

Université de Montréal

Régulation présynaptique des interneurons GABAergiques par le  
récepteur  $\mu$ -opioïde dans l'aire tegmentaire ventrale

par  
Annie Bergevin

Département de Pharmacologie  
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 pharmacologie

Août 2001

© Annie Bergevin, 2001



W

4

U58

2002

v.061

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Régulation présynaptique des interneurons GABAergiques par le  
récepteur  $\mu$ -opioïde dans l'aire tegmentaire ventrale

présenté par :  
Annie Bergevin

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Dr Guy Massicotte .....Président-rapporteur  
Dr Louis-Éric Trudeau .....Directeur de recherche  
Dr Richard Robitaille .....Membre du Jury

## RÉSUMÉ

L'aire tegmentaire ventrale (ATV) est impliquée dans des pathologies telle que la schizophrénie ainsi que dans les mécanismes de dépendance aux drogues d'abus. L'activité des neurones de cette région du cerveau est régulée par les opioïdes, une famille de petits peptides qui ont plusieurs rôles physiologiques. Il a été montré que les agonistes  $\mu$ -opioïdes inhibent l'activité des neurones GABAergiques de l'ATV. Nous avons tenté de déterminer si un des mécanismes d'action des agonistes  $\mu$ -opioïdes sur les neurones GABAergiques de l'ATV implique une inhibition de l'activité des terminaisons synaptiques. Des expériences de patch-clamp ont été effectuées à l'aide de neurones de l'ATV de rat en culture primaire. Le DAMGO, un agoniste spécifique des récepteurs  $\mu$ -opioïdes, a réduit l'amplitude des IPSCs évoqués par des potentiels d'action individuels. De plus, le DAMGO a diminué la fréquence, mais pas l'amplitude, des IPSCs miniatures, ce qui est compatible avec un mécanisme d'action localisé au niveau des terminaisons synaptiques. La fréquence des IPSCs miniatures évoqués par l'ionomycine, un ionophore calcique, a également été diminuée par le DAMGO, ce qui suggère un mécanisme agissant en aval de l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les terminaisons synaptiques. La majorité des effets du DAMGO ont été bloqués par la 4-AP, un bloqueur des canaux  $\text{K}^+$  dépendant du voltage. Les résultats obtenus suggèrent donc que le récepteur  $\mu$ -opioïde influence directement l'efficacité de l'appareil sécrétoire, et ce, par un mécanisme faisant intervenir des canaux  $\text{K}^+$  dépendants du voltage.

**Mots clés :** Neuroscience, patch-clamp, canaux potassiques, culture cellulaire, exocytose, ionomycine.

## SUMMARY

The ventral tegmental area (VTA) is implicated in pathologies like schizophrenia and in the reinforcing properties of many drugs of abuse, including opioids. The activity of neurons in this brain region is regulated by opioids, a family of small peptides that have multiple physiological roles. It has been shown that  $\mu$ -opioid receptor agonists inhibit the activity of VTA GABAergic neurons. Patch-clamp recordings of cultured rat VTA neurons were performed in order to investigate if  $\mu$ -opioid receptors located on the synaptic terminal of GABAergic neurons could be implicated in the effect of  $\mu$ -opioid agonists in the VTA. IPSCs evoked by single action potentials were inhibited by DAMGO, a selective  $\mu$ -opioid receptor agonist. This was accompanied by a decrease in the frequency but not the amplitude of spontaneous miniature IPSCs suggesting that  $\mu$ -opioid receptors localized on GABAergic nerve terminals directly inhibit GABA release. The frequency of miniature IPSCs evoked by the  $\text{Ca}^{2+}$  ionophore ionomycin was also inhibited by DAMGO, suggesting that GABA release was inhibited by a process downstream of  $\text{Ca}^{2+}$  influx in the terminals. The majority of the effects of DAMGO were prevented by the voltage-dependent  $\text{K}^+$  channel blocker 4-aminopyridine (4-AP). In summary, these results suggest that  $\mu$ -opioid receptor activation may directly influence the efficacy of the secretory process in GABAergic nerve terminals in the VTA by a mechanism that is influenced by voltage-dependent  $\text{K}^+$  channels.

**Keywords :** Neuroscience, patch-clamp, potassium channels, cell culture, exocytosis, ionomycine.

## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ .....	iii
RÉSUMÉ EN ANGLAIS.....	iv
TABLE DES MATIÈRES .....	v
LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	viii
REMERCIEMENTS.....	xi
<b>1.0 INTRODUCTION.....</b>	<b>01</b>
1.1 L'AIRE TEGMENTAIRE VENTRALE .....	02
1.1.1 Description de l'ATV.....	04
1.1.2 Rôles de l'ATV .....	08
1.2 LES OPIOÏDES.....	10
1.2.1 Les récepteurs opioïdes .....	10
1.2.2 Le récepteur $\mu$ -opioïde .....	13
1.3 OPIOÏDES ET ATV : REVUE DE LA LITTÉRATURE .....	15
1.3.1 Mécanismes d'action des opioïdes dans l'ATV .....	16
1.4 MÉCANISMES DE RÉGULATION PRÉSYNAPTIQUE .....	18
1.4.1 Inhibition de canaux $Ca^{2+}$ présynaptiques.....	20
1.4.2 Activation de canaux $K^{+}$ présynaptiques.....	21
1.4.3 Inhibition de l'appareil sécrétoire .....	22
1.4.4 Mécanismes de régulation présynaptique par le récepteur $\mu$ -opioïde .....	24
1.5 MODÈLES EXPÉRIMENTAUX.....	26
1.5.1 Animaux intacts et enregistrements extracellulaires.....	26
1.5.2 Tranches de cerveau.....	29
1.5.3 Cultures neuronales.....	32
1.5.4 Synptosomes.....	35
1.6 TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES.....	37
1.6.1 Culture cellulaire.....	37

1.6.2 Électrophysiologie.....	39
1.7 PROBLÉMATIQUE .....	48
<b>2.0 MANUSCRIT : Presynaptic <math>\mu</math>-opioid Receptors Regulate a Late Step of the Secretory Process in Rat Ventral Tegmental Area GABAergic Neurons .....</b>	<b>49</b>
ACCORD DES COAUTEURS.....	50
PAGE TITRE .....	51
ABSTRACT .....	52
INTRODUCTION.....	53
MATERIALS AND METHODS .....	55
RESULTS.....	59
DISCUSSION .....	69
ACKNOWLEDGEMENTS .....	78
REFERENCES.....	79
FIGURE LEGENDS .....	86
<b>3.0 DISCUSSION .....</b>	<b>99</b>
3.1 EFFET DU DAMGO SUR LES NEURONES GABAERGIQUES EN CULTURE .....	100
3.2 MÉCANISME D'ACTION PRÉSYNAPTIQUE .....	102
3.3 MODULATION DIRECTE DE L'APPAREIL SÉCRÉTOIRE.....	103
3.4 IMPLICATION D'UN CANAL $K^+$ DÉPENDANT DU VOLTAGE .....	108
3.5 RÔLE DU CANAL $K^+$ PRÉSYNAPTIQUE .....	109
3.6 CONSIDÉRATIONS MÉTHODOLOGIQUES .....	115
<b>4.0 CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>117</b>
<b>5.0 RÉFÉRENCES.....</b>	<b>121</b>

## LISTE DES FIGURES

Figure 1. Les voies dopaminergiques centrales .....	03
Figure 2. Modèle possible de l'interaction opioïde-dopamine dans l'ATV.....	19
Figure 3. Neurones de l'ATV en culture standard .....	40
Figure 4. Neurones de l'ATV en culture micro-goutte.....	41
Figure 5. Quatres configurations possibles pour les enregistrements de patch clamp .....	43
Figure 6. Mécanismes d'action des agonistes $\mu$ -opioïdes dans l'ATV .....	114

## MANUSCRIT

Figure 1. Effect of DAMGO on spontaneous inhibitory postsynaptic currents (sIPSCs) .....	91
Figure 2. Effect of DAMGO on autaptic current amplitude in VTA GABAergic neurons in micro-dot culture.....	92
Figure 3. Effect of DAMGO on spontaneous miniature inhibitory post-synaptic currents (mIPSCs).....	93
Figure 4. Effect of $Ca^{2+}$ channel blockade on mIPSC modulation by DAMGO .....	94
Figure 5. Effect of DAMGO on mIPSCs triggered by ionomycin .....	95
Figure 6. Effect of DAMGO on mIPSCs triggered by the $Ca^{2+}$ -independent secretagogue ruthenium red (RR).....	96
Figure 7. Mechanism of autaptic current amplitude decrease by DAMGO .....	97
Figure 8. Mechanism of mIPSC frequency decrease by DAMGO.....	98

**LISTE DES ABRÉVIATIONS**

4-AP	: 4-aminopyridine
ADN	: Acide désoxyribonucléique
AMPA	: $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxalone propionate
ARN	: Acide ribonucléique
ARNm	: Acide ribonucléique messenger
ATV	: Aire tegmentaire ventrale
Ba <sup>2+</sup>	: Barium
Ca <sup>2+</sup>	: Calcium
CaMKII	: Calmoduline Kinase II
Cd <sup>2+</sup>	: Cadmium
CFTR	: Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
Cl <sup>-</sup>	: Chlore
CNQX	: Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione
CPSE	: Courants postsynaptiques excitateurs
CPSI	: Courants postsynaptiques inhibiteurs
CTOP	: D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr-NH <sub>2</sub>
DAergic	: Dopaminergique
DAMGO	: [D-Ala <sup>2</sup> ,N-Me-Phe <sup>4</sup> ,Gly <sup>5</sup> -ol]-enkephalin
GAD	: Décarboxylase de l'acide glutamique
GABA	: Acide $\gamma$ -aminobutyrique

GIRK	: G-protein gated inward rectifying K <sup>+</sup>
GP	: Globus pallidus
GTPase	: Enzyme dépendante de la guanine triphosphate
IPSCs	: Courants postsynaptiques inhibiteurs
K <sup>+</sup>	: Potassium
LTP	: Potentialisation à long terme
MAP	: Protéine activée par les mitogènes
mIPSCs	: Courants postsynaptiques inhibiteurs miniatures
Na <sup>+</sup>	: Sodium
NAc	: Noyau accumbens
NMDA	: N-méthyl-D-aspartate
NSF	: <i>N</i> -ethylmaleimide-sensitive factor
ORL-1	: Opioid-receptor like 1
PAG	: Substance grise périacqueducatale
PCR	: Réaction en chaîne en présence de polymérase
PKA	: Protéine kinase A
PKC	: Protéine kinase C
PV	: Pallidum ventral
RCPGs	: Récepteurs couplés aux protéines G
RR	: Rouge de ruthénium
sIPSCs	: Courants postsynaptiques inhibiteurs spontanés
SN	: Substance noire
SNC	: Système nerveux central
SNAP	: Soluble NSF attachment protein

SNAP-25 : Synaptosomal associated protein of 25 kDa

SNARE : Soluble NSF attachment protein receptor

TTX : Tétrodotoxine

VAMP : Vesicle associated membrane proteins

## REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord témoigner ma reconnaissance envers mon directeur de recherche, le Dr Louis-Éric Trudeau. Son excellente direction, ses connaissances, sa patience et sa disponibilité m'ont aidé tout au long de la réalisation de ce projet de recherche.

Je tiens également à remercier mes collègues du laboratoire Patrice Congar, Marie-Josée Bourque, Claudia Jomphe, Isabel Jutras et François Michel. J'ai beaucoup apprécié travailler à vos côtés. Grâce à vous, je garderai des deux années passées au labo d'excellents souvenirs. Merci aussi à Caroline Fradette, Caroline Gagnon et Fannie St-Gelais. Sans vous, mon passage au département de pharmacologie n'aurait sûrement pas été aussi agréable.

Merci à Geneviève et Dominique pour toujours avoir été là quand j'en avais besoin, dans les bons comme dans les moins bons moments... Vous êtes de très bonnes amies. Merci aussi à Nicolas pour ton écoute et tes encouragements qui m'ont beaucoup aidés lors de l'écriture de ce mémoire.

Finalement, j'aimerais remercier ma famille, en particulier mes parents, pour leur amour, leur écoute et leur générosité. Vous m'avez toujours appuyé dans mes démarches et je vous en remercie du fond du cœur.

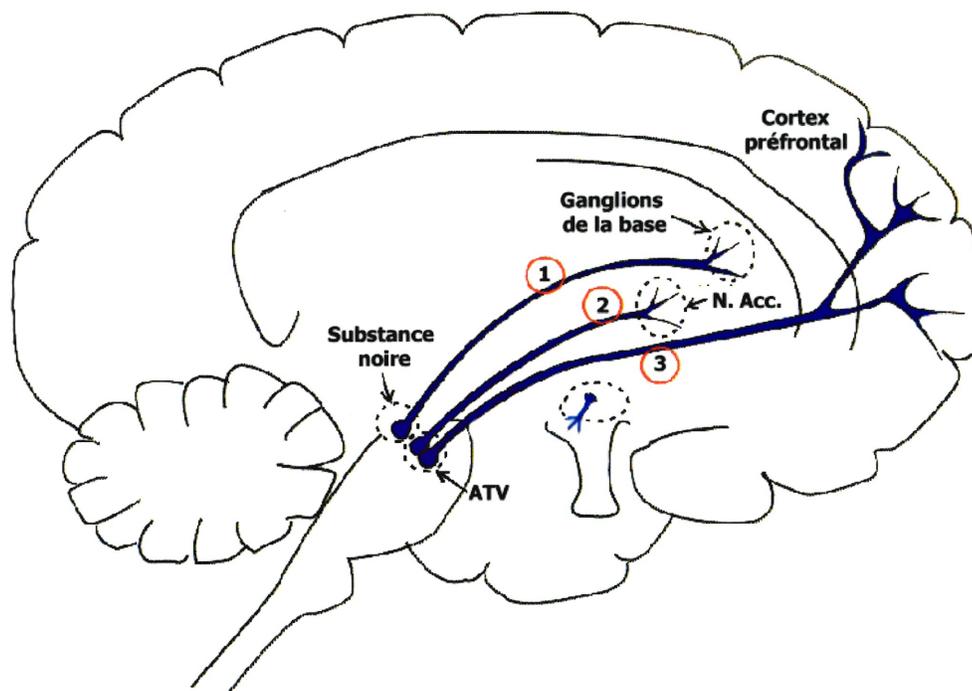
## **INTRODUCTION**

## 1.1 L'AIRE TEGMENTAIRE VENTRALE

L'Aire tegmentaire ventrale (ATV), initialement décrite chez l'opossum (Tsai 1925), est une région du cerveau riche en neurones dopaminergiques qui est située dans la partie ventrale du mésencéphale. L'ATV se situe au sein du groupe de cellules dopaminergiques A10. Ce dernier est localisé dorsalement au noyau interpedoncularis et latéralement à la substance noire (SN), qui contient le groupe de neurones dopaminergiques A9 à l'origine de la voie nigrostriée (Dahlstrom et Fuxe 1964). En plus de l'ATV, le groupe A10 comprend le noyau interfascicularis ainsi que le noyau linearis raphe pars caudalis (Phillipson 1979).

L'ATV constitue une composante importante du système dopaminergique mésolimbique. Historiquement, ce système a été décrit comme originant du groupe de cellules A10 et innervant le noyau accumbens (NAc), dans le striatum ventral, ainsi que le tubercule olfactif, le noyau septal et d'autres régions associées au système limbique (Dahlstrom et Fuxe 1964; Ungerstedt 1971). Comme l'ATV innerve également le cortex préfrontal pour former la voie mésocorticale dopaminergique (Lindvall et coll. 1974), ces deux systèmes sont souvent regroupés en un seul, et le terme système mésocorticolimbique est fréquemment utilisé pour décrire l'ensemble des voies dopaminergiques ascendantes originant de l'ATV.

Le système mésocorticolimbique ainsi que le système nigrostrié, comprenant le groupe de neurones dopaminergique A9 et ses projections au striatum, constituent l'essentiel des voies dopaminergiques centrales (figure 1).



*Modifié de Stahl 1997 (voir références)*

**Figure 1** : Les voies dopaminergiques centrales. L'ATV est à l'origine du système mésocorticolimbique, qui comprend les neurones dopaminergiques de l'ATV ainsi que leurs projections vers les régions limbiques (2) et corticales (3) du cerveau. La SN, quant à elle, est à l'origine de la voie nigrostriée (1).

### 1.1.1 Description de l'ATV

L'ATV se subdivise en deux compartiments, soit le noyau parabrachialis pigmentosus et le noyau paranigralis (Phillipson 1979). Deux principales populations de neurones sont retrouvées dans l'ATV. En se basant sur des critères électrophysiologiques, on a tout d'abord fait référence à ces deux types de neurones comme étant les cellules principales et secondaires (Johnson et North 1992a; Johnson et North 1992b), nommées ainsi car leurs caractéristiques correspondaient à celles de cellules du même nom dans la SN. Les cellules du premier groupe correspondent aux neurones dopaminergiques projetant vers les régions limbiques et corticales du cerveau. L'identité des cellules du second groupe a été moins bien caractérisée, mais plusieurs études suggèrent que celles-ci seraient en grande partie des neurones contenant de l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA), c'est-à-dire des neurones GABAergiques. En effet, il a été montré qu'une certaine proportion des cellules dans l'ATV sont immunoréactives pour le GABA (Bayer et Pickel 1991), la GABA transaminase (GABA-T), qui est l'enzyme qui métabolise le GABA (Nagai et coll. 1983), ainsi que pour la décarboxylase de l'acide glutamique (GAD), qui est l'enzyme de synthèse du GABA (Fonnum et coll. 1977; Mugnaini et Oertel 1985). De plus, des études électrophysiologiques sur tranches d'ATV ont également démontré la présence de courants post-synaptiques GABAergiques sur les cellules principales de l'ATV (Sugita et coll. 1992; Johnson et North 1992a; Johnson et North 1992b), suggérant la présence de neurones GABAergiques intrinsèques à la tranche.

Des études anatomiques suggèrent que les cellules GABAergiques constituent environ 15 à 20% de la population totale des neurones de l'ATV (Mugnaini et Oertel 1985; Kalivas 1993) et celles-ci seraient de deux types, c'est-à-dire des neurones de projections ainsi que des interneurones. En effet, des études récentes ont démontré que des neurones GABAergiques de l'ATV envoient des projections au niveau du NAc (Van Bockstaele et Pickel 1995) ainsi que du cortex préfrontal (Carr et Sesack 2000). Par contre, des évidences suggèrent également qu'un certain pourcentage de la population de neurones GABAergiques de l'ATV serait composé d'interneurones intrinsèques à cette structure (Johnson et North 1992a; Johnson et North 1992b). Il a été montré que les cellules dopaminergiques constituent les cibles principales des terminaisons immunoréactives pour le GABA dans l'ATV (Bayer et Pickel 1991). Les interneurones GABAergiques intrinsèques à l'ATV pourraient donc réguler de manière importante l'activité des cellules dopaminergiques de cette structure en exerçant une action inhibitrice sur ces dernières.

En plus d'une régulation par des neurones intrinsèques, l'activité des neurones de l'ATV est également modulée par de nombreuses afférences provenant d'autres structures. Parmi celles-ci, on retrouve des afférences provenant de régions elles-mêmes innervées par l'ATV, entraînant la formation d'un rétro-contrôle, mais aussi des afférences de structures ne recevant pas de projections de l'ATV. Les deux principaux types d'afférences à l'ATV sont des afférences excitatrices, utilisant le glutamate comme neurotransmetteur, et des afférences inhibitrices utilisant le GABA.

Les afférences excitatrices de l'ATV proviennent principalement du cortex préfrontal (Beckstead 1979; Christie et coll. 1985), mais des afférences excitatrices régulant l'activité des neurones de l'ATV proviennent également de l'amygdale (Wallace et coll. 1989) et de l'habenula (Matsuda et Fujimura 1992). En ce qui concerne les afférences inhibitrices utilisant le GABA, celles-ci proviennent principalement de deux structures, soit le NAc (Walaas et Fonnum 1980; Yim et Mogenson 1980; Kalivas et coll. 1993) et le pallidum ventral (PV) (Zahm 1989; Kalivas et coll. 1993). On retrouve également des afférences GABAergiques provenant du septum latéral et de la bande diagonale de Broca (Kalivas et coll. 1993). Via ces projections, le GABA pourrait donc directement inhiber les cellules dopaminergiques de l'ATV, ou les exciter indirectement via une désinhibition des interneurones GABAergiques intrinsèques à l'ATV. Des évidences suggèrent que les afférences GABAergiques externes à l'ATV effectueraient leur action inhibitrice via les récepteurs GABA<sub>B</sub>, tandis que les récepteurs GABA<sub>A</sub> médieraient l'action des interneurones GABAergiques intrinsèques à l'ATV (Sugita et coll. 1992; Johnson and North 1992b).

