaille JC. (1999). Membrane potential and intracellular Ca<sup>2+</sup> oscillations activated by mGluRs in hippocampal stratum oriens/alveus interneurons. *J Neurophysiol* **81**, 371-382.
- Worley PF, Zeng W, Huang G, Kim JY, Shin DM, Kim MS, Yuan JP, Kiselyov K & Muallem S. (2007). Homer proteins in Ca<sup>2+</sup> signaling by excitable and non-excitable cells. *Cell Calcium* **42**, 363-371.
- Wu MM, Buchanan J, Luik RM & Lewis RS. (2006). Ca<sup>2+</sup> store depletion causes STIM1 to accumulate in ER regions closely associated with the plasma membrane. *J Cell Biol* **174**, 803-813.
- Yuan JP, Kiselyov K, Shin DM, Chen J, Shcheynikov N, Kang SH, Dehoff MH, Schwarz MK, Seeburg PH, Muallem S & Worley PF. (2003). Homer binds TRPC family channels and is required for gating of TRPC1 by IP3 receptors. *Cell* **114**, 777-789.
- Yuan JP, Zeng W, Huang GN, Worley PF & Muallem S. (2007). STIM1 heteromultimerizes TRPC channels to determine their function as store-operated channels. *Nat Cell Biol* **9**, 636-645.
- Zechel S, Werner S & von Bohlen Und Halbach O. (2007). Distribution of TRPC4 in developing and adult murine brain. *Cell Tissue Res* **328**, 651-656.