De nombreuses évidences suggèrent que le système GABAergique, au niveau du mésencéphale, serait intimement relié au système enképhalinergique. Ce système est composé de neurones utilisant des peptides dérivés de la proenképhaline comme neurotransmetteurs. Des études d'immunohistochimie ont en effet montré la présence de fibres enképhalinergiques dans l'ATV (Fallon et Leslie 1986). Des expériences de traçage rétrograde suggèrent que ces fibres seraient originaire du NAc, du PV, du

septum latéral, ainsi que de la bande diagonale de Broca (Kalivas et coll. 1993) et il semble que certains de ces neurones soient également GABAergiques. En effet, il a été montré qu'une certaine proportion des projections inhibitrices GABAergiques provenant du NAc, du PV, du septum latéral et de la bande diagonale de Broca co-expriment le GABA et les enképhalines (Kalivas et coll. 1993). Des techniques de traçage rétrograde combinées à de l'hybridation *in situ* ont montré que dans ces projections, 5 à 15% des cellules étaient doublement marquées pour l'ARNm de la GAD et l'ARNm de la préproenképhaline (PPE), un précurseur de l'enképhaline (Kalivas et coll. 1993). De plus, une certaine proportion (environ 20%) des terminaisons axonales immunoréactives pour l'enképhaline dans l'ATV sont également immunoréactives pour le GABA (Sesack et Pickel 1995). Il a été montré dans cette dernière étude que les terminaisons immunoréactives soit pour l'enképhaline, le GABA ou les deux neurotransmetteurs forment fréquemment des synapses très rapprochées sur les mêmes dendrites et sont en apposition l'une contre l'autre (Sesack et Pickel 1995).

Enfin, l'activité des neurones de l'ATV serait également influencée par des afférences sérotoninergiques provenant du noyau raphé (Vertes 1991), des afférences cholinergiques provenant du noyau latérodorsal tegmentaire (LDT) et du noyau tegmentaire pédonculopontin (PPT) (Oakman et coll. 1995), ainsi que des afférences noradrénergiques provenant du locus coeruleus (Grenhoff et coll. 1993).

### 1.1.2 Rôles de l'ATV

Comme il a été mentionné précédemment, l'ATV constitue une composante importante du système mésocorticolimbique dopaminergique. Ce système a été l'objet de nombreuses études étant donné qu'il a été associé à des désordres neuropsychiatriques comme la schizophrénie, ainsi qu'aux mécanismes de récompense à la fois naturels et reliés aux drogues d'abus. Une meilleure compréhension de la régulation des neurones de l'ATV s'avère donc importante dans le but éventuel de mieux traiter les patients atteints de maladies mentales ainsi que ceux aux prises avec un problème de dépendance aux drogues d'abus.

Plusieurs études ont montré que le système mésolimbique dopaminergique serait impliqué de manière importante dans la physiopathologie de la schizophrénie (Grace 1991). En effet, l'hypothèse dopaminergique de la schizophrénie stipule qu'une altération fonctionnelle des systèmes dopaminergiques centraux serait à l'origine de cette pathologie (Goldstein et Deutch 1992). Cette hypothèse découle de deux observations. Premièrement, les drogues efficaces en clinique pour traiter les patients atteints de schizophrénie ont une haute affinité pour le récepteur dopaminergique de type D<sub>2</sub> (Seeman et coll. 1976). Deuxièmement, l'administration d'amphétamine, un agoniste dopaminergique indirect, induit chez l'humain un état psychologique qui ressemble en plusieurs aspects à un épisode psychotique (Bell 1973). L'implication du système mésocorticolimbique dans cette pathologie est également supportée par le fait que tant les antipsychotiques classiques qu'atypiques

exercer certains de leurs effets sur les neurones de l'ATV (Chiodo et Bunney 1983). Bien qu'encore mal défini, l'ATV aurait donc un rôle important dans la physiopathologie de la schizophrénie.

Le système mésocorticolimbique est également associé aux mécanismes de récompense. En effet, des études de stimulation électrique intracrânienne effectuées chez le rat ont montré depuis longtemps que l'ATV est une des structures du cerveau associée aux effets de récompense les plus forts (Olds et Olds 1963). L'injection de drogues d'abus telles les amphétamines, les opioïdes et la cocaïne facilite l'auto-stimulation électrique intracrânienne, ce qui suggère que les drogues d'abus et les effets de récompense exercent leurs actions sur le même réseau neuronal (Wise 1996). Il n'est donc pas étonnant de constater que le système mésocorticolimbique est associé au phénomène de dépendance à l'alcool et aux drogues d'abus (Wise 1996; Koob et Le Moal 1997). En effet, ce système a été associé au phénomène de dépendance et de tolérance pour différents types de drogues d'abus, dont les opioïdes comme l'héroïne et la morphine. De nombreuses études d'auto-administration intracrânienne ont d'ailleurs montré que les rongeurs peuvent s'auto-administrer de la morphine ou des agonistes  $\mu$ -opioïdes dans l'ATV, et ce, en apprenant à appuyer sur un levier ou à donner une poussée à l'aide de leur nez afin d'obtenir une micro-injection de drogue directement dans cette région du cerveau (McBride et coll. 1999). L'ATV aurait donc un rôle important dans le phénomène de dépendance aux opioïdes.

## 1.2 LES OPIOÏDES

Les opioïdes sont des substances dérivées de l'opium, un composé extrait de la plante *papaver somnerifum* et utilisé depuis des centaines d'années pour combattre la toux et la diarrhée, pour soulager la douleur, et aussi parce qu'il provoque un état d'euphorie. La morphine, qui est le principe actif de l'opium, fut le premier opioïde à être isolé au siècle dernier par le chimiste allemand Friedrich Sertürner. Depuis, plusieurs autres dérivés de la morphine, dont l'héroïne, ont été synthétisés. Les opioïdes sont fréquemment utilisés pour le traitement de la douleur. Les propriétés analgésiques des opioïdes ainsi que la dépendance et la tolérance qu'ils engendrent suite à une administration chronique ont suscité un grand intérêt pour l'étude de cette classe de composé.

### 1.2.1 Les récepteurs opioïdes

De nombreuses études effectuées au cours des dernières décennies ont permis d'établir clairement que les composés de type opioïde exercent leurs effets biologiques en activant des récepteurs membranaires spécifiques dans le système nerveux central (SNC) et le système nerveux périphérique (SNP). Les premières évidences suggérant l'existence de multiples formes de récepteurs opioïdes ont été apportées par Martin et coll. (Martin et coll. 1976). Ceux-ci ont proposé l'existence de plus d'un type de récepteurs opioïdes pour expliquer leurs observations

comportementales et neurophysiologiques obtenues chez des chiens spinaux chroniques. Depuis, trois principaux types de récepteurs opioïdes ont été identifiés, et ce, sur la base de leur affinité pour différents ligands. Ce sont les récepteurs de type  $\delta$  (aussi appelé DOR ou  $OP_1$ ),  $\kappa$  (KOR ou  $OP_2$ ) et  $\mu$  (MOR ou  $OP_3$ ) (Dhawan et coll. 1996). Les gènes encodant ces trois types de récepteurs ont récemment été clonés (Knapp et coll. 1995). Des études pharmacologiques *in vitro* et *in vivo* suggèrent l'existence de différents sous-types pour chacun de ces récepteurs. En effet, il y aurait au moins deux sous-types pour le récepteur  $\delta$  ( $\delta_1$  et  $\delta_2$ ), trois pour le récepteur  $\kappa$  ( $\kappa_1$ ,  $\kappa_2$  et  $\kappa_3$ ) et deux pour le récepteur  $\mu$  ( $\mu_1$  et  $\mu_2$ ) (Dhawan et coll. 1996). Toutefois, un seul gène par type de récepteur opioïde ( $\delta$ ,  $\kappa$ ,  $\mu$ ) a été cloné jusqu'à ce jour.

Les récepteurs opioïdes représentent les cibles naturelles d'une variété de peptides endogènes retrouvés à la fois dans le SNC et en périphérie. Chez les mammifères, ces peptides opioïdes endogènes sont dérivés de trois précurseurs : la proenképhaline, la prodynorphine et la proopiomelanocortine. Les gènes de ces trois familles de peptides opioïdes ont été caractérisés et clonés (Akil et coll. 1984). La proenképhaline est le précurseur des met-enképhalines et de la leu-enképhaline, la prodynorphine est le précurseur des dynorphines (A et B) et des néoendorphines ( $\alpha$  et  $\beta$ ) et la proopiomelanocortine est le précurseur de la  $\beta$ -endorphine (Dhawan et coll. 1996). Plus récemment, deux nouveaux peptides opioïdes endogènes, les endomorphines 1 et 2, ont été découverts (Zadina et coll. 1997). Cependant, le précurseur des peptides de cette famille n'a pas été identifié jusqu'à maintenant. L'affinité de ces différents ligands endogènes pour les trois types de récepteurs

opioïdes semble variable. En effet, le récepteur  $\delta$  lierait préférentiellement les enképhalines, le récepteur  $\kappa$  les dynorphines, et le récepteur  $\mu$  les endomorphines (Dhawan et coll. 1996; Zadina et coll. 1997).

Le clonage des récepteurs opioïdes a montré que ceux-ci font partie de la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs). Les RCPGs sont caractérisés par la présence d'un domaine extracellulaire N-terminal, de 7 domaines transmembranaires et d'un domaine intracellulaire en C-terminal (Strader et coll. 1994). La signalisation via cette classe de récepteur est classiquement médiée par une interaction avec des protéines G (protéines liant le nucléotide guanine triphosphate). Les récepteurs opioïdes appartiennent au groupe de récepteurs qui interagissent préférentiellement avec des protéines G des familles  $G_i$  et  $G_o$ , sensibles à la toxine pertussique (PTX) (Connor et Christie 1999).

L'activation des récepteurs opioïdes entraîne une multitude de réponses cellulaires médiées par de nombreux effecteurs. En effet, il est depuis longtemps connu que les récepteurs opioïdes, comme plusieurs récepteurs qui utilisent les protéines de la famille  $G_i$  pour la transduction du signal intracellulaire, ont la capacité d'inhiber l'adénylyl cyclase (Sharma et coll. 1977) et les canaux  $Ca^{2+}$  (Hescheler et coll. 1987; Surprenant et coll. 1990), d'activer les canaux  $K^+$  (North et coll. 1987) et d'augmenter la concentration intracellulaire de  $Ca^{2+}$  (Jin et coll. 1992). Plus récemment, il a également été montré que les récepteurs opioïdes peuvent réguler la cascade de la MAP kinase (Fukuda et coll. 1996). En général, les effets engendrés

par la stimulation des récepteurs opioïdes ont une action inhibitrice sur la transmission synaptique.

Le récepteur ORL-1, un RCPG possédant près de 50% d'homologie de séquence avec les autres récepteurs opioïdes, a récemment été identifié et constituerait un quatrième récepteur opioïde (Mollereau et coll. 1994). Par contre, l'affinité de celui-ci pour les ligands opioïdes, incluant la naloxone, est beaucoup plus faible qu'elle ne l'est pour les autres types de récepteurs opioïdes (Henderson et McKnight 1997). Le récepteur ORL-1 aurait pour ligand endogène la nociceptine (Meunier et coll. 1995), aussi appelée orphanine FQ (Reinscheid et coll. 1995). Ce ligand dériverait également d'un précurseur, mais il s'agirait d'un pro-peptide différent de ceux mentionnés précédemment (Meunier et coll. 1995). Les réponses cellulaires évoquées par le récepteur ORL-1 seraient du même type que celles évoquées par les autres types de récepteurs opioïdes (Henderson et McKnight 1997).

### **1.2.2 Le récepteur $\mu$ -opioïde**

Le récepteur  $\mu$ -opioïde est le type de récepteur opioïde auquel on a porté le plus d'attention. En effet, ce dernier est le récepteur possédant la meilleure activité antinociceptive, mais aussi celui ayant été le plus associé aux phénomènes de dépendance et de tolérance. Le récepteur de type  $\mu$  est retrouvé à la fois dans le SNC et en périphérie.

Des trois types de récepteurs opioïdes, c'est le récepteur  $\mu$  qui possède la plus grande affinité pour la morphine. Celle-ci peut tout de même se lier aux récepteurs  $\delta$  et  $\kappa$ , mais avec une affinité beaucoup plus faible (Dhawan et coll. 1996). Suite au clonage des récepteurs opioïdes, le rôle du récepteur  $\mu$  dans l'analgésie induite par la morphine a pu être confirmé par l'élaboration de souris *knock-out* pour ce récepteur. En effet, plusieurs études ont démontré que chez les souris n'exprimant pas le récepteur  $\mu$ -opioïde, l'antinociception causée par la morphine était absente, et ce, à des doses engendrant une forte analgésie chez des souris de type sauvage (Kieffer 1999). Il a également été démontré que la morphine ne possède pas de propriétés de récompense ou l'habileté d'induire une dépendance physique chez les souris *knock-out* pour le récepteur de type  $\mu$  (Matthes et coll. 1996).

En plus de son rôle dans la nociception, le récepteur  $\mu$  joue également un rôle dans la respiration, les fonctions cardio-vasculaires, le transit intestinal, les comportements d'appétence, l'apprentissage et la mémoire, l'activité locomotrice, la thermorégulation, la sécrétion hormonale et la fonction immunitaire. La plupart du temps, ces fonctions seront déprimées suite à l'activation du récepteur de type  $\mu$  (Dhawan et coll. 1996).

Comme il a été mentionné précédemment, des études pharmacologiques *in vitro* et *in vivo* suggèrent l'existence de deux sous-types de récepteurs  $\mu$ -opioïdes, appelé  $\mu_1$  et  $\mu_2$ . Des produits d'épissage alternatif du gène MOR-1, le gène encodant le récepteur  $\mu$ , ont été identifiés, mais leur pharmacologie respective ne semble pas

différer (Pasternak 2001). L'existence de différents sous-types pharmacologiquement distincts du récepteur de type  $\mu$  reste donc encore à être confirmée

### **1.3 OPIOÏDES ET ATV : REVUE DE LA LITTÉRATURE**

Le lien entre les drogues opioïdes et l'ATV est connu depuis de nombreuses années. Comme il a été mentionné précédemment, l'ATV est associée au phénomène de dépendance et de tolérance aux drogues d'abus comme les drogues opioïdes. Différentes études ont d'ailleurs montré que des rats peuvent s'auto-administrer des drogues opioïdes dans l'ATV. En effet, les rats peuvent rapidement apprendre à appuyer sur un levier dans le but d'obtenir des micro-injections d'agonistes opioïdes au niveau de l'ATV (Bozarth et Wise 1981; Devine et Wise 1994). De plus, la micro-injection d'opioïdes dans l'ATV produit de la préférence de place conditionnée (Phillips et LePiane 1980; Phillips et coll. 1983), c'est-à-dire l'induction d'une recherche de l'environnement où une substance a été administrée. La préférence de place conditionnée permet de mettre en évidence les effets de récompense d'une substance. En plus d'être associés à des effets de récompense, les opioïdes sont également associés à un effet locomoteur au niveau de l'ATV. En effet, la micro-injection d'opioïdes dans cette région induit une augmentation de l'activité ambulatoire spontanée chez les rats (Broekkamp et coll. 1979; Kelley et coll. 1980).

Plusieurs évidences suggèrent que les effets de récompense et les effets stimulants sur l'activité locomotrice observés suite à l'injection d'opioïdes dans l'ATV seraient dûs à une augmentation de l'activité des neurones dopaminergiques de cette structure. En effet, il a été montré que la morphine, administrée de manière systémique ou appliquée directement au niveau de l'ATV, augmente la décharge des neurones dopaminergiques (Gysling et Wang 1983). De plus, la micro-injection d'analogues de l'enképhaline dans l'ATV augmente la libération de dopamine dans les structures où sont situées les terminaisons des neurones dopaminergiques de l'ATV, comme le NAc (Kalivas et Duffy 1990) et la partie ventrale du striatum (Devine et coll. 1993).

### **1.3.1 Mécanismes d'action des opioïdes dans l'ATV**

Différentes études suggèrent que les agonistes opioïdes dans l'ATV exerceraient leurs effets sur les neurones GABAergiques intrinsèques à cette structure. En effet, Johnson et North (Johnson et North 1992a) ont montré, à l'aide d'expériences d'électrophysiologie effectuées sur une préparation de tranches d'ATV, que les agonistes  $\mu$ -opioïdes inhibent l'activité des neurones GABAergiques de l'ATV. Des études de microdialyse *in vivo* ont également montré que la microdialyse de morphine dans l'ATV de rats conscients provoque une diminution de la concentration extracellulaire de GABA dans cette structure (Klitenick et coll. 1992). Suite à ces observations, et puisqu'il est connu que les interneurones GABAergiques

régulent normalement l'activité des neurones dopaminergiques dans l'ATV en les inhibant, il a été suggéré que l'effet des opioïdes sur les neurones GABAergiques intrinsèques à l'ATV résulte en une désinhibition des neurones dopaminergiques, provoquant ainsi une augmentation de la transmission dopaminergique mésocorticolimbique (Gysling et Wang 1983; Johnson et North 1992a).

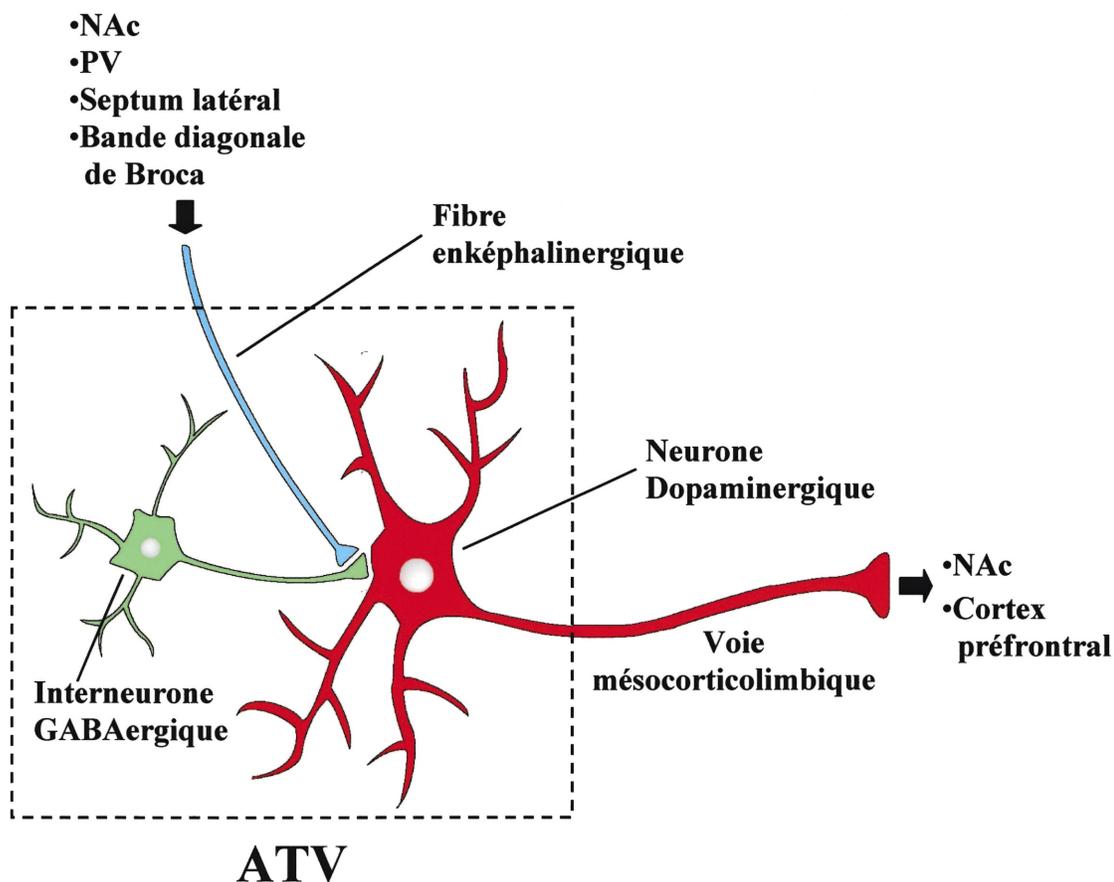
Bien que l'on connaisse l'identité des neurones sur lesquels les agonistes opioïdes exercent leurs effets dans l'ATV, le mécanisme par lequel ceux-ci inhibent ces neurones est peu connu. Des enregistrements intracellulaires de cellules de l'ATV ont montré que l'application locale d'agonistes  $\mu$ -opioïdes hyperpolarise les neurones GABAergiques en activant une conductance  $K^+$  somatique (Johnson et North 1992a). Par contre, la libération d'opioïdes endogènes dans l'ATV pourrait également activer des récepteurs  $\mu$ -opioïdes situés au niveau des terminaisons synaptiques GABAergiques dans l'ATV. En effet, des évidences suggèrent la présence de récepteurs  $\mu$ -opioïdes sur les neurones GABAergiques de l'ATV (Dilts et Kalivas 1989), et l'apposition directe des terminaisons immunoréactives pour le GABA avec celles immunoréactives pour l'enképhaline est en accord avec une localisation présynaptique de ce récepteur (Sesack et Pickel 1995). De plus, une inhibition présynaptique de la relâche de neurotransmetteurs suite à l'activation de récepteurs opioïdes a été observée dans plusieurs régions du SNC. Par exemple, une modulation de la libération de GABA par des récepteurs  $\mu$ -opioïdes situés au niveau des terminaisons synaptiques a été observé dans l'hippocampe (Cohen et coll. 1992; Capogna et coll. 1993; Rekling 1993; Lupica 1995), le globus pallidus (GP) (Stanford

et Cooper 1999) et la substance grise périaqueducatale (PAG) (Vaughan et Christie 1997; Vaughan et coll. 1997). Dans ces exemples, la libération de GABA est diminuée suite à l'activation des récepteurs  $\mu$ -opioïdes situés sur les terminaisons synaptiques. Une question importante est donc de déterminer si de façon analogue, l'activation de récepteurs  $\mu$ -opioïdes situés sur les terminaisons synaptiques des neurones GABAergiques de l'ATV pourrait inhiber la libération de GABA (figure 2).

#### 1.4 MÉCANISMES DE RÉGULATION PRÉSYPNAPTIQUE

Comme il a été mentionné précédemment, le récepteur  $\mu$ -opioïde est un RCPG. Trois principaux mécanismes de régulation présynaptique ayant été associés aux RCPGs pourraient être responsables d'une régulation présynaptique (c'est-à-dire «terminale») de la libération de GABA par le récepteur  $\mu$ -opioïde dans l'ATV, soit l'inhibition d'un canal  $\text{Ca}^{2+}$  présynaptique, l'activation d'un canal  $\text{K}^{+}$  présynaptique et l'inhibition directe de l'appareil sécrétoire (pour une revue, voir Miller 1998). Ces mécanismes pourraient également être utilisés simultanément.

*Il est à noter que dans ce mémoire, le terme «présynaptique» sera utilisé pour désigner des mécanismes localisés au niveau de la terminaison synaptique, par opposition à des mécanismes localisés au niveau somatodendritique ou «postsynaptique».*



**Figure 2 :** Modèle possible de l'interaction opioïde-dopamine dans l'ATN. L'activité des neurones dopaminergiques de l'ATN est régulée par des interneurons GABAergiques inhibiteurs intrinsèques à cette structure. Il est possible que l'activation de récepteurs  $\mu$ -opioïdes situés au niveau des terminaisons synaptiques des interneurons GABAergiques soit responsable des effets des opioïdes dans l'ATN. L'activation de ces récepteurs diminuerait la libération de GABA, entraînant ainsi une désinhibition des neurones dopaminergiques du groupe A10. Ces derniers sont à l'origine de la voie mésocorticolimbique, qui est impliquée dans certains troubles neuropsychiatriques ainsi que dans les mécanismes de récompense.

### 1.4.1 Inhibition de canaux $\text{Ca}^{2+}$ présynaptiques

Les neurotransmetteurs sont libérés au niveau des terminaisons synaptiques par un mécanisme d'exocytose qui nécessite la fusion des vésicules synaptiques à la membrane plasmique neuronale. Il est connu que l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la terminaison synaptique est l'étape principale entraînant la fusion des vésicules à la membrane et la libération de neurotransmetteurs dans la fente synaptique. En effet, suite à l'arrivée d'un potentiel d'action, la dépolarisation de la terminaison entraîne l'ouverture de canaux  $\text{Ca}^{2+}$  dépendants du voltage situés dans des régions particulières nommées «zones actives» (Robitaille et coll. 1990). L'appareil sécrétoire se situe également dans la zone active, c'est donc au niveau de cette région qu'a lieu l'arrimage des vésicules synaptiques ainsi que leur fusion à la membrane. L'ouverture des canaux  $\text{Ca}^{2+}$  dépendants du voltage situés dans la zone active provoque une augmentation rapide de la concentration locale de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire près de la membrane à des valeurs de plus de 100  $\mu\text{M}$ . Le  $\text{Ca}^{2+}$ , alors présent en concentration suffisante, peut agir avec un senseur de  $\text{Ca}^{2+}$  associé à la vésicule (peut-être la synaptotagmine) et ainsi provoquer la fusion de la vésicule et la relâche de son contenu en neurotransmetteurs (Matthews 1996). Le  $\text{Ca}^{2+}$  produit simultanément d'autres effets sur le complexe de protéines associé à la vésicule synaptique (Bennett 1997). Le signal calcique a donc un rôle très important à jouer dans le déclenchement de l'exocytose de neurotransmetteurs au niveau des terminaisons synaptiques.

Étant donné l'implication importante de l'influx calcique dans la libération de neurotransmetteurs, une réduction de l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la terminaison suite à une inhibition des canaux  $\text{Ca}^{2+}$  dépendants du voltage devrait diminuer la libération de neurotransmetteurs. En effet, il a été montré que l'activation de certains RCPGs diminue la libération de neurotransmetteurs en inhibant des canaux  $\text{Ca}^{2+}$  localisés au niveau des terminaisons synaptiques. Par exemple, la suppression de la transmission synaptique observée suite à l'activation du récepteur  $\text{A}_1$  de l'adénosine serait en partie due à une inhibition de canaux  $\text{Ca}^{2+}$  présynaptiques (Yawo et Chuhma 1993; Wu et Saggau 1994).

#### **1.4.2 Activation de canaux $\text{K}^+$ présynaptiques**

La dépolarisation nécessaire à l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la terminaison, et donc à la libération de neurotransmetteurs, se produit suite à l'arrivée d'un potentiel d'action. Un second moyen d'inhiber la libération de neurotransmetteurs serait donc d'activer une conductance  $\text{K}^+$  hyperpolarisante au niveau de la terminaison synaptique, ce qui pourrait court-circuiter le potentiel d'action dans cette région du neurone (Segev 1990). En effet, l'ouverture d'un nombre suffisant de canaux  $\text{K}^+$ , en diminuant la résistance membranaire, aurait pour effet de réduire l'efficacité du potentiel d'action à dépolariser la terminaison synaptique. La durée et probablement l'amplitude du potentiel d'action seraient alors réduites au niveau de la terminaison, entraînant ainsi une diminution du nombre de canaux  $\text{Ca}^{2+}$  ouverts et finalement une diminution de la

libération de neurotransmetteurs. Ce type de mécanisme a été observé pour certains RCPGs. Par exemple, Simmons et Chavkin (1996) ont montré que l'inhibition de la libération de neurotransmetteurs suite à l'activation du récepteur  $\kappa$ -opioïde, au niveau de l'hippocampe, était due à l'activation d'une conductance  $K^+$  présynaptique.

### 1.4.3 Inhibition de l'appareil sécrétoire

Les dernières étapes menant à l'exocytose de neurotransmetteurs impliquent un complexe protéique associé aux vésicules synaptiques. Ce complexe de relâche vésiculaire est composé de protéines de la membrane vésiculaire et de la membrane plasmique neuronale, ainsi que d'éléments reliant les deux (Matthews 1996). Comme il a été mentionné précédemment, l'état de ce complexe est sensible au  $Ca^{2+}$ , ce qui permet de lier le signal calcique à l'exocytose de neurotransmetteurs (Bennett 1997). Les modèles actuels de l'exocytose des vésicules synaptiques suggèrent que les protéines SNAREs seraient les médiateurs de la fusion des vésicules à la membrane plasmique, et ce, sous le contrôle de facteurs additionnels incluant Rab3a, nSec1,  $\alpha$ -SNAP et NSF (Lin et Scheller 2000). Les SNAREs neuronales sont les protéines VAMP 2 (aussi appelé synaptobrévine), syntaxine 1, et SNAP-25. VAMP est située sur la membrane vésiculaire (Trimble et coll. 1988), tandis que la syntaxine 1 (Bennett et coll. 1992) et SNAP-25 (Oyler et coll. 1989) sont situées au niveau de la membrane plasmique. Ces trois protéines peuvent former un complexe ternaire et sont essentielles pour la fusion des vésicules. Certaines protéines vont influencer

l'activité des SNAREs. Parmi celles-ci, on compte Rab3a, une protéine de la famille des petites GTPases. Celle-ci jouerait un rôle dans le transport des vésicules via différents effecteurs tels la Rabphilin, RIM et PRA-1 (Lin et Scheller 2000). La protéine nSec1, quant à elle, se lie à la syntaxine pour empêcher la liaison de celle-ci à VAMP et SNAP-25 (Calakos et coll. 1994). De plus, les protéines NSF et  $\alpha$ -SNAP seraient impliquées dans le désassemblage du complexe des SNAREs (Lin et Scheller 2000). Finalement, la protéine synaptotagmine jouerait le rôle de senseur de  $\text{Ca}^{2+}$ , un élément important de la fusion des vésicules (Matthews 1996).

Le bon fonctionnement du complexe protéique associé aux vésicules synaptiques est essentiel pour la relâche de neurotransmetteurs. L'activation de RCPGs pourrait donc inhiber ou faciliter la libération de neurotransmetteurs en modulant l'état de ces protéines par le biais de modification post-traductionnelles. Ceci constituerait un troisième mécanisme possible de régulation présynaptique, mais cette fois-ci, en aval de l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la terminaison. Ce type de régulation a d'ailleurs été observée pour certains RCPGs. En effet, une modulation directe de l'appareil sécrétoire a été démontrée entre autre pour le récepteur  $A_1$  de l'adénosine (Capogna et coll. 1996; Trudeau et coll. 1996a) ainsi que pour les récepteurs  $\text{GABA}_B$  et  $\mu$ -opioïde (Capogna et coll. 1996) dans les neurones de l'hippocampe. Parmi les voies de signalisation qui pourraient être impliquées dans la modulation directe de l'exocytose, on compte les voies impliquant la protéine kinase A (PKA) et la protéine kinase C (PKC), qui sont deux enzymes majeures impliquées dans la plasticité à court et à long terme. En effet, il a été montré que l'activation de cette dernière par des

esters de phorbol potentialise la transmission synaptique par un mécanisme d'action présynaptique indépendant du  $\text{Ca}^{2+}$  (Bouron et Reuter 1997; Capogna et coll. 1995). En effet, des évidences obtenues à l'aide de neurones de l'hippocampe en culture suggèrent que la PKC exercerait plutôt son effet en augmentant la réserve de vésicules immédiatement libérables au niveau de la terminaison et en accélérant la vitesse du remplissage de cette réserve (Stevens et Sullivan 1998). Par contre, une description moléculaire de l'effet de la PKC demeure toujours absente. En ce qui concerne la PKA, il a été montré que son activation à l'aide de la forskoline facilite également la transmission synaptique, et ce, par un mécanisme agissant en aval de l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la terminaison (Capogna et coll. 1995; Trudeau et coll. 1996b), comme c'est le cas pour la PKC. Par contre, les effets de la PKC et de la PKA sont additifs, ce qui suggère que ces kinases ont pour cible différentes protéines (Bouron et Reuter 1997; Capogna et coll. 1995). La PKA affecterait directement l'appareil sécrétoire en favorisant l'interaction entre le module senseur de  $\text{Ca}^{2+}$  et l'appareil sécrétoire (Trudeau et coll. 1998) pour faciliter la libération de neurotransmetteurs.

#### **1.4.4 Mécanismes de régulation présynaptique par le récepteur $\mu$ -opioïde**

Comme il a été mentionné ci-haut, une régulation de la libération de neurotransmetteurs suite à l'activation de récepteurs  $\mu$ -opioïdes situés au niveau des terminaisons synaptiques a déjà été observée dans plusieurs régions du SNC. En effet, une inhibition présynaptique de la libération de GABA suite à l'activation de

récepteurs  $\mu$ -opioïdes a été observée dans l'hippocampe (Cohen et coll. 1992; Capogna et coll. 1993; Rekling 1993; Lupica 1995), le GP (Stanford et Cooper 1999) et le PAG (Vaughan et Christie 1997; Vaughan et al. 1997).

Dans deux de ces régions, le mécanisme responsable de la modulation de la libération de neurotransmetteurs par le récepteur  $\mu$ -opioïde a été identifié en partie. Dans les deux cas, il s'agit de mécanismes classiques de régulation présynaptique par les RCPGs. En effet, il semble que dans le PAG, la diminution de la libération de GABA suite à l'activation de récepteurs  $\mu$ -opioïdes soit due à l'activation d'un canal  $K^+$  dépendant du voltage localisé au niveau de la terminaison synaptique et sensible à la 4-aminopyridine (4-AP) et à la dendrotoxine (Vaughan et coll. 1997). Dans l'hippocampe, un mécanisme impliquant une inhibition directe de l'appareil sécrétoire a été suggéré pour l'inhibition présynaptique de la libération de GABA suite à l'activation du récepteur  $\mu$ -opioïde au niveau des interneurons de la région CA3 (Capogna et al. 1993; Capogna et coll. 1996).

Ces observations suggèrent que le mécanisme modulant la libération de GABA dans l'ATV pourrait impliquer l'activation d'un canal  $K^+$  présynaptique ou une inhibition directe de l'appareil sécrétoire. Par contre, comme il a été mentionné précédemment, les récepteurs opioïdes ont également pour effecteurs les canaux  $Ca^{2+}$ . L'inhibition des canaux  $Ca^{2+}$  présynaptiques dépendants du voltage constituerait donc un autre mode possible par lequel le récepteur  $\mu$ -opioïde pourrait inhiber la libération de GABA dans l'ATV.

## 1.5 MODÈLES EXPÉRIMENTAUX

Plusieurs modèles expérimentaux sont disponibles pour l'étude du mécanisme d'action de différentes drogues au niveau du SNC. Parmi ceux-ci, on retrouve à la fois des modèles *in vivo* et *in vitro*. En effet, on peut tout d'abord étudier les mécanismes d'action des drogues *in vivo* à l'aide d'enregistrements extracellulaires effectués sur des animaux intacts. Il est également possible de faire des études *in vitro* à l'aide des modèles de tranches de cerveau, de cultures neuronales et de synaptosomes.

### 1.5.1 Animaux intacts et enregistrements extracellulaires

Le premier modèle permettant d'étudier le mécanisme d'action des drogues au niveau du SNC est l'animal entier. En effet, il est possible, avec ce modèle, d'effectuer des expériences d'électrophysiologie et de mesurer, *in vivo*, l'activité neuronale au niveau d'une région cérébrale donnée. Pour ce faire, il est possible d'implanter une microélectrode de métal dans une structure précise du cerveau à l'aide d'un appareil de stéréotaxie. Ce type d'appareil permet, chez l'animal anesthésié et immobilisé, de repérer une structure selon des coordonnées précises, appelées coordonnées stéréotaxiques, et d'implanter une microélectrode d'enregistrement dans une région déterminée du SNC.

Dans ce type d'expérience, l'activité des neurones est habituellement étudiée à l'aide d'enregistrements extracellulaires. Si la structure le permet, il est possible d'effectuer des enregistrements unitaires, qui correspondent à l'enregistrement de l'activité d'un seul neurone. En effet, l'hétérogénéité des structures cérébrales incite à analyser des neurones identifiés individuellement. De plus, un avantage de ce type d'enregistrement est de pouvoir échantillonner l'activité de plusieurs neurones successivement en modifiant la profondeur de la zone d'enregistrement. Pour effectuer ces enregistrements extracellulaires unitaires, le bout de la microélectrode est placé à proximité du neurone, mais à l'extérieur de ce dernier. Les courants extracellulaires générés par les potentiels d'action de la cellule peuvent alors être détectés. Les électrodes extracellulaires permettent également de mesurer des potentiels de champ qui peuvent être évoqués par la stimulation électrique de neurones reliés synaptiquement à la zone enregistrée. Ces potentiels correspondent alors à la sommation extracellulaire des réponses synaptiques évoquées localement. En plus des microélectrodes classiques, il est à noter que des sondes électrochimiques et de microdialyses peuvent également être implantées de façon stéréotaxique. Ces sondes permettent la mesure des concentrations extracellulaires et interstitielles de neurotransmetteurs comme la dopamine, le glutamate et le GABA (Di Chiara 1990; Kawagoe et coll. 1993).

L'avantage de l'étude de l'action des drogues sur le modèle expérimental *in vivo* réside principalement dans le fait que le neurone enregistré est dans son environnement naturel et que les structures étudiées sont intactes. Les réponses

enregistrées correspondent donc à de véritables réponses physiologiques. De plus, certaines questions ne peuvent être répondues que par des études sur l'animal intact. Par exemple, il est nécessaire d'utiliser ce modèle si l'on veut mimer l'effet clinique d'une drogue appliquée de façon systémique au niveau du SNC. Cependant, bien qu'il puisse fournir des informations essentielles sur le mécanisme d'action des drogues sur le cerveau, ce modèle comporte bien sûr certains inconvénients. Premièrement, la présence d'un anesthésiant peut altérer les réponses physiologiques normales à une drogue. La voie d'administration d'une drogue peut également poser des problèmes lors d'études *in vivo*. Si la drogue est administrée de manière systémique, cela peut poser problème parce que ce ne sont pas toutes les drogues qui ont la capacité de traverser la barrière hémato-encéphalique. De plus, les effets indirects des drogues sur la physiologie périphérique et les effets indirects médiés par des actions sur d'autres régions du cerveau peuvent compliquer l'interprétation des résultats. Ces problèmes peuvent être contrés par une administration locale de la drogue. Par contre, que la drogue soit administrée de manière locale ou systémique, il est dans les deux cas difficile d'évaluer la concentration de la drogue qui atteint le tissu. L'utilisation du modèle de l'animal intact limite également l'utilisation de certaines techniques électrophysiologiques tels les enregistrements intracellulaires et la technique du patch-clamp (décrite à la section 1.6.2). Finalement, les enregistrements *in vivo* ne sont pas toujours possibles. En effet, ceux-ci peuvent s'avérer compliqués dans des structures du cerveau difficile d'accès.

Dans le cas où les enregistrements *in vivo* s'avèrent difficiles ou peu informatifs quant au mécanisme d'action d'une drogue, on peut faire appel à des modèles *in vitro*.

### 1.5.2 Tranches de cerveau

Les tranches de cerveau constituent un modèle biologique intermédiaire entre l'expérimentation *in vivo* et la culture primaire (décrite à la section 1.5.3). Leur utilisation pour l'étude de l'action des drogues dans le SNC est très répandue. Depuis les premiers travaux effectués par Yamamoto et McIlwain (1966), montrant que les tranches corticales maintenaient la plupart des propriétés du cortex observées *in vivo* en ce qui concerne l'activité électrique, ce modèle a été utilisé pour étudier la quasi totalité des structures du SNC (Suter et coll. 1999). Pour préparer les tranches, le cerveau, après avoir rapidement été sorti du crâne de l'animal, est immergé dans du salin refroidi et coupé à l'aide d'un microtome. On obtient alors des tranches de cerveau d'environ 100 à 300  $\mu\text{m}$  d'épaisseur qui peuvent être placées dans une chambre d'enregistrement dans laquelle circule du salin chauffé et oxygéné (Gibb et Edwards 1994).

L'utilisation de tranches de cerveau permet de remédier à plusieurs problèmes encourus chez l'animal entier. Premièrement, l'accès des drogues aux structures étudiées est facilité et les effets indirects que pourraient avoir les drogues en

périphérie ou dans d'autres régions du cerveau sont évités. De plus, aucun anesthésiant n'est présent dans le tissu lors de l'expérimentation. Par rapport aux enregistrements électrophysiologiques effectués chez l'animal intact, les tranches de cerveau offrent également de nombreux avantages. Tout d'abord, il est possible de faire des enregistrements électrophysiologiques plus stables étant donné l'absence de pulsations dues à la respiration de l'animal ou au pompage du sang. De plus, les structures étudiées sont plus facilement accessibles et on peut observer le tissu à l'aide d'un microscope, ce qui permet de visualiser les neurones, facilitant ainsi leur identification et l'utilisation des différentes techniques électrophysiologiques. En effet, un des principaux avantages du modèle de tranche par rapport au modèle *in vivo* est sans contredit le fait qu'il facilite les enregistrements intracellulaires et permet d'utiliser la technique du patch-clamp. L'intérêt de l'utilisation de ces techniques est qu'elles permettent de mesurer plus précisément les propriétés électrophysiologiques des cellules enregistrées et également de mesurer des réponses membranaires individuelles évoquées par la libération synaptique de neurotransmetteurs, ce qui est impossible avec les enregistrements extracellulaires. Finalement, bien que l'intégrité du tissu ne soit pas totalement préservée dans ce modèle expérimental, une partie des réseaux neuronaux sont maintenus, les afférences toujours présentes sont fonctionnelles, et les neurones conservent la maturité qui était là au moment de la confection de la tranche.

Bien que le modèle de tranche comporte plusieurs avantages, surtout en ce qui concerne l'étude des réseaux neuronaux, certains inconvénients sont toutefois

associés à son utilisation. Tout d'abord, dans ce modèle comme dans ceux présentés plus loin, le tissu est maintenu en vie en milieu artificiel et non pas en milieu naturel. De plus, malgré le fait que l'accès des drogues est facilité par rapport au modèle *in vivo*, celui-ci demeure tout de même limité. En effet, la concentration de la drogue atteignant les neurones enregistrés est souvent plus faible que celle dans la solution extracellulaire. L'utilisation des tranches de cerveau comporte aussi des inconvénients en ce qui concerne l'étude des mécanismes cellulaires et moléculaires de l'action des drogues. Par exemple, les techniques d'imagerie en fluorescence sont difficiles d'application sur cette préparation. En effet, l'épaisseur des tranches peut entraîner des problèmes de résolution spatiale et de bruit de fond important lors des enregistrements, et seule l'utilisation de très coûteux systèmes de microscopie confocale permet de remédier à ces problèmes. Le modèle de tranche est également peu pratique pour l'utilisation de certaines techniques de biologie moléculaire. À titre d'exemple, les tranches de cerveau sur lesquelles ont été effectuées des transfections transitoires ne peuvent être utilisées que sur une courte période de temps post-transfection, étant donné la courte durée de vie des tranches. Finalement, il peut être difficile d'utiliser les tranches de cerveau pour étudier certains aspects de la transmission synaptique. En effet, ce genre d'étude nécessite souvent d'effectuer des enregistrements pairés qui consistent en l'enregistrement simultané de deux neurones connectés synaptiquement à l'aide de deux microélectrodes d'enregistrement. Comme les probabilités de trouver deux neurones connectés sur une tranche est relativement faible, cette technique, bien que possible à utiliser avec ce genre de préparation (Miles et Poncer 1996), s'avère difficile.

Pour remédier aux problèmes encourus avec la préparation de tranches de cerveau et si l'expérimentateur ne s'intéresse pas à l'étude des réseaux neuronaux, l'utilisation de modèles *in vitro* encore plus simplifiés peut s'avérer utile.

### 1.5.3 Cultures neuronales

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

Le principal inconvénient de la culture cellulaire par rapport aux tranches de cerveau est que dans cette préparation, les réseaux neuronaux présents *in vivo* ne sont pas préservés. En effet, dans les cultures primaires, des réseaux neuronaux sont établis en partie de manière aléatoire. Il s'agit donc d'un modèle qui correspond

moins étroitement à la réalité et qui est inapproprié pour l'étude de la circuiterie neuronale normale. De plus, comme dans le cas des autres modèles *in vitro*, les cellules sont maintenues en vie dans un milieu artificiel. Par contre, si l'on ne s'intéresse pas à l'étude des réseaux neuronaux, la culture de neurones comporte plusieurs avantages par rapport au modèle des tranches. Tout d'abord, lors de l'utilisation de cultures neuronales, la concentration de la drogue qui atteint les récepteurs est connue. En effet, celle-ci correspond directement à la concentration de la drogue dans la solution extracellulaire. Ceci constitue un avantage important pour effectuer des études pharmacologiques. De plus, l'utilisation des techniques d'électrophysiologie s'avère grandement facilitée sur des neurones en culture. Ceci est dû au fait qu'il est beaucoup plus facile de visualiser les neurones individuellement à l'aide d'un microscope lorsque ceux-ci sont en culture. De plus, lorsque les neurones sont disposés en monocouche, la microélectrode n'a pas à traverser de tissu pour atteindre les cellules. Ceci est particulièrement avantageux pour la technique du patch-clamp, qui nécessite que l'embout de la microélectrode de verre soit le plus propre possible. L'utilisation des cultures facilite également les enregistrements pairés, décrits à la section précédente. En effet, la probabilité d'enregistrer simultanément deux neurones connectés en culture est beaucoup plus élevée qu'en tranche. Plusieurs exemples de ce type d'expérience à l'aide de cultures neuronales ont d'ailleurs été rapportés dans la littérature (Miles et Poncer 1996).

L'utilisation de techniques d'imagerie en fluorescence est également facilitée sur le modèle de culture neuronale. En effet, les problèmes associés à l'utilisation des

tranches pour ce type d'expérience ne sont pas présents lorsque les neurones sont isolés et disposés en monocouche. Les neurones en culture possèdent également l'avantage important de permettre l'utilisation de techniques de biologie moléculaire ne pouvant être utilisées sur des modèles plus complexes. À titre d'exemple, il a été mentionné ci-haut que les tranches de cerveau ne constituent pas un bon modèle pour les approches de transfection étant donné leur courte durée de vie. Ce problème est résolu par l'utilisation de cultures de neurones, car celles-ci peuvent être maintenues en vie et être utilisées plusieurs jours post-transfection. Finalement, l'utilisation de cultures neuronales autorise toutes les latitudes expérimentales, allant de la modification de la composition du milieu de culture jusqu'aux cocultures. La culture cellulaire correspond donc à un modèle de choix pour étudier les propriétés fondamentales des synapses ainsi que les mécanismes cellulaires et moléculaires de l'action des drogues sur les neurones du SNC.

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

#### 1.5.4 Synaptosomes

Depuis leur isolation par Hebb et Whittaker (1958), les synaptosomes sont fréquemment utilisés pour étudier la synapse. Les synaptosomes sont obtenus suite à une homogénéisation du tissu nerveux et peuvent être isolés en utilisant certaines méthodes de centrifugation différentielle, par exemple en utilisant un gradient continu de sucrose (Whittaker 1968). Les synaptosomes sont des «sacs» formés de la membrane des terminaisons neuronales contenant des vésicules synaptiques et quelques mitochondries (Gray et Whittaker 1960). Ceux-ci sont plutôt stables, c'est-à-dire qu'ils sont fonctionnels au moins six heures suivant leur préparation, et ont un diamètre d'environ 1  $\mu\text{m}$  (McMahon et Nicholls 1991). Il arrive fréquemment qu'une partie de la membrane postsynaptique reste adhérente en périphérie des synaptosomes suite à leur purification (Gray et Whittaker 1960). La structure ainsi formée, qui possède à la fois les éléments pré- et postsynaptiques, est appelée synaptoneurosome par certains auteurs (Schwartz et coll. 1984; Bernard et coll. 1993).

Le modèle des synaptosomes constitue le modèle *in vitro* le plus simplifié par rapport au tissu nerveux normal, ce qui se trouve à être le principal inconvénient de cette préparation. De plus, étant donné l'hétérogénéité qui caractérise le tissu nerveux, les synaptosomes dérivés de celui-ci se subdivisent en sous-populations constituées des terminaisons nerveuses qui diffèrent en terme de contenu en neurotransmetteurs. Ceci peut poser un problème pour l'étude de la régulation d'un type de neurotransmetteur en particulier, mais ne constitue pas un inconvénient si l'on

désire étudier le mécanisme général de la neurotransmission, qui n'est pas supposé être fondamentalement différent d'un neurotransmetteur à l'autre. En effet, les synaptosomes possèdent les caractéristiques essentielles pour en faire un bon modèle pour l'étude de la synapse. Ceux-ci ont la capacité de transloquer des ions et des métabolites, possèdent un potentiel membranaire normal et libèrent des neurotransmetteurs de manière dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  lorsqu'ils sont dépolarisés (Whittaker 1993). Presque toutes les étapes de la neurotransmission peuvent donc être reproduites et étudiées, à l'aide de différentes approches biochimiques, dans une préparation synaptosomale. La libération des neurotransmetteurs glutamate, aspartate et GABA a d'ailleurs été étudiée en détails à l'aide de ce modèle (Nicholls 1989). De plus, les synaptosomes ont beaucoup été utilisés pour étudier la régulation du  $\text{Ca}^{2+}$  au niveau des terminaisons synaptiques (McMahon et Nicholls 1991). Étant donné que les synaptosomes constituent un bon modèle de la synapse, il est donc possible de faire appel aux préparations synaptosomales pour étudier les drogues qui exercent leurs effets au niveau des terminaisons synaptiques. Par exemple, aidé de la technique de superfusion, les synaptosomes se sont avérés être un modèle de choix pour étudier les drogues et toxines qui exercent leurs effets en bloquant la recapture de neurotransmetteurs de manière sélective (Raiteri et Raiteri 2000).

En résumé, les synaptosomes constituent un modèle *in vitro* très utile pour étudier différents aspects de la transmission synaptique ainsi que l'action des drogues au niveau des terminaisons synaptiques. Par contre, ce modèle simplifié ne convient pas à l'étude du mécanisme d'action de drogues agissant au niveau postsynaptique ou

sur un phénotype de neurone en particulier. Ce modèle ne permet également pas de mesurer la libération de neurotransmetteurs en temps réel, ce qui est un inconvénient majeur dans le cadre d'études visant à analyser de façon détaillée les mécanismes de régulation de la synapse.

## **1.6. TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES**

Comme il a été mentionné précédemment, la culture cellulaire est un modèle de choix pour étudier à la fois la physiologie et la pharmacologie des neurones. Nous avons donc choisi ce modèle pour déterminer le mécanisme par lequel l'activation des récepteurs  $\mu$ -opioïdes inhibe les neurones GABAergiques de l'ATV. Les cultures utilisées sont composées de neurones de l'ATV de rat néo-nataux en culture primaire. À l'aide de ces cultures, nous avons pu étudier le mécanisme d'action d'un agoniste  $\mu$ -opioïde, le DAMGO, en utilisant la technique du patch-clamp.

### **1.6.1 Culture cellulaire :**

Les expériences ont été effectuées à l'aide d'une préparation de neurones de l'ATV de rat néo-nataux en culture primaire. Deux types de cultures cellulaires ont été utilisés : les cultures dites «standard» et les cultures dites «micro-goutte». Les cultures primaires sont préparées suivant un protocole inspiré de ceux de Cardozo

(Cardozo 1993) et Sulzer et coll. (Sulzer et coll. 1998). Pour les deux types de cultures préparés (standard et micro-goutte), les neurones dissociés de l'ATV sont étalés sur des lamelles de verres recouvertes de substrat et sur lesquelles on a préalablement étalé des astrocytes provenant du mésencéphale. Les astrocytes, disposés en monocouche sur les lamelles, facilitent l'adhérence des neurones ainsi que leur croissance.

#### Cultures standard :

On retrouve dans les cultures standard les différents types cellulaires présent au niveau de l'ATV, soit des cellules gliales (astrocytes) ainsi que des neurones dopaminergiques et GABAergiques. Dans ce type de cultures sont présentes les conditions nécessaires pour l'établissement de multiples connexions synaptiques entre les neurones (figure 3).

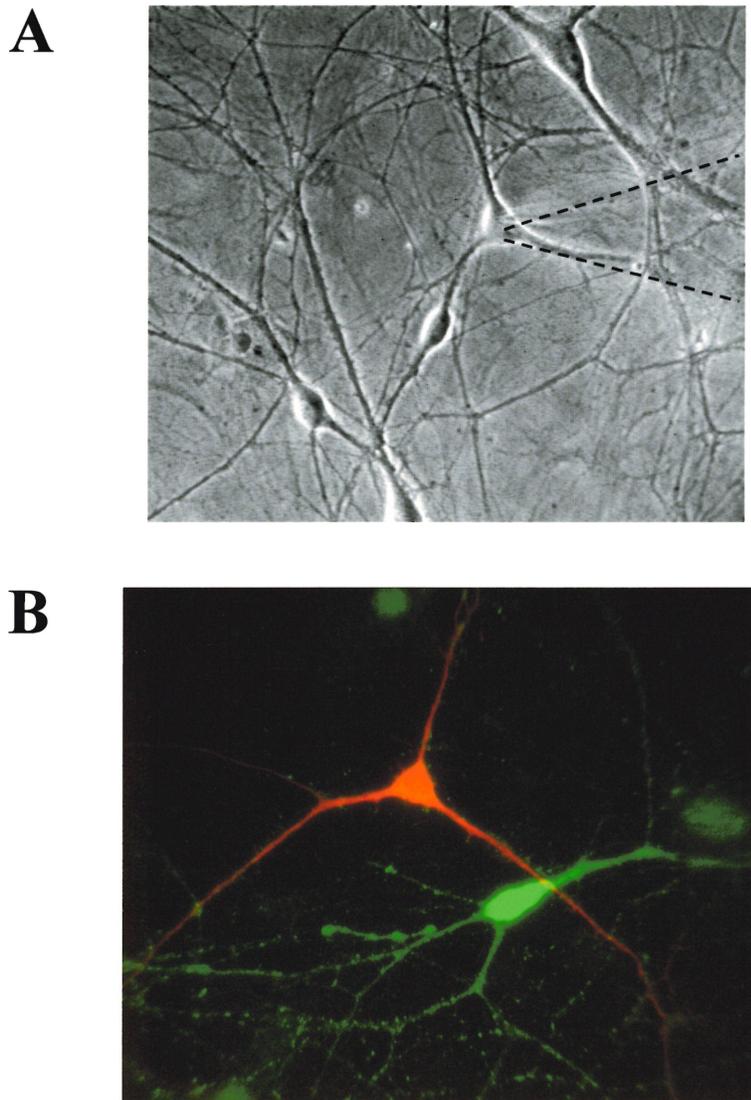
#### Cultures micro-goutte :

Ce second type de culture implique l'utilisation de micro-gouttes de substrat sur lesquelles les astrocytes et les neurones dopaminergiques ou GABAergiques peuvent pousser, et ce, parfois de manière individuelle. Le cas échéant, ces derniers peuvent établir des synapses sur eux-mêmes. On désigne alors ces synapses «autapses» (figure 4). Il est possible de distinguer les neurones dopaminergiques et

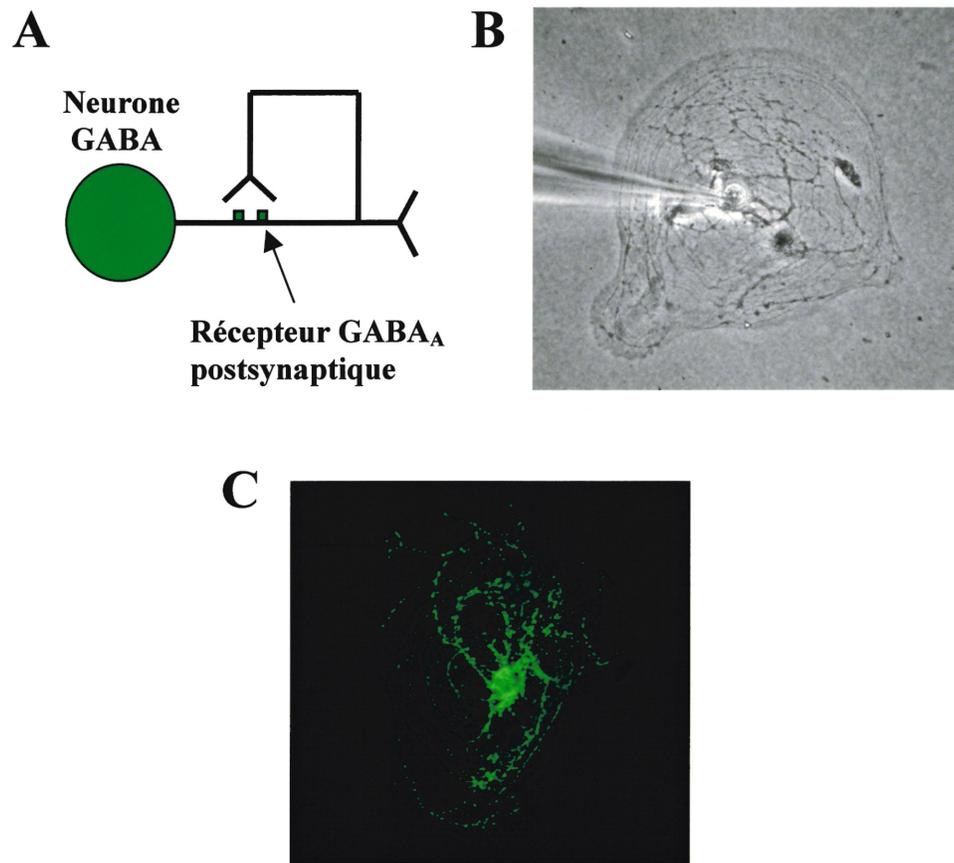
GABAergiques par leur caractéristiques électrophysiologiques ou à l'aide d'un marquage immunofluorescent. En effet, les neurones dopaminergiques peuvent être marqués à l'aide d'anticorps dirigés contre la tyrosine hydroxylase, qui est l'enzyme de synthèse de la dopamine. Les neurones GABAergiques, quant à eux, peuvent être identifiés en utilisant des anticorps contre le GABA ou la GAD.

### 1.6.2 Électrophysiologie

Des expériences d'électrophysiologie en voltage imposé ont été effectuées à l'aide de la technique du patch-clamp. Lors d'expériences en voltage imposé, on enregistre les courants qui passe à travers la membrane d'une cellule pendant que le potentiel de membrane ( $V_m$ ) est maintenu à une valeur fixe par l'expérimentateur. Le potentiel de membrane doit donc être constamment ajusté pour correspondre au potentiel choisi par l'expérimentateur ( $V_{cmd}$ ). Pour ce faire,  $V_m$  est continuellement mesuré et comparé à  $V_{cmd}$ . Un courant est alors injecté à travers la membrane pour maintenir  $V_m$  au potentiel  $V_{cmd}$  désiré. C'est ce courant, amplifié et filtré par l'amplificateur de patch-clamp, qui a été mesuré dans les expériences décrites dans ce mémoire.

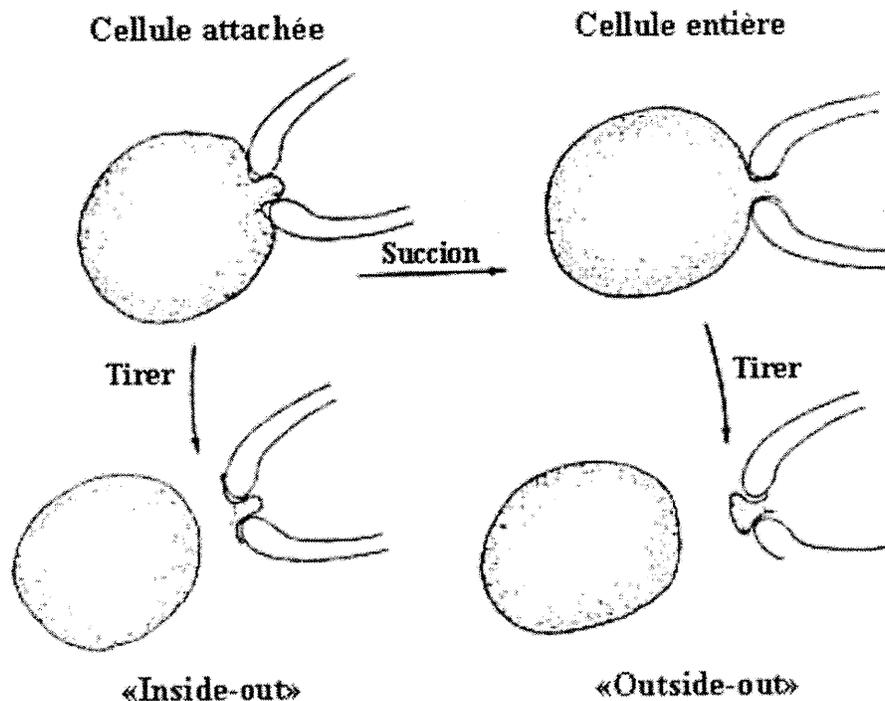


**Figure 3 :** Neurons de l'ATV en culture standard. (A) Photo d'une culture standard en contraste de phase. L'ombre à droite de la photo indique la présence d'une pipette de patch-clamp (lignes pointillées). (B) Les deux principaux types de neurones de l'ATV. Le phénotype des neurones peut être identifié à l'aide d'anticorps contre la tyrosine hydroxylase, qui est l'enzyme de synthèse de la dopamine (neurones dopaminergiques, en rouge), ou contre le GABA (neurones GABAergiques, en vert).



**Figure 4 :** Neurones de l'ATV en culture micro-goutte. (A) Schéma d'un neurone GABAergique établissant des autapses. (B) Photo en contraste de phase d'un neurone individuel sur une micro-goutte de substrat (on peut observer une pipette de patch sur la gauche). (C) Image en fluorescence d'un neurone en culture micro-goutte, dont le phénotype GABAergique a été confirmé à l'aide d'un anticorps contre la GAD (enzyme de synthèse du GABA).

La technique du patch-clamp permet de faire des expériences de voltage imposé en utilisant une seule microélectrode, aussi appelée pipette de patch, qui peut simultanément mesurer  $V_m$  et injecter le courant nécessaire au maintien de  $V_{cmd}$ . Cette technique a été développée par Neher et Sakmann (1976), à qui elle a valu le prix Nobel de Médecine de 1991, et permet d'enregistrer des courants à partir d'une toute petite partie de la surface de la membrane (patch) en appuyant une pipette de verre contre la cellule vivante. Neher et Sakmann ont montré qu'il était possible d'établir un contact électrique extrêmement étroit entre une pipette de verre polie et la membrane d'une cellule pour former un attachement (seal) possédant une très grande résistance (de l'ordre du gigaohm) et une stabilité mécanique importante (Hamill et coll. 1981). Le contact entre la pipette et la membrane est alors très serré et l'intérieur de la pipette est isolé du milieu extracellulaire. Ceci correspond à la configuration «cellule attachée». A partir de celle-ci, il est ensuite possible d'obtenir trois autres configurations : cellule entière, *inside-out* et *outside-out* (figure 5). Ces deux dernières correspondent à des configurations de patch excisé. Les configurations cellule attachée et de patch excisé permettent l'enregistrement du courant passant dans un seul canal présent dans le patch de membrane, tandis que la configuration cellule entière permet d'enregistrer la somme des courants passant à travers tout les canaux présents dans la membrane cellulaire.



*Modifié de Hille 1992 (voir référence)*

**Figure 5 :** Quatres configurations possibles pour les enregistrements de patch-clamp.

Dans cette étude, nous avons effectué des enregistrements en voltage imposé à l'aide de la technique du patch-clamp en mode cellule entière. Cette technique a permis l'enregistrement de courants postsynaptiques inhibiteurs (CPSI) GABAergiques. Ces courants sont produits lorsque des récepteurs GABA<sub>A</sub> sur la cellule postsynaptique (cellule «patchée») sont activés suite à la libération de GABA par des neurones GABAergiques présynaptiques. Les récepteurs GABA<sub>A</sub> sont des récepteurs canaux, c'est-à-dire qu'ils s'ouvrent suite à la fixation d'un ligand. Dans les cas du récepteur GABA<sub>A</sub>, celui-ci s'ouvre suite à la liaison du GABA pour laisser

passer des ions  $\text{Cl}^-$ , ce qui génère le CPSI. Dans le SNC, le récepteur  $\text{GABA}_A$  assure donc une transmission synaptique inhibitrice rapide en convertissant la fixation du GABA en une augmentation rapide et transitoire de la perméabilité membranaire aux ions  $\text{Cl}^-$ . En présence de milieux extracellulaires et intracellulaires physiologiques, les courants  $\text{Cl}^-$  générés par le récepteur  $\text{GABA}_A$  ont un potentiel d'inversion se situant autour de  $-60$  mV (Sakmann et coll. 1983). Cela signifie que le courant  $\text{Cl}^-$  est entrant (ions  $\text{Cl}^-$  sortent de la cellule) à des potentiels plus hyperpolarisés que  $-60$  mV, il est nul ou très faible autour de  $-60$  mV, et il est sortant (ions  $\text{Cl}^-$  entrent dans la cellule) à des potentiels plus dépolarisés que  $-60$  mV. Cette propriété du courant  $\text{Cl}^-$  nous a donc permis de distinguer les CPSI des CPSE, qui correspondent à des courants postsynaptiques excitateurs glutamatergiques générés suite à l'activation de récepteurs non-NMDA par le glutamate et dont le potentiel d'inversion se situe autour de  $0$  mV (Ascher et Nowak 1988). En effet, il a été montré que les neurones dopaminergiques de l'ATV en culture ont la capacité de co-libérer du glutamate (Sulzer et coll. 1998; Congar et Trudeau 1999), ce qui explique la présence de CPSE lors des enregistrements électrophysiologiques effectués à l'aide du présent modèle. De plus, pour s'assurer que les événements observés étaient bien des CPSI, les expériences ont été effectuées en présence de CNQX, qui est un antagoniste des récepteurs glutamatergiques non-NMDA et empêche donc la formation de CPSE. Trois types de CPSI ont été enregistrés au cours de cette étude, soit des CPSI spontanés, des CPSI miniatures et des CPSI autaptiques.

Les CPSI spontanés ont été enregistrés à l'aide des cultures standard. Ces événements reflètent la décharge spontanée des neurones GABAergiques en culture. En effet, lorsqu'une cellule GABAergique se dépolarise spontanément au delà d'un certain seuil, il y a génération d'un potentiel d'action dans la cellule menant à la libération de GABA aux terminaisons synaptiques de ce neurone. Cette libération de GABA va induire l'apparition d'un CPSI spontané au niveau de la cellule postsynaptique. La plupart des neurones dans une culture standard reçoivent de nombreux CPSI spontanés. La modulation de ces événements par une drogue permet donc de caractériser l'effet global de celle-ci sur l'excitabilité des neurones GABAergiques et l'exocytose de GABA.

Les cultures standard nous ont également permis d'enregistrer des CPSI miniatures. Contrairement à la libération évoquée par un potentiel d'action, les courants miniatures (CPSI et CPSE miniatures) ne sont pas générés par une dépolarisation de la terminaison. En effet, ces courants de très faible amplitude, originellement décrits par Katz (1969), sont observés en présence de tétrodothine (TTX), une toxine qui bloque spécifiquement les canaux  $\text{Na}^+$  dépendants du voltage et empêche ainsi la génération et la propagation des potentiels d'action. Les courants miniatures sont donc des événements qui sont déclenchés suite à la libération spontanée de vésicules individuelles de neurotransmetteurs, aussi appelées quanta. Si l'on considère que le contenu en neurotransmetteurs d'une vésicule synaptique est constant, un changement de la fréquence des événements miniatures correspondra donc à une modification de la quantité de vésicules libérées, et reflétera un

changement au niveau présynaptique. Un changement de l'amplitude des courants miniatures correspondra par contre à une modification du nombre de récepteurs ou des propriétés des récepteurs, et reflètera donc un changement au niveau postsynaptique. Cependant, une telle interprétation des données de fréquence et d'amplitude des courants miniatures n'est pas toujours vraie, dû à l'existence des synapses silencieuses. Les synapses silencieuses sont définies comme étant des synapses qui apparaissent normales morphologiquement, mais qui ne fonctionnent pas soit parce que les neurotransmetteurs ne sont pas libérés suite à l'arrivée du potentiel d'action dans la terminaison synaptique, ou parce que la membrane postsynaptique ne répond pas suite à la libération de neurotransmetteurs (Malenka et Nicoll 1997). Ce type de synapse est impliqué par exemple dans le phénomène de la potentialisation à long terme (LTP) dans l'hippocampe. En effet, dans la LTP des fibres moussues, qui correspondent aux axones des cellules granulaires du gyrus dentelé se terminant sur les dendrites des cellules pyramidales de la région CA3, le mécanisme de l'induction de la LTP implique la conversion de sites de libération silencieux en sites fonctionnels (Tong et coll. 1996). Dans ce cas, l'induction de la LTP est accompagnée d'une augmentation de la fréquence des CPSE miniatures, dû à une modification présynaptique. Par contre, il a été montré que dans la région CA1 du gyrus dentelé, la forme de LTP dépendante du récepteur NMDA implique un processus qui convertit des synapses silencieuses postsynaptiques, c'est-à-dire ne possédant pas de récepteurs glutamatergiques AMPA, en synapses possédant des récepteurs AMPA fonctionnels (Isaac et coll. 1995; Liao et coll. 1995). Ceci suggère que l'augmentation des CPSE miniatures observé lors de ce type de LTP (Malgaroli

et Tsien 1992) ne serait pas due à une modification présynaptique, comme le suggère une interprétation simple des données, mais plutôt à une modification postsynaptique. Cependant, dans le cas où l'on étudie un mécanisme menant à une inhibition de la libération d'un neurotransmetteur, les modèles actuels suggèrent que l'existence de synapses silencieuses ne pose pas un tel problème dans l'interprétation des données. De plus, pour l'instant, aucune démonstration de l'existence de synapses silencieuses n'a été publiée dans le cas des synapses GABAergiques.

Les cultures micro-goutte nous ont également permis d'enregistrer des CPSI évoqués par des potentiels d'action individuels, que l'on appelle CPSI autaptiques. Pour obtenir ces courants, la cellule GABAergique isolée est stimulée électriquement à l'aide de la pipette de patch, ce qui génère un potentiel d'action. Celui-ci se propage le long de l'axone et entraîne ainsi la libération de GABA au niveau des terminaisons synaptiques. Cette libération quasi simultanée de plusieurs vésicules de GABA stimule les récepteurs GABA<sub>A</sub> présents sur la même cellule, ce qui entraîne l'apparition d'un CPSI. Il est à noter que dans les cultures micro-goutte, la cellule isolée constitue à la fois la cellule pré- et postsynaptique. Ceci constitue un avantage expérimental majeur puisqu'en culture standard il serait nécessaire d'enregistrer deux neurones connectés pour obtenir le même résultat, ce qui serait beaucoup plus difficile. Le modèle de culture micro-goutte convient donc bien à l'étude de la libération de neurotransmetteurs.

## 1.7 PROBLÉMATIQUE

Il a été montré que l'activation des récepteurs  $\mu$ -opioïdes inhibe l'activité des neurones GABAergiques intrinsèques à l'ATV suite à l'activation d'une conductance  $K^+$  somatique (Johnson et North 1992a). Par contre, la possibilité que des récepteurs  $\mu$ -opioïdes situés au niveau des terminaisons synaptiques des neurones GABAergiques de l'ATV soient responsables d'une partie de l'effet des agonistes  $\mu$ -opioïdes n'a pas été explorée.

L'objectif principal de la présente étude était donc de déterminer si un des mécanismes d'action des opioïdes sur les neurones GABAergiques de l'ATV implique une inhibition de l'activité des terminaisons synaptiques. Considérant la démonstration de l'apposition directe entre les terminaisons immunoréactives pour le GABA et celles immunoréactives pour l'enképhaline dans l'ATV (Sesack et Pickel 1995), notre hypothèse principale était qu'effectivement, un agoniste  $\mu$ -opioïde devrait être en mesure d'inhiber la libération de GABA par une action sur la terminaison. Notre deuxième objectif était de déterminer le mécanisme précis responsable de cette régulation présynaptique par les récepteurs  $\mu$ -opioïdes. À cette fin, nous avons effectué des expériences à l'aide de la technique du patch-clamp en utilisant un modèle de neurones de l'ATV de rats néo-nataux en culture primaire.

**MANUSCRIT**  
**(Soumis au *Journal of Neurophysiology*)**

## ACCORD DES COAUTEURS

### Identification de l'étudiant et du programme :

Annie Bergevin  
M.Sc. Pharmacologie  
Département de pharmacologie, Faculté de médecine, Université de Montréal

### Article :

Titre : *Presynaptic  $\mu$ -opioid Receptors Regulate a Late Step of the Secretory Process in Rat Ventral Tegmental Area GABAergic Neurons.*

Auteurs : Annie Bergevin, Daphné Girardot, Louis-Éric Trudeau.

Cet article a été soumis pour publication dans le *Journal of Neurophysiology* au mois de juin 2001.

### Déclaration des coauteurs :

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Annie Bergevin inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre «Régulation présynaptique des interneurons GABAergiques par le récepteur  $\mu$ -opioïde dans l'aire tegmentaire ventrale».

Daphné Girardot		28/01/2002
Coauteur	Signature	Date
Louis-Éric Trudeau		28/01/2002
Coauteur	Signature	Date

*Presynaptic  $\mu$ -opioid Receptors Regulate a Late Step of the Secretory Process in  
Rat Ventral Tegmental Area GABAergic Neurons*

Annie Bergevin, Daphné Girardot and Louis-Eric Trudeau

Département de Pharmacologie

Centre de Recherche en Sciences Neurologiques

Centre de Recherche Fernand Seguin

Université de Montréal

Montréal, Québec, Canada

Send correspondence to:

Louis-Eric Trudeau, Ph.D.  
Département de pharmacologie  
Université de Montréal  
C.P. 6128, Succursale Centre-Ville  
Montréal, Québec, Canada  
H3C 3J7  
Tel: 514-343-5692  
Fax: 514-343-2291  
Email: [louis-eric.trudeau@umontreal.ca](mailto:louis-eric.trudeau@umontreal.ca)

Abbreviated title:  $\mu$ -opioid receptors regulate the secretory process

Words in abstract: 244

Number of figures: 8

**ABSTRACT**

GABA-containing interneurons of the ventral tegmental area (VTA) regulate the activity of dopaminergic neurons. These GABAergic interneurons are known to be innervated by synaptic terminals containing enkephalin, an endogenous ligand of  $\mu$ -opioid receptors. Exogenously applied  $\mu$ -opioid receptor agonists inhibit the activity of VTA GABAergic neurons but the mechanism whereby  $\mu$ -opioid receptors regulate synaptic GABA release from these neurons has not been directly identified. Using cultured VTA neurons we have confirmed that  $\mu$ -opioid receptor agonists inhibit synaptic GABA release. GABA-mediated IPSCs evoked by single action potentials were reversibly inhibited by DAMGO, a selective  $\mu$ -opioid receptor agonist. This was accompanied by a decrease in the frequency but not the amplitude of spontaneous miniature IPSCs (mIPSCs) suggesting that  $\mu$ -opioid receptors localized on GABAergic nerve terminals directly inhibit quantal GABA release. Miniature IPSCs evoked by the  $\text{Ca}^{2+}$  ionophore ionomycin were also inhibited by DAMGO suggesting that GABA release was inhibited by a process downstream of  $\text{Ca}^{2+}$  influx through voltage-dependent channels. This conclusion was strengthened by the finding that mIPSCs evoked by the  $\text{Ca}^{2+}$ -independent secretagogue ruthenium red (RR) were also inhibited by DAMGO. The inhibition of action potential evoked IPSCs and of spontaneous and ionomycin-evoked mIPSCs by DAMGO was prevented by the voltage-dependent  $\text{K}^+$  channel blocker 4-aminopyridine (4-AP). Because ionomycin stimulates exocytosis through a mechanism insensitive to membrane polarization, these results suggest that  $\mu$ -opioid receptor activation may directly influence the

efficacy of the secretory process in GABAergic nerve terminals by a mechanism that is influenced by voltage-dependent  $K^+$  channels.

## **INTRODUCTION**

The ventral tegmental area (VTA), a part of the mesolimbic dopamine system, is known for its implication in the reinforcing properties of many drugs of abuse, including opioids (Wise 1996; Koob and Le Moal 1997). Experiments have shown that rats will learn to lever press for microinjections of opioids directly into the VTA (Bozarth and Wise 1981; Devine and Wise 1994), and VTA microinjections of opioids will produce conditioned place preference (Phillips and LePiane 1980; Phillips et al. 1983). It has also been demonstrated that microinjections of opioids into the VTA produce an increase in spontaneous locomotor activity in rats (Broekkamp et al. 1979; Kelley et al. 1980). Evidence suggests that these opioid-induced rewarding and motor-stimulant effects are mediated by an increased activity of VTA dopaminergic (DAergic) neurons. For example, morphine increases the firing rate of DAergic neurons when administered directly into the VTA (Gysling and Wang 1983). Furthermore, microinjections of enkephalin analogs in the VTA increase dopamine release in the mesolimbic dopamine terminal fields (Kalivas and Duffy 1990; Devine et al. 1993).

The activity of VTA DAergic neurons is known to be regulated by the activity of GABAergic neurons which provide inhibitory synaptic input to the DAergic cells (Johnson and North 1992b; Steffensen et al. 1998). Some of this input arises from

GABAergic neurons intrinsic to the VTA (Johnson and North 1992b). Electrophysiological studies have shown that  $\mu$ -opioid agonists inhibit the firing of GABAergic neurons in the VTA slice preparation (Johnson and North 1992a). Furthermore, the extracellular concentration of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) is reduced after microdialysis of morphine into the VTA of conscious rats (Klitenick et al. 1992). Based upon these findings, it has been suggested that the effect of opioids on VTA GABAergic neurons results in a disinhibition of DAergic neurons, and thus, produces an increase in mesolimbic DAergic transmission (Gysling and Wang 1983; Johnson and North 1992a).

The mechanism by which opioids inhibit VTA GABAergic neurons is not well defined. Intracellular recordings of VTA cells have shown that local application of opioids hyperpolarizes GABAergic neurons by increasing a somatic  $K^+$  conductance (Johnson and North 1992a). However, the disinhibitory action of opioids could also occur via opioid receptors located on GABAergic terminals in the VTA. Indeed, evidence suggests the presence of  $\mu$ -opioid receptors on VTA GABAergic neurons (Dilts and Kalivas 1989), and the direct apposition of GABA- and enkephalin-immunolabeled terminals in the VTA is consistent with a presynaptic location of this receptor (Sesack and Pickel 1995). Furthermore, presynaptic inhibition of neurotransmitter release by opioids has been shown in many brain regions. For example, presynaptic modulation of GABA release by  $\mu$ -opioid receptors has been observed in the hippocampus (Cohen et al. 1992; Rekling 1993; Capogna et al. 1993; Lupica 1995), the globus pallidus (GP) (Stanford and Cooper 1999) and the

periaqueductal gray (PAG) (Vaughan and Christie 1997a; Vaughan et al. 1997b). In the latter structure, the inhibition of GABA release from GABAergic interneurons by  $\mu$ -opioid agonists seems to be mediated by the activation of a 4-AP-sensitive voltage-dependant  $K^+$  channel located at the presynaptic terminal (Vaughan et al. 1997b). In the hippocampus, a mechanism implicating a direct modulation of the secretory machinery has been suggested for the  $\mu$ -opioid receptor mediated presynaptic inhibition of GABA release from GABAergic interneurons of the CA3 area (Capogna et al. 1993, 1996).

The aim of the present study was therefore to test the hypothesis that the inhibition of GABAergic neurons of the VTA following activation of  $\mu$ -opioid receptors involves a presynaptic modulation of GABA release and to investigate the mechanism responsible for this presynaptic inhibition.

## **MATERIALS AND METHODS**

### *Cell culture*

Primary cultures of rat VTA neurons were prepared according to recently described protocols (Michel and Trudeau 2000; Bourque and Trudeau 2000) derived from Cardozo (Cardozo 1993) and Sulzer et al. (Sulzer et al. 1998). For the two types of cultures that were prepared (standard and micro-dot cultures), dissociated VTA neurons were plated on pre-established midbrain astrocytic monolayers on pre-coated glass coverslips. To prepare astrocyte cultures, neonatal (P0 to P3) Sprague-Dawley rats were cryoanesthetized. The brain was quickly removed from the skull and placed

in ice-cold dissociation solution. A 1 mm<sup>2</sup> block of midbrain tissue was rapidly isolated from a 1 mm slice cut at the level of the midbrain flexure. The tissue was then digested with papain for 60 min at 37°C before being gently triturated using Pasteur pipettes of decreasing diameter until a single-cell suspension was obtained. Cells were collected by centrifugation, counted and diluted at a concentration of 100 000 to 150 000 living cells per milliliter. The cells were grown in culture flasks for 5 to 10 days. After the first 48 hours, they were vigorously washed with cold medium to dislodge most neurons, leaving only tightly adherent astrocytes. After reaching confluence, astrocytes were gently trypsinized, washed, collected, counted and plated at a concentration of 60 000 to 80 000 (micro-dot cultures) or 120 000 (standard cultures) living cells per milliliter on collagen/poly-L-lysine-coated coverslips (standard cultures) or on 0.15% agarose-covered coverslips sprayed with collagen/poly-D-Lysine (micro-dot cultures). The later approach permitted the formation of small groups of isolated cells. Twenty-four hours after they were plated, astrocytes covered most of the collagen/poly-lysine surface and further division was inhibited with 5-Fluoro-2-Deoxyuridine (FUdR). To prepare neurons, neonatal (P0 to P3) Sprague-Dawley rats were cryoanesthetized and their VTA was rapidly isolated using a custom tissue micro-punch from a 1 mm slice cut at the level of the midbrain flexure. As for the astrocyte preparation, the tissue was digested with papain for 30 min at 37°C, before being gently triturated. The dissociated cells were then collected by centrifugation, counted and diluted at a density titrated to optimize neuronal viability in standard culture conditions (240 000 living cells per milliliter) and to maximize the number of single neurons in micro-dot cultures (100 000 living cells

per milliliter) before being plated on coverslips with a pre-established midbrain astrocyte monolayer. Further astrocytic division was inhibited by a second addition of FUDR 24 hours after neurons were plated. Kynurenate (0.5 mM) was added to the culture medium 7 days after neurons were plated in order to block excitotoxicity. Cell cultures were incubated at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere and maintained in Basal Medium Eagle with Earl's Salts (Gibco, Burlington, Ontario, Canada) supplemented with 5% Fetal Calf Serum (Gibco) and Mito+ serum additive (VWR Canlab, Montréal, Québec, Canada). Experiments were performed on neurons between 10 and 30 days after plating.

### *Electrophysiology*

Whole-cell voltage clamp recordings were performed using a WARNER PC-505 patch-clamp amplifier (Warner Instruments Corp, Hamden, CT, USA). Signals were filtered at 1 kHz, digitized at 5 kHz and recorded and analyzed using Pclamp7 software (Axon Instruments, Foster City, CA, USA). Except for the experiments in figure 4B, which were performed at 30 °C, all recordings were performed at room temperature (~21 °C). Patch pipettes were prepared with borosilicate glass and had a resistance of ~5 MΩ. Cells were perfused with an extracellular solution containing (in mM): NaCl 140, KCl 5, MgCl<sub>2</sub> 2, CaCl<sub>2</sub> 2, HEPES 10, glucose 10, sucrose 6, at a pH of 7.35. Tetrodotoxin (TTX; 0.5 μM) and cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX; 10 μM) were added to the extracellular bathing solution while recording spontaneous miniature inhibitory postsynaptic currents (mIPSCs), in order to block respectively fast sodium spikes and glutamatergic non-NMDA excitatory postsynaptic

currents. CNQX was also added to the bathing solution while recording spontaneous inhibitory postsynaptic currents (sIPSCs). Spontaneous IPSCs and mIPSCs were recorded using a cesium gluconate intrapipette solution containing (in mM): Cs gluconate 117.5, NaCl 10, MgCl<sub>2</sub> 4, EGTA 5, ATP (Mg salt) 2, GTP (Tris salt) 0.2, HEPES 15 (pH 7.35), or using a cesium methanesulfate intrapipette solution containing (in mM): Cs methane sulfonate 120, CsCl 20, NaCl 5, EGTA 1, ATP (Mg salt) 4, GTP (Tris salt) 0.5, HEPES 10 (pH 7.35). To evoke autaptic inhibitory postsynaptic currents (autaptic IPSCs), isolated neurons were stimulated every 10 s with a brief (1 ms) voltage command pulse to 20 mV from a holding potential of -50 to -40 mV, and evoked postsynaptic currents were recorded. Evoked autaptic IPSCs were recorded with a K<sup>+</sup> methanesulfate intrapipette solution containing (in mM): KMeSO<sub>4</sub> 140, NaCl 10, EGTA 0.1, ATP (Mg salt) 4, GTP (Tris salt) 0.5, HEPES 10 (pH 7.35). Spontaneous IPSCs and mIPSCs were analyzed with Mini Analysis Software by Synaptosoft Inc. (Leonia, NJ, USA). Data are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM). Unless otherwise indicated, data were analyzed for statistical significance using the paired Student's t-test, with a probability value of p<0.05 used as the criterion. The Kolmogorov-Smirnov test was used to compare cumulative probability distributions. Considering the high sensitivity of this test, a probability value of p<0.01 was used as a criterion in order to be more stringent.

#### *Immunocytochemistry*

Cells were fixed with 4% paraformaldehyde in phosphate buffer, pH 7.4, for 30 min at room temperature and then rinsed several times. After a 20 minute long permeabilization with 0.1% Triton X100 and blocking with bovine serum albumin

and goat serum, cells were incubated overnight at 4°C with primary antibodies against glutamic acid decarboxylase (GAD). The cells were then rinsed several times and incubated for one hour with an Alexa-488 conjugated secondary antibody. Coverslips were mounted with Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) and observed by epifluorescence microscopy. Images of immunofluorescent labeling were acquired using a Hamamatsu Orca-II digital cooled CCD camera and an Inovision workstation using ISee software (Inovision Corporation, Raleigh, NC, USA).

### *Drugs*

All chemicals and primary antibodies were obtained from Sigma Chemicals Co. (St-Louis, MO, USA) except for TTX which was obtained from Alomone Laboratories (Jerusalem, Israel). The secondary antibodies were obtained from Molecular Probes Inc. (Eugene, OR, U.S.A.).

## **RESULTS**

### *DAMGO inhibits the frequency and amplitude of spontaneous IPSCs*

The effect of the selective  $\mu$ -opioid receptor agonist DAMGO ([D-Ala<sup>2</sup>,N-Me-Phe<sup>4</sup>,Gly<sup>5</sup>-ol]-enkephalin; 1  $\mu$ M) on the frequency and amplitude of spontaneous IPSCs (sIPSCs) was first investigated (Fig. 1A,B). Recordings were performed from randomly selected neurons in the presence of CNQX (10  $\mu$ M) using standard VTA cultures. DAMGO significantly reduced the frequency of spontaneous IPSCs by 57.7 $\pm$ 9.9% (n=11, p<0.005) and this effect was reversible upon washing (Fig. 1B). Percent inhibition was calculated by comparing the frequency of events in the

presence of DAMGO to the mean value of the frequency during the baseline period and after washout of DAMGO. All further effects were calculated in the same way to account for any gradual change in the baseline event frequency. In addition to reducing the frequency of sIPSCs, DAMGO reduced their amplitude by  $38.9 \pm 12.1\%$  ( $n=11$ ,  $p<0.05$ ) (Fig. 1B). The  $\mu$ -opioid agonist met-enkephalin ( $10 \mu\text{M}$ ; Fig. 1C) mimicked the effect of DAMGO by reducing sIPSC frequency by  $43.1 \pm 7.7\%$  ( $n=10$ ,  $p<0.005$ ) and the amplitude by  $25.5 \pm 6.2\%$  ( $n=10$ ,  $p<0.005$ ).

In the presence of the non-selective opioid receptor antagonist naloxone ( $1 \mu\text{M}$ ; Fig. 1C), DAMGO caused no significant change of sIPSC frequency or amplitude. In the presence of naloxone, the sIPSC frequency following application of DAMGO was at  $100.0 \pm 7.5\%$  of the control value ( $n=13$ ;  $p>0.05$ ), while the sIPSC amplitude was at  $102.8 \pm 5.9\%$  of the control value ( $n=13$ ;  $p>0.05$ ). The effect of DAMGO was also blocked by the selective  $\mu$ -opioid receptor antagonist CTOP (D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr-NH<sub>2</sub>) ( $1 \mu\text{M}$ ; Fig. 1C). The inhibition of sIPSC frequency by DAMGO was of  $16.1 \pm 7.8\%$  in the presence of CTOP ( $n=5$ ,  $p>0.05$ ) as opposed to  $31.2 \pm 7.5\%$  when DAMGO was applied alone in the same cells ( $n=5$ ,  $p<0.05$ ; data not shown). Moreover, the decrease of sIPSC amplitude by DAMGO was of  $13.3 \pm 4.5\%$  in the presence of CTOP ( $n=5$ ,  $p>0.05$ ) as opposed to a decrease of  $41.0 \pm 5.3\%$  in its absence ( $n=5$ ;  $p<0.005$ ; data not shown). Overall, these results confirm that in cultured VTA GABAergic neurons, DAMGO inhibits GABA release by acting on *bona fide*  $\mu$ -opioid receptors.

### *DAMGO inhibits GABAergic autaptic currents*

The effect of DAMGO (1  $\mu\text{M}$ ) on synaptic transmission from VTA GABAergic neurons was examined more directly by recording GABAergic synaptic currents evoked by single action potentials. Experiments were performed on single VTA GABAergic neurons in micro-dot cultures (Fig. 2A). Depolarizing voltage steps evoked a fast inward sodium action current followed by a slow outward GABA<sub>A</sub> receptor-mediated IPSC (autaptic IPSC) (Fig. 2C). In most experiments, the GABAergic nature of the evoked autaptic current was confirmed by its sensitivity to SR 95531 (5  $\mu\text{M}$ ), a GABA<sub>A</sub> receptor antagonist (not shown). The identity of the neurons as *bona fide* GABAergic neurons was also confirmed in some experiments by post-recording immunofluorescent labeling for glutamic acid decarboxylase (GAD) which strongly labeled the abundant synaptic terminals of isolated GABAergic neurons (Fig. 2B). DAMGO inhibited autaptic IPSCs in 18 of the 45 GABAergic cells tested, thus demonstrating some heterogeneity in cell properties. Sensitivity to DAMGO was essentially all or none. Cells were considered sensitive to DAMGO if the evoked IPSC was inhibited by at least 15% relative to the control period. In these 18 cells, DAMGO reduced the amplitude of autaptic IPSCs by  $49.8 \pm 4.4\%$  (Fig. 2C,D). This effect was reversible upon washout of DAMGO (Fig. 2C,D).

### *DAMGO inhibits the frequency of mIPSCs*

The effect of DAMGO (1  $\mu\text{M}$ ) on spontaneous GABAergic miniature inhibitory post-synaptic currents (mIPSCs) was examined in order to determine whether DAMGO inhibited synaptic GABA release through a pre- or postsynaptic

mechanism. Recordings were performed on standard VTA cultures in the presence of CNQX (10  $\mu$ M) to block glutamate-mediated synaptic currents and TTX (0.5  $\mu$ M) to isolate impulse-independent GABAergic events. Experiments were performed at a holding potential between  $-10$  mV and  $10$  mV, at which mIPSCs appeared as outward currents, as illustrated in Fig. 3A. DAMGO significantly decreased the frequency of mIPSCs by  $48.2 \pm 6.5\%$  ( $n=14$ ,  $p<0.05$ ; Fig. 3A,B). The average frequency of mIPSCs was  $5.2 \pm 1.8$  Hz in control, as opposed to  $2.6 \pm 1.0$  Hz in the presence of DAMGO. This decrease in frequency could be observed as a reversible shift of the cumulative probability distribution of mIPSC inter-event intervals (Fig. 2C). DAMGO caused a significant change of the inter-event intervals in 10 of the 14 cells tested (Kolmogorov-Smirnov test,  $p<0.01$ ). The inhibition of mIPSC frequency was not accompanied by a change of mIPSC amplitude. Analysis of mIPSC amplitude cumulative probability distributions showed that during these experiments, no significant change in mIPSC amplitude was detected in 11 of the 14 cells tested (Kolmogorov-Smirnov test,  $p>0.01$ ), as illustrated in Fig. 3D. Hence, these results suggest that DAMGO acts on  $\mu$ -opioid receptors located at the presynaptic terminals of GABAergic neurons of the VTA.

Although mIPSCs are often independent of the entry of  $\text{Ca}^{2+}$  in the synaptic terminal, mIPSCs that are dependent on the entry of  $\text{Ca}^{2+}$  in the terminal via voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels have been observed in certain preparations (Ogura and Kita 2000; Koyama et al. 2000). To determine which of these two classes of mIPSCs are present under our experimental conditions, we tested the effect of the broad spectrum

Ca<sup>2+</sup> channel antagonist cadmium (Cd<sup>2+</sup>) on mIPSC frequency (Fig. 4A). Application of Cd<sup>2+</sup> (100 μM) decreased the mIPSC frequency by 54.7±7.1% (n=10, p<0.05). In this set of experiments, the overall mIPSC frequency was 3.2±1.0 Hz in control condition and 1.0±0.3 Hz in the presence of Cd<sup>2+</sup>. These results suggest that a component of the basal frequency of mIPSCs was Ca<sup>2+</sup>-dependent in control conditions. In the presence of Cd<sup>2+</sup>, no significant decrease in mIPSC frequency was observed following the application of DAMGO (Fig. 4C). The mIPSC frequency in the presence of DAMGO was 98.8±9.1% of the control value (n=10, p>0.05) and the analysis of mIPSC inter-event intervals showed that DAMGO caused no significant change of the inter-event intervals in the 10 cells tested (Kolmogorov-Smirnov test, p>0.01; not shown). Since the rate of release is low in the presence of Cd<sup>2+</sup>, it is possible that the detection of a decrease in basal mIPSC frequency becomes limited under such conditions. To circumvent this problem, we performed additional experiments at a bath temperature of approximately 30°C. As expected, this caused a marked increase in basal mIPSC frequency (to 27.5±7.2 Hz) (Fig. 4B). This was accompanied by a decrease in the time constant of decay of these events which was of 17.3±0.2 ms at room temperature (9189 events analyzed in 5 cells), as opposed to 12.0±0.1 ms at 30°C (19340 events analyzed in 5 cells). Under these conditions, DAMGO was able to reliably decrease the mIPSC frequency by 38.2±6.3% in the presence of Cd<sup>2+</sup> (n=5, p<0.05; Fig 4B,C). This decrease in frequency could be observed as a reversible shift of the cumulative probability distribution of mIPSC inter-event intervals (Fig. 4D). DAMGO caused a significant change of the inter-event intervals in all 5 cells tested (Kolmogorov-Smirnov test, p<0.01). Overall, these

results suggest that one of the mechanisms by which DAMGO acts on presynaptic terminals is independent of the activation of voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels.

*DAMGO inhibits ionomycin-evoked mIPSCs*

The decrease in mIPSC frequency evoked by  $\mu$ -opioid receptor stimulation in the absence of cadmium could be due to either of two mechanisms. A first mechanism is that  $\mu$ -opioid receptor activation may produce a hyperpolarization of nerve terminals leading to a reduction of  $\text{Ca}^{2+}$  influx through voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels. A second possibility is that  $\mu$ -opioid receptor activation leads to a direct inhibition of the secretory process. Although our results with cadmium provide evidence for the second model, we performed additional experiments to distinguish between these two hypotheses. We first examined the effect of DAMGO (1  $\mu\text{M}$ ) on the frequency of mIPSCs evoked by the  $\text{Ca}^{2+}$  ionophore ionomycin (2.5  $\mu\text{M}$ ). Ionomycin is known to elicit neurotransmitter release by directly producing an elevation of intra-terminal  $\text{Ca}^{2+}$ . Its effect is fully independent of the activation of voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels in the presynaptic terminal and completely insensitive to the  $\text{Ca}^{2+}$  channel blocker  $\text{Cd}^{2+}$  (Capogna et al. 1996). A marked increase of mIPSC frequency was observed following a brief (2-3 min) application of ionomycin (2.5  $\mu\text{M}$ ) (Fig. 5A,B). This increase was reversible within a 5 min washout period (Fig. 5B). After 10 min of washout and a recovery of the mIPSC frequency, a second stimulation with ionomycin was then performed in the presence of DAMGO (1  $\mu\text{M}$ ). Finally, after an additional 10 min washout of DAMGO, a third application of ionomycin was performed. For each stimulation, the ability of ionomycin to

increase mIPSC frequency was expressed as a difference score (delta) obtained by subtracting the number of mIPSCs within a 60-s period of time before the application from that in its presence, at the peak of the effect. The delta value of the stimulation with ionomycin in the presence of DAMGO was compared to the mean delta value of the first and third stimulations. We found that DAMGO reduced ionomycin-induced release by  $50.6 \pm 12.4\%$  ( $n=5$ ,  $p < 0.01$ ; Fig. 5C,D). These results confirm that DAMGO can inhibit quantal GABA release by a mechanism that does not involve presynaptic voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels.

#### *DAMGO inhibits ruthenium red-evoked mIPSCs*

To confirm a direct regulation of the secretory process by  $\mu$ -opioid receptor activation, we next tested the effect of DAMGO (1  $\mu\text{M}$ ) on the frequency of mIPSCs evoked by ruthenium red (RR; 50  $\mu\text{M}$ ), a secretagogue known to act on the presynaptic release machinery to induce neurotransmitter release in a  $\text{Ca}^{2+}$ -independent manner (Trudeau et al. 1996a,b; Trudeau et al. 1998; Sciancalepore et al. 1998). A first exposure to RR (RR1) elicited a reversible increase in mIPSC frequency (Fig. 6A,C). This first stimulation was followed by a second, this time in the presence of DAMGO (RR+DAMGO). Finally, a third stimulation with RR (RR3) was performed after washout of DAMGO to account for the usual modest but gradual decline of RR-evoked release over time. As for the experiments with ionomycin, for each stimulation, the ability of RR to increase mIPSC frequency was expressed as a difference score (delta). In these experiments, the delta value was obtained by subtracting the number of mIPSCs within a 15-s period of time before RR from that

in its presence, at the peak of the effect. The delta value of the RR+DAMGO stimulation was compared to the mean delta value of RR1 and RR3 stimulations. These experiments showed that DAMGO inhibited RR-evoked release by  $57.5 \pm 14.6\%$  ( $n=6$ ,  $p<0.05$ ; Fig. 6B,C). Thus, these results confirm that DAMGO can directly inhibit the presynaptic secretory machinery at a step downstream from the entry of  $\text{Ca}^{2+}$  in the terminal.

#### *4-aminopyridine inhibits the effect of DAMGO*

It has been previously suggested that  $\mu$ -opioid receptor activation can decrease GABA release in the periaqueductal gray nucleus by activating 4-AP-sensitive  $\text{K}^+$  channels leading to the hyperpolarization of nerve terminals (Vaughan et al. 1997b). To test the possibility that the action of DAMGO could be mediated by such a voltage-dependent  $\text{K}^+$  channel, we first examined the effect of the voltage-dependent  $\text{K}^+$  channel blocker 4-aminopyridine (4-AP; 100  $\mu\text{M}$  and 1 mM) on the DAMGO induced inhibition of autaptic IPSCs. In these experiments, DAMGO was applied twice to isolated GABAergic neurons: it was first applied in the presence of the antagonist, then again alone after washout of the antagonist. By itself, 4-AP often produced an increase in autaptic IPSC amplitude (Fig. 7A). This effect was highly variable. At 100  $\mu\text{M}$ , the increase was of  $32.9 \pm 15.6\%$ , while at 1 mM, it was of  $86.2 \pm 51.3\%$ . In the presence of 4-AP, the ability of DAMGO to inhibit IPSC amplitude was significantly reduced. In experiments where 4-AP was used at 100  $\mu\text{M}$ , DAMGO reduced IPSC amplitude by  $27.5 \pm 8.9\%$  in comparison to  $56.4 \pm 4.8\%$  in the absence of 4-AP ( $n=8$ ;  $p<0.02$ ; Fig. 7D). Approximately 50% of the effect of

DAMGO was thus blocked. In the presence of 1 mM 4-AP, the block was almost complete ( $8.2 \pm 3.4\%$  inhibition versus  $43.3 \pm 7.5\%$ ,  $n=6$ ,  $p < 0.01$ ; Fig 7C,D). It appears that the block of DAMGO's ability to inhibit IPSCs was not caused by some kind of "saturation" of evoked release due to the enhancement of IPSC amplitude by 4-AP alone. This is illustrated by the complete lack of correlation between the ability of 4-AP to increase IPSC amplitude by itself and its ability to reduce DAMGO's presynaptic inhibition, both at 100  $\mu$ M 4-AP ( $r = -0.03$ , Pearson,  $p = 0.99$ ) and at 1 mM ( $r = -0.32$ , Pearson,  $p = 0.53$ ) (Fig. 7B). These results are compatible with the involvement of a 4-AP-sensitive  $K^+$  channel in the effect of DAMGO in VTA GABAergic neurons.

Because  $\mu$ -opioid receptors can also activate G-protein gated inward rectifying  $K^+$  (GIRK) channels, at least in somatodendritic compartments (Williams et al. 1988; Johnson and North 1992a; Wimpey and Chavkin 1991; Han et al. 1999), we next used barium, a general blocker of GIRK channels, to determine whether a component of DAMGO's effect was dependent on a GIRK-type channel. At 300  $\mu$ M, usually a maximally effective concentration, barium failed to significantly modify IPSC amplitude by itself. The amplitude of IPSCs in the presence of barium was at  $96.7 \pm 3.3\%$  of the control value ( $n=6$ ;  $p > 0.05$ ; not shown). Barium also failed to significantly diminish the ability of DAMGO to reduce IPSC amplitude. In the presence of barium, DAMGO reduced IPSC amplitude by  $66.6 \pm 6.5\%$  in comparison to  $62.2 \pm 4.1\%$  in the absence of the antagonist ( $n=6$ ;  $p > 0.05$ ; Fig. 7C). These results

argue against the implication of a GIRK-type  $K^+$  channel in the inhibition of GABA release by  $\mu$ -opioid receptors in isolated GABAergic neurons.

We next tested the effect of 4-AP (1 mM) on the DAMGO-induced inhibition of spontaneous mIPSC frequency. 4-AP itself caused no significant change in mIPSC frequency ( $102.2 \pm 6.5\%$ ,  $n=7$ ,  $p>0.05$ ; not shown). We found that DAMGO failed to cause any significant change of mIPSC frequency in the presence of 4-AP (Fig. 8A). The mIPSC frequency in the presence of DAMGO was at  $94.7 \pm 8.4\%$  of the control value ( $n=7$ ,  $p>0.05$ ). Thus, DAMGO caused an average frequency reduction of 5% in the presence of 4-AP ( $n=7$ ), as opposed to a 48% inhibition in its absence ( $n=14$ ) (Fig. 8A).

Considering on the one hand that 4-AP is expected to prevent presynaptic inhibition by preventing the opening of  $K^+$  channels and membrane hyperpolarization, and on the other hand that ionomycin evokes mIPSCs independently of membrane polarization, a prediction would be that the modulation of ionomycin-evoked mIPSCs by DAMGO should not be blocked by 4-AP. Unexpectedly, we found that in the presence of 4-AP (1 mM), DAMGO failed to cause a significant change of ionomycin-induced release. The ionomycin-evoked release in the presence of DAMGO was at  $86.7 \pm 14.4\%$  of the control value ( $n=4$ ,  $p>0.05$ ; Fig. 8B). The same type of experiment was performed with RR-evoked mIPSCs. We found that DAMGO's ability to inhibit RR-evoked mIPSCs was unhampered in the presence of

4-AP (1 mM). DAMGO caused a  $50.1 \pm 10.7\%$  inhibition of RR-evoked release under such conditions ( $n=9$ ,  $p<0.01$ ; Fig. 8C).

## DISCUSSION

### *Presynaptic site of action*

It has been established that exogenously applied  $\mu$ -opioid receptor agonists can inhibit the activity of VTA GABAergic neurons through a postsynaptic mechanism of action i.e. somatodendritic hyperpolarization (Johnson and North 1992a). However,  $\mu$ -opioid receptors could also be localized on presynaptic terminals and directly regulate GABA release. In the present study, we report that the activation of  $\mu$ -opioid receptors located on the terminals of VTA GABAergic neurons reduces GABA release through a presynaptic mechanism.

The  $\mu$ -opioid agonists DAMGO and met-enkephalin decreased the frequency of spontaneous IPSCs (Fig. 1). Because these events are generated by spontaneously firing GABAergic neurons, this observation is consistent with the previously described reduction in cellular excitability of VTA GABAergic neurons induced by  $\mu$ -opioid receptor agonists (Johnson and North 1992a). However, our finding that the amplitude of spontaneous IPSCs (Fig. 1) and of evoked autaptic IPSCs (Fig. 2) is decreased by DAMGO and by met-enkephalin suggests that  $\mu$ -opioid receptor agonists also decrease GABA release through other excitability-independent mechanisms. Our data demonstrate that this  $\mu$ -opioid receptor mediated inhibition of GABA release is most likely to involve, at least in part, a presynaptic mechanism of

action. Indeed, DAMGO reduced the frequency of spontaneous mIPSCs without altering their amplitude (Fig. 3), providing good evidence that functional  $\mu$ -opioid receptors are present on the synaptic terminals of VTA GABAergic neurons. The effects described in the current study were most likely due to the activation of *bona fide*  $\mu$ -opioid receptors since the DAMGO-mediated inhibition of sIPSC frequency and amplitude was blocked by the opioid receptor antagonist naloxone and by the highly selective  $\mu$ -opioid receptor antagonist CTOP (Fig. 1). It should be noted that in the present study, IPSCs were measured either in randomly selected neurons (spontaneous IPSCs) or in GABAergic neurons themselves (autaptic IPSCs). Although our experiments have allowed us to analyze the general mechanism by which terminal  $\mu$ -opioid receptors inhibit GABA release in these neurons, we have not explored the possibility that such a mechanism could be different whether GABAergic synapses are established on GABAergic neurons or on dopaminergic neurons, the latter being their natural targets *in vivo*. We have also not explored the nature of the heterogeneity in the sensitivity of GABAergic neurons in our model to  $\mu$ -opioid receptor activation. We have observed that 18 out of 45 isolated GABAergic neurons were sensitive to DAMGO. The lack of response from the insensitive neurons could be due to a genuine heterogeneity in the properties of VTA GABAergic neurons. Alternately, it is possible that in a micro-culture system, neurons may lack some kind of trophic support required to maintain high levels of  $\mu$ -opioid receptor expression. The all-or-none nature of the sensitivity to DAMGO argues in favor of the first possibility.

*Direct inhibition of the secretory process*

Several presynaptic mechanisms could account for the modulation of GABA release by terminal  $\mu$ -opioid receptors in the VTA. It has been proposed that in general, presynaptic G-protein-linked receptors can inhibit neurotransmitter release via three major mechanisms: 1) direct inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$  channels located in the terminals (Yawo and Chuhma 1993; Bourinet et al. 1996; Wu and Saggau 1994); 2) activation of presynaptic  $\text{K}^{+}$  channels leading to action potential shunting and indirect reduction in  $\text{Ca}^{2+}$  influx (Thompson et al. 1993; Simmons and Chavkin 1996); and 3) direct modulation of the release machinery (Trudeau et al. 1996a; Bouron 2001; Capogna et al. 1996). In the present work, we demonstrate that a direct inhibition of the release machinery occurs following the activation of  $\mu$ -opioid receptors located on the terminals of VTA GABAergic neurons. Such a conclusion is based on the following three observations. First, in the presence of the voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channel blocker cadmium, DAMGO still caused a decrease in mIPSC frequency (at 30 °C) (Fig. 4). This suggests that DAMGO inhibits exocytosis at a step beyond  $\text{Ca}^{2+}$  entry through voltage-dependent channels. Second, in experiments where ionomycin was used to trigger  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent exocytosis under conditions where  $\text{Ca}^{2+}$  channel activation was bypassed, we found that the  $\mu$ -opioid receptor agonist DAMGO still caused a decrease in mIPSC frequency (Fig. 5). Such a modulation of GABA release also indicates that a step beyond  $\text{Ca}^{2+}$  entry was affected. Finally, we found that DAMGO also caused a decrease in the frequency of mIPSCs evoked by RR (Fig. 6), an agent which is well known to directly trigger vesicular exocytosis in the absence of  $\text{Ca}^{2+}$  influx (Trudeau et al. 1996a,b; Trudeau et al., 1998; Sciancalepore et al., 1998).

A decrease in RR-evoked exocytosis can be considered a third argument in favor of a direct inhibition of some step of the secretory process. Considering these observations, it is somewhat surprising that the frequency of spontaneously generated mIPSCs was not decreased by DAMGO at room temperature in the presence of cadmium (Fig. 4C). A reasonable explanation for this finding is that under conditions of low release rate, one's ability to detect a decrease in basal mIPSC frequency is limited. We may have been incapable of detecting a small decrease in basal mIPSC frequency under such conditions. Our finding that DAMGO inhibits mIPSC frequency at 30 °C provides good evidence that this explanation is correct.

In summary, our findings on spontaneous, ruthenium red and ionomycin-evoked mIPSCs all suggest that  $\mu$ -opioid receptor activation directly inhibits the secretory process in VTA GABAergic neurons. Although most of the literature suggests that spontaneously generated miniature synaptic currents are usually modulated in the same way as action potential-evoked synaptic currents, the specific function of miniature events is not completely defined (Bouron 2001) and it is difficult to reject the possibility that under some circumstances both types of events could be modulated differently. Nonetheless, the mechanism identified in the present work using mIPSC recordings is thus likely to contribute, at least in part, to the inhibition of action potential evoked GABA release. In addition, it is important to note that the experiments performed with ionomycin involved the measurement of synaptic events which, like action potential-evoked IPSCs, were directly triggered by a rise in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  (although independently from voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$

channels). The demonstration that such events are inhibited to about the same extent as action potential-evoked IPSCs (Figs. 2,5) increases the likelihood that the detected modulation is physiologically relevant.

#### *Implication of presynaptic K<sup>+</sup> channels*

A modulation of 4-AP-sensitive K<sup>+</sup> channels by opioid receptors has been reported in several areas of the brain such as the hippocampus (Wimpey and Chavkin 1991; Simmons and Chavkin 1996), the periaqueductal gray (PAG) (Vaughan et al. 1997b), the VTA (Manzoni and Williams 1999), and the supraoptic nucleus (Muller et al. 1999). Based on these reports, we investigated the possibility that such K<sup>+</sup> channels could mediate the effect of DAMGO on VTA GABAergic neurons. We demonstrated that the K<sup>+</sup> channel blocker 4-AP abolished the inhibition of autaptic IPSCs by DAMGO (Fig. 7). This block is not likely to have been caused by some kind of occlusion due to the enhancement of GABA release caused by 4-AP itself. This can be concluded because the ability of 4-AP to cause an increase in IPSC amplitude was highly variable and there was no correlation between the ability of 4-AP to increase IPSC amplitude and its ability to block DAMGO-mediated inhibition of IPSCs (Fig. 7B). Indeed, in a number of neurons, the DAMGO-mediated inhibition was blocked in cells which showed little if any increase in IPSC amplitude in the presence of 4-AP alone. The inability of DAMGO to reduce autaptic IPSCs in the presence of 4-AP provides evidence which suggests that a direct inhibition of Ca<sup>2+</sup> channels in nerve terminals is not necessarily involved in presynaptic inhibition mediated through the  $\mu$ -opioid receptor in our preparation. Indeed, if  $\mu$ -opioid

receptor activation inhibited  $\text{Ca}^{2+}$  influx through voltage-dependent channels in synaptic terminals, one would have expected a significant fraction of the inhibitory effect of DAMGO to remain in the presence of 4-AP. A 4-AP-sensitive modulation of IPSCs by  $\mu$ -opioid receptor agonists has been previously described in other brain areas such as the PAG (Vaughan et al. 1997b) and in glutamatergic projections to the VTA (Manzoni and Williams 1999).

We found that 4-AP also blocked the DAMGO-induced decrease of mIPSC frequency (Fig. 8). These results suggest that the  $\mu$ -opioid receptor-mediated decrease of GABA release involves the activation of a 4-AP sensitive  $\text{K}^+$  channel located on presynaptic terminals of VTA GABAergic neurons. Taken alone, this finding suggests a mechanism whereby  $\mu$ -opioid receptor-mediated inhibition of GABA release is due to the hyperpolarization of the GABAergic terminals following the activation of a presynaptic  $\text{K}^+$  conductance. This would in turn decrease  $\text{Ca}^{2+}$  influx in the terminal and thus reduce synaptic vesicle exocytosis. Such a mechanism would cause a decrease in mIPSC frequency only if a component of the basal mIPSC frequency was  $\text{Ca}^{2+}$ -mediated. Although this was the case under our experimental conditions (Fig. 4A), this simple mechanism cannot account for the rest of our observations. Indeed, as mentioned above, we found that the  $\mu$ -opioid receptor agonist DAMGO inhibited ionomycin-evoked mIPSCs. Because events evoked in such a way are not expected to be influenced by the opening of  $\text{K}^+$  channels and membrane hyperpolarization, our results suggest that the inhibition of GABA release induced by  $\mu$ -opioid receptor activation is mediated through a direct regulation of the

secretory process at a step downstream from  $\text{Ca}^{2+}$  influx. The ability of 4-AP to block the modulation of ionomycin-evoked GABA release (Fig. 8) is thus difficult to explain unless the  $\text{K}^+$  channel subunit(s) to which 4-AP binds in nerve terminals directly interacts with the secretory apparatus and is able to influence the efficacy of exocytosis through mechanisms other than membrane hyperpolarization. It is interesting to note that recent work from Linial and colleagues has demonstrated that some 4-AP-sensitive  $\text{K}^+$  channel subunits are able to directly interact with the synaptic protein syntaxin (Fili et al. 2001), a key component of the molecular complex involved in mediated synaptic vesicle exocytosis. The physiological significance of this observation is not fully understood, but it could provide a molecular basis for our current results as well as those obtained in the PAG and on glutamatergic afferents to VTA dopaminergic neurons (Vaughan et al. 1997b; Manzoni and Williams 1999).

Because 4-AP (1 mM) blocked essentially all of DAMGO's effect on action-potential-evoked IPSCs and on mIPSC frequency, it can be considered unlikely that other 4-AP-insensitive classes of  $\text{K}^+$  channels could also be involved in mediating presynaptic inhibition induced by  $\mu$ -opioid receptor activation. Although  $\mu$ -opioid receptors are well known to activate somatodendritic G protein-gated inward rectifying  $\text{K}^+$  channels (GIRKs) (Williams et al. 1988; Johnson and North 1992a; Wimpey and Chavkin 1991; Han et al. 1999), these are not known in most preparations to be localized on nerve terminals. In agreement with these results, we found that the GIRK-type antagonist barium failed to decrease the ability of  $\mu$ -opioid

receptor activation to inhibit autaptic IPSCs (Fig. 7). In the present work we have not attempted to identify the molecular nature of the  $K^+$  channels involved. Nonetheless, our finding that these channels are insensitive to barium and sensitive to relatively low concentrations of 4-AP (100  $\mu$ M) suggests the implication of  $I_A$ -like  $K^+$  channels. Much additional work will be required to identify further the specific types of  $K^+$  channels involved.

Two models can be proposed based on our results. One possibility is that stimulation of  $\mu$ -opioid receptors modulate a 4-AP-sensitive voltage-dependent  $K^+$  channel. Modulation of this  $K^+$  channel could be required to mediate presynaptic inhibition and could directly influence exocytosis through interactions with proteins such as syntaxin or through another mechanism. An alternate model is that  $\mu$ -opioid receptor activation inhibits exocytosis through modulation of a protein, other than a  $K^+$  channel, that is directly involved in mediating or regulating exocytosis. Modulation of this protein could be sufficient to cause presynaptic inhibition. A  $K^+$  channel subunit could nonetheless independently interact with the secretory machinery. Binding of 4-AP to this  $K^+$  channel could influence its conformation and indirectly perturb the secretory machinery in such a way that  $Ca^{2+}$ -evoked release (i.e. evoked by action potentials or ionomycin) is now able to override the inhibitory mechanism activated by  $\mu$ -opioid receptor stimulation. Although this hypothesis is more complex than the first one, it would provide an explanation for our finding that 4-AP fails to prevent the inhibition of RR-evoked exocytosis caused by DAMGO (Fig. 8). Indeed, our results with RR suggest that the inhibitory mechanism activated

by DAMGO is still operative when exocytosis is triggered independently of  $\text{Ca}^{2+}$  in the presence of 4-AP. These results thus argue for a dissociation between the targets of 4-AP and of  $\mu$ -opioid receptor signaling in nerve terminals.

Finally, an alternate explanation that cannot yet be excluded is that 4-AP binds to other molecular targets in nerve terminals besides voltage-dependent  $\text{K}^+$  channels. To our knowledge, no other such targets have been identified. Our finding that RR-evoked exocytosis can still be modulated in the presence of 4-AP however allows us to exclude the trivial explanation that 4-AP could somehow unexpectedly act as a  $\mu$ -opioid receptor antagonist.

Several presynaptic G-protein-linked receptors have been reported to act directly on the release machinery, including the A1 adenosine receptor (Scholz and Miller 1992; Trudeau et al. 1996a; Capogna et al. 1996), the  $\text{GABA}_B$  receptor (Capogna et al. 1996), the somatostatin receptor (Boehm and Betz 1997), and the  $5\text{-HT}_{1A}$  serotonin receptor (Koyama et al. 1999). In addition, a mechanism acting downstream of  $\text{Ca}^{2+}$  entry in the terminal has also been suggested for  $\mu$ -opioid receptor-mediated presynaptic inhibition of GABA release from GABAergic interneurons of the CA3 area of the hippocampus (Capogna et al. 1993, 1996). Although our results do not directly exclude the implication of a modulation of terminal  $\text{Ca}^{2+}$  channels as a contributing mechanism, taken together, our present results provide evidence that a late-step mechanism is involved in the ability of terminal  $\mu$ -opioid receptors to inhibit the synaptic release of neurotransmitter from

VTA GABAergic interneurons. In addition, our results suggest the possibility that presynaptic inhibition mediated by  $\mu$ -opioid receptors is under the regulatory control of a novel type of mechanism implicating voltage-dependent  $K^+$  channels, but not necessarily by  $K^+$  ion flux and membrane hyperpolarization. Further experiments will be required to determine the precise molecular mechanism involved.

### **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported in part by grants from the Canadian Institutes of Health Research (former Medical Research Council of Canada) and the EJLB foundation. Annie Bergevin was supported by a studentship from the Fonds pour les Chercheurs et l'Aide à la Recherche du Québec. Helpful comments on this manuscript were provided by Drs Alexandre Bouron, Richard Robitaille and Patrice Congar, as well as by François Michel. We acknowledge the help of Isabel Jutras and Marie-Josée Bourque in the preparation and maintenance of neuronal cultures.

**REFERENCES**

Boehm, S. and Betz, H. Somatostatin inhibits excitatory transmission at rat hippocampal synapses via presynaptic receptors. *J Neurosci* 17:4066-4075, 1997.

Bourinet, E., Soong, T.W., Stea, A., and Snutch, T.P. Determinants of the G protein-dependent opioid modulation of neuronal calcium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:1486-1491, 1996.

Bouron, A. Modulation of spontaneous quantal release of neurotransmitters in the hippocampus. *Prog Neurobiol* 63:613-635, 2001.

Bourque, M.J. and Trudeau, L.E. GDNF enhances the synaptic efficacy of dopaminergic neurons in culture. *Eur J Neurosci* 12:3172-3180, 2000.

Bozarth, M.A. and Wise, R.A. Intracranial self-administration of morphine into the ventral tegmental area in rats. *Life Sci* 28:551-555, 1981.

Broekkamp, C.L., Phillips, A.G., and Cools, A.R. Stimulant effects of enkephalin microinjection into the dopaminergic A10 area. *Nature* 278:560-562, 1979.

Capogna, M., Gähwiler, B.H., and Thompson, S.M. Mechanism of mu-opioid receptor-mediated presynaptic inhibition in the rat hippocampus in vitro. *J Physiol (Lond)* 470:539-558, 1993.

Capogna, M., Gähwiler, B.H., and Thompson, S.M. Presynaptic inhibition of calcium-dependent and -independent release elicited with ionomycin, gadolinium, and alpha-latrotoxin in the hippocampus. *J Neurophysiol* 75:2017-2028, 1996.

Cardozo, D.L. Midbrain dopaminergic neurons from postnatal rat in long-term primary culture. *Neuroscience* 56:409-421, 1993.

Cohen, G.A., Doze, V.A., and Madison, D.V. Opioid inhibition of GABA release from presynaptic terminals of rat hippocampal interneurons. *Neuron* 9:325-335, 1992.

Devine, D.P., Leone, P., Pocock, D., and Wise, R.A. Differential involvement of ventral tegmental mu, delta and kappa opioid receptors in modulation of basal mesolimbic dopamine release: in vivo microdialysis studies. *J Pharmacol Exp Ther* 266:1236-1246, 1993.

Devine, D.P. and Wise, R.A. Self-administration of morphine, DAMGO, and DPDPE into the ventral tegmental area of rats. *J Neurosci* 14:1978-1984, 1994.

Dilts, R.P. and Kalivas, P.W. Autoradiographic localization of mu-opioid and neurotensin receptors within the mesolimbic dopamine system. *Brain Res* 488:311-327, 1989.

Fili, O., Michaelevski, I., Bledi, Y., Chikvashvili, D., Singer-Lahat, D., Boschwitz, H., Linial, M., and Lotan, I. Direct Interaction of a Brain Voltage-Gated K<sup>+</sup> Channel with Syntaxin 1A: Functional Impact on Channel Gating. *J Neurosci* 21:1964-1974, 2001.

Gysling, K. and Wang, R.Y. Morphine-induced activation of A10 dopamine neurons in the rat. *Brain Res* 277:119-127, 1983.

Han, S.H., Cho, Y.W., Kim, C.J., Min, B.I., Rhee, J.S., and Akaike, N. Mu-opioid agonist-induced activation of G-protein-coupled inwardly rectifying potassium current in rat periaqueductal gray neurons. *Neuroscience* 90:209-219, 1999.

Johnson, S.W. and North, R.A. Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *J Neurosci* 12:483-488, 1992a.

Johnson, S.W. and North, R.A. Two types of neurone in the rat ventral tegmental area and their synaptic inputs. *J Physiol (Lond)* 450:455-468, 1992b.

Kalivas, P.W. and Duffy, P. Effect of acute and daily neurotensin and enkephalin treatments on extracellular dopamine in the nucleus accumbens. *J Neurosci* 10:2940-2949, 1990.

Kelley, A.E., Stinus, L., and Iversen, S.D. Interactions between D-ala-met-enkephalin, A10 dopaminergic neurones, and spontaneous behaviour in the rat. *Behav Brain Res* 1:3-24, 1980.

Klitenick, M.A., DeWitte, P., and Kalivas, P.W. Regulation of somatodendritic dopamine release in the ventral tegmental area by opioids and GABA: an in vivo microdialysis study. *J Neurosci* 12:2623-2632, 1992.

Koob, G.F. and Le Moal, M. Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science* 278:52-58, 1997.

Koyama, S., Kubo, C., Rhee, J.S., and Akaike, N. Presynaptic serotonergic inhibition of GABAergic synaptic transmission in mechanically dissociated rat basolateral amygdala neurons. *J Physiol (Lond)* 518 ( Pt 2):525-538, 1999.

Koyama, S., Matsumoto, N., Kubo, C., and NA Presynaptic 5-HT<sub>3</sub> receptor-mediated modulation of synaptic GABA release in the mechanically dissociated rat amygdala neurons. *J Physiol* 529 Pt 2:373-383, 2000.

Lupica, C.R. Delta and mu enkephalins inhibit spontaneous GABA-mediated IPSCs via a cyclic AMP-independent mechanism in the rat hippocampus. *J Neurosci* 15:737-749, 1995.

Manzoni, O.J. and Williams, J.T. Presynaptic regulation of glutamate release in the ventral tegmental area during morphine withdrawal. *J Neurosci* 19:6629-6636, 1999.

Michel, F.J. and Trudeau, L.E. Clozapine inhibits synaptic transmission at GABAergic synapses established by ventral tegmental area neurones in culture. *Neuropharmacology* 39:1536-1543, 2000.

Muller, W., Hallermann, S., and Swandulla, D. Opioidergic modulation of voltage-activated K<sup>+</sup> currents in magnocellular neurons of the supraoptic nucleus in rat. *J Neurophysiol* 81:1617-1625, 1999.

Ogura, M. and Kita, H. Dynorphin exerts both postsynaptic and presynaptic effects in the Globus pallidus of the rat. *J Neurophysiol* 83:3366-3376, 2000.

Phillips, A.G. and LePiane, F.G. Reinforcing effects of morphine microinjection into the ventral tegmental area. *Pharmacol Biochem Behav* 12:965-968, 1980.

Phillips, A.G., LePiane, F.G., and Fibiger, H.C. Dopaminergic mediation of reward produced by direct injection of enkephalin into the ventral tegmental area of the rat. *Life Sci* 33:2505-2511, 1983.

Rekling, J.C. Effects of met-enkephalin on GABAergic spontaneous miniature IPSPs in organotypic slice cultures of the rat hippocampus. *J Neurosci* 13:1954-1964, 1993.

Scholz, K.P. and Miller, R.J. Inhibition of quantal transmitter release in the absence of calcium influx by a G protein-linked adenosine receptor at hippocampal synapses. *Neuron* 8:1139-1150, 1992.

Sciancalepore, M., Savic, N., Gyori, J., and Cherubini, E. Facilitation of miniature GABAergic currents by ruthenium red in neonatal rat hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 80:2316-2322, 1998.

Sesack, S.R. and Pickel, V.M. Ultrastructural relationships between terminals immunoreactive for enkephalin, GABA, or both transmitters in the rat ventral tegmental area. *Brain Res* 672:261-275, 1995.

Simmons, M.L. and Chavkin, C. k-Opioid receptor activation of a dendrotoxin-sensitive potassium channel mediates presynaptic inhibition of mossy fiber neurotransmitter release. *Mol Pharmacol* 50:80-85, 1996.

Stanford, I.M. and Cooper, A.J. Presynaptic mu and delta opioid receptor modulation of GABAA IPSCs in the rat globus pallidus in vitro. *J Neurosci* 19:4796-4803, 1999.

Steffensen, S.C., Svingos, A.L., Pickel, V.M., and Henriksen, S.J. Electrophysiological characterization of GABAergic neurons in the ventral tegmental area. *J Neurosci* 18:8003-8015, 1998.

Sulzer, D., Joyce, M.P., Lin, L., Geldwert, D., Haber, S.N., Hattori, T., and Rayport, S. Dopamine neurons make glutamatergic synapses in vitro. *J Neurosci* 18:4588-4602, 1998.

Thompson, S.M., Capogna, M., and Scanziani, M. Presynaptic inhibition in the hippocampus. *Trends Neurosci* 16:222-227, 1993.

Trudeau, L.E., Doyle, R.T., Emery, D.G., and Haydon, P.G. Calcium-independent activation of the secretory apparatus by ruthenium red in hippocampal neurons: a new tool to assess modulation of presynaptic function. *J Neurosci* 16:46-54, 1996a.

Trudeau, L.E., Emery, D.G., and Haydon, P.G. Direct modulation of the secretory machinery underlies PKA-dependent synaptic facilitation in hippocampal neurons. *Neuron* 17:789-797, 1996b.

Trudeau, L.E., Fang, Y., and Haydon, P.G. Modulation of an early step in the secretory machinery in hippocampal nerve terminals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:7163-7168, 1998.

Vaughan, C.W. and Christie, M.J. Presynaptic inhibitory action of opioids on synaptic transmission in the rat periaqueductal grey in vitro. *J Physiol (Lond)* 498 ( Pt 2):463-472, 1997a.

Vaughan, C.W., Ingram, S.L., Connor, M.A., and Christie, M.J. How opioids inhibit GABA-mediated neurotransmission. *Nature* 390:611-614, 1997b.

Williams, J.T., North, R.A., and Tokimasa, T. Inward rectification of resting and opiate-activated potassium currents in rat locus coeruleus neurons. *J Neurosci* 8:4299-4306, 1988.

Wimpey, T.L. and Chavkin, C. Opioids activate both an inward rectifier and a novel voltage-gated potassium conductance in the hippocampal formation. *Neuron* 6:281-289, 1991.

Wise, R.A. Addictive drugs and brain stimulation reward. *Annu Rev Neurosci* 19:319-340, 1996.

Wu, L.G. and Saggau, P. Adenosine inhibits evoked synaptic transmission primarily by reducing presynaptic calcium influx in area CA1 of hippocampus. *Neuron* 12:1139-1148, 1994.

Yawo, H. and Chuhma, N. Preferential inhibition of omega-conotoxin-sensitive presynaptic Ca<sup>2+</sup> channels by adenosine autoreceptors. *Nature* 365:256-258, 1993.

**FIGURE LEGENDS**

**Fig. 1. Effect of DAMGO on spontaneous inhibitory postsynaptic currents (sIPSCs).** (A) Whole-cell recordings of sIPSCs under control conditions and in the presence of DAMGO (1  $\mu$ M). The frequency and the amplitude of the sIPSCs were markedly decreased by DAMGO (right). (B) Time course showing the effect of DAMGO on sIPSC frequency (closed circles) and amplitude (open circles) (n=11). (C) Summary histogram of the mean sIPSC frequency (closed bars) and amplitude (open bars) expressed as percentage of control. The sIPSC frequency was decreased by DAMGO (n=11) and by met-enkephalin (10  $\mu$ M) (n=10) \*\*\*P<0.005. The sIPSC amplitude was also decreased by DAMGO (n=11) \*\*\*P<0.005, and by met-enkephalin (n=10) \*P<0.05. However, DAMGO failed to significantly decrease the frequency and amplitude of sIPSCs in the presence of the opioid receptor antagonists naloxone (1  $\mu$ M) (n=13) or CTOP (1  $\mu$ M) (n=6).

**Fig. 2. Effect of DAMGO on autaptic current amplitude in VTA GABAergic neurons in micro-dot culture.** (A) Phase contrast image of an isolated VTA neuron (note patch pipette on the left). White bar represents 10 $\mu$ m. (B) Image of an isolated VTA neuron sensitive to DAMGO after immunostaining for glutamic acid decarboxylase, to confirm the cell's GABAergic phenotype. This cell was also immuno-negative for tyrosine hydroxylase (not shown). White bar represents 10 $\mu$ m. (Different neuron than in A). (C) Whole-cell recording of an autaptic IPSC from an

isolated GABAergic neuron (Different neuron than in B). Stimulation with a brief voltage step ( $-40$  mV to  $20$  mV for  $1$  ms) triggered a fast inward sodium action current (\*) followed by a slow outward GABA<sub>A</sub> receptor-mediated IPSC. DAMGO ( $1$   $\mu$ M) markedly decreased the IPSC amplitude and this effect was reversible (Wash). Each trace is an average of  $5$  sweeps. (D) Time course of autaptic IPSC amplitude expressed as percentage of control ( $n=18$ ). DAMGO significantly reduced IPSC amplitude.

**Fig. 3. Effect of DAMGO on spontaneous miniature inhibitory post-synaptic currents (mIPSCs).** (A) Whole-cell recordings of mIPSCs under control conditions and in the presence of DAMGO ( $1$   $\mu$ M). Recordings from two representative cells are shown. The frequency of spontaneous mIPSCs was markedly decreased by DAMGO (right). (B) Summary histogram of the mean mIPSC frequency expressed as percentage of control. The mIPSC frequency was decreased by DAMGO ( $n=14$ ) \* $P<0.05$ . (C) Cumulative probability distribution of inter-event intervals from a representative experiment. DAMGO caused a significant change in inter-event intervals and this effect was reversible (Wash). (D) Cumulative probability distribution of mIPSC amplitudes from the same experiment as in C. No significant change in mIPSC amplitude was caused by DAMGO.

**Fig. 4. Effect of Ca<sup>2+</sup> channel blockade on mIPSC modulation by DAMGO.** (A) Whole-cell recordings of mIPSCs at room temperature from two representative experiments. The frequency of mIPSCs was significantly decreased in the presence of the Ca<sup>2+</sup> channel blocker Cd<sup>2+</sup> (100 μM; right). (B) Whole-cell recordings of mIPSCs in the presence of Cd<sup>2+</sup> (100μM) at 30°C. Results from two representative cells are shown. At such higher temperature, the frequency of spontaneous mIPSCs was markedly increased by DAMGO in the presence of Cd<sup>2+</sup> (right). (C) Summary histogram of the mean mIPSC frequency expressed as percentage of control. DAMGO failed to decrease mIPSC frequency in the presence of Cd<sup>2+</sup> at room temperature (n=10). However, at 30 °C, DAMGO caused a significant decrease of mIPSC frequency in the presence of Cd<sup>2+</sup> (n=5) \*P<0.05. (D) Cumulative probability distribution of inter-event intervals from a representative experiment. DAMGO caused a significant change in inter-event intervals in the presence of Cd<sup>2+</sup> at 30 °C. This effect was reversible (Wash).

**Fig. 5. Effect of DAMGO on mIPSCs triggered by ionomycin.** (A) Whole-cell recordings of mIPSCs. Perfusion of ionomycin (2.5 μM) increased the frequency of mIPSCs. The frequency of ionomycin-evoked mIPSCs was markedly decreased by DAMGO (1 μM). (B) Cumulative probability distribution of inter-event intervals from a representative experiment. Ionomycin caused a leftward shift of the distribution curve and this effect was reversible (Wash). (C) Summary histogram. DAMGO caused a significant decrease in ionomycin-evoked release (n=5) \*\*P<0.01.

(C) Cumulative probability distribution of inter-event intervals from a representative experiment. DAMGO caused a rightward shift in the distribution curve of inter-events intervals of ionomycin-evoked events.

**Fig. 6. Effect of DAMGO on mIPSCs triggered by the Ca<sup>2+</sup>-independent secretagogue ruthenium red (RR).** (A) Whole-cell recordings of mIPSCs. Brief perfusion of RR (50  $\mu$ M) triggered a rise in the frequency of mIPSCs. The frequency of RR-evoked mIPSCs was markedly decreased by DAMGO. (B) Summary histogram. DAMGO caused a significant decrease in RR-evoked release (n=6). \*P<0.05. (C) Cumulative probability distribution of inter-event intervals from a representative experiment. RR caused a leftward shift of the distribution curve and this was inhibited by DAMGO.

**Fig. 7. Mechanism of autaptic current amplitude decrease by DAMGO.** (A) Whole-cell recordings of autaptic IPSCs in the presence of 4-AP (1 mM) from the same cell as in Fig. 2C. DAMGO failed to decrease IPSC amplitude in the presence of 4-AP. (B) Absence of correlation between the ability of 4-AP to increase IPSC amplitude and its ability to block DAMGO-mediated inhibition of IPSCs. (C) Time course of autaptic IPSC amplitude in the presence of 4-AP (1 mM) expressed as percentage of control (n=6). (D) Summary histogram of mean IPSC amplitude expressed as percentage of control. The effect of DAMGO was significantly blocked

by 4-AP 1mM (n=6) (\*\*P<0.01) and by 4-AP 100  $\mu$ M (n=8) (\*P<0.05). However, barium (300  $\mu$ M) failed to block the effect of DAMGO (n=6).

**Fig 8. Mechanism of mIPSC frequency decrease by DAMGO.** (A) Histogram of mean mIPSC frequency expressed as percentage of control. DAMGO significantly decreased mIPSC frequency (n=14). \*P<0.05 (same data as in Fig. 3B). This effect was blocked in the presence of 4-AP (1 mM) (n=7). (B) Histogram of ionomycin-evoked release expressed as percentage of control. The DAMGO-induced decrease of ionomycin-evoked release was abolished in the presence of 4-AP (1 mM) (n=4). (C) Histogram of RR-evoked release expressed as percentage of control. 4-AP (1 mM) failed to block the DAMGO-induced decrease of RR-evoked release (n=9). \*\*P<0.01.



FIGURE 2

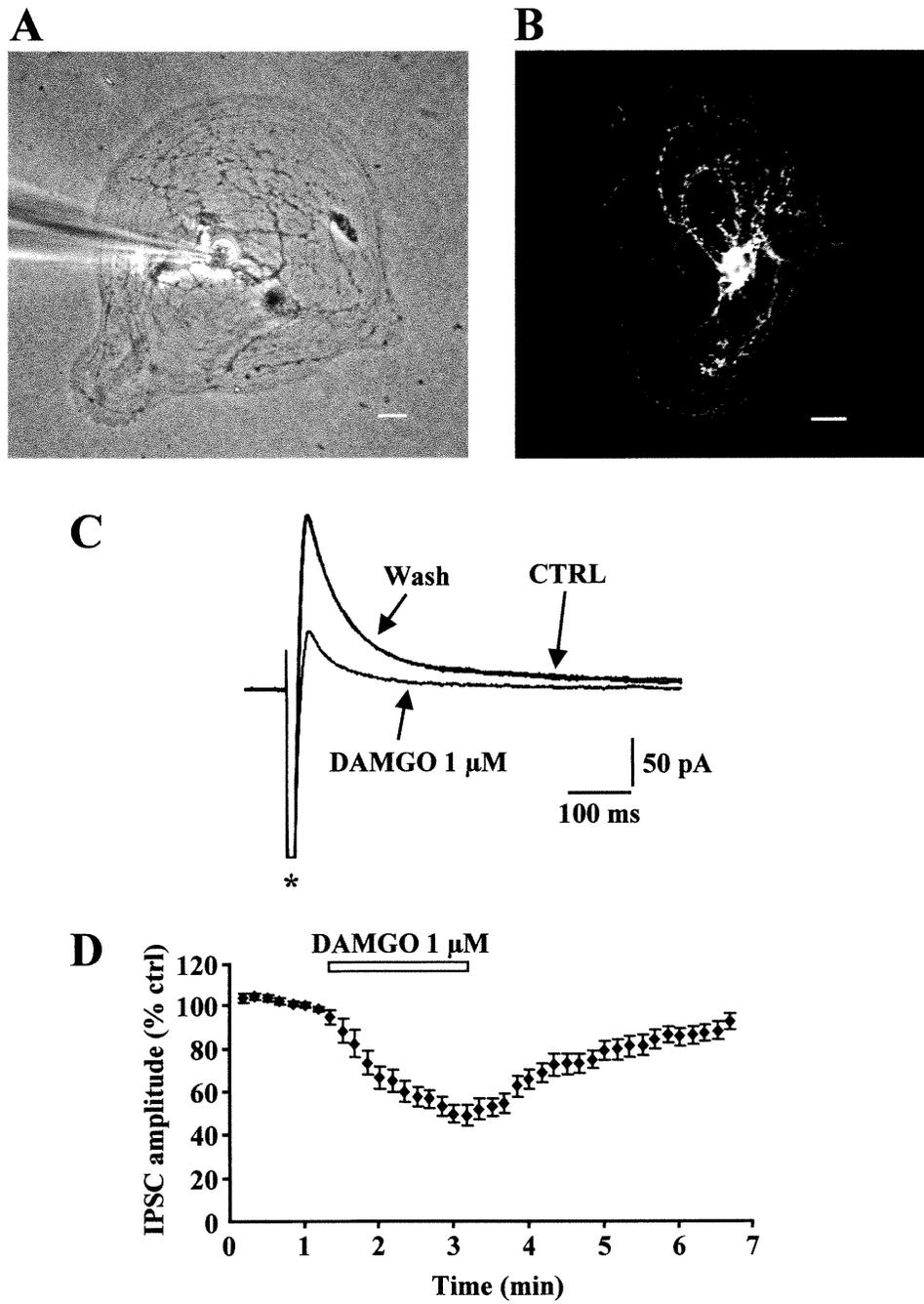


FIGURE 3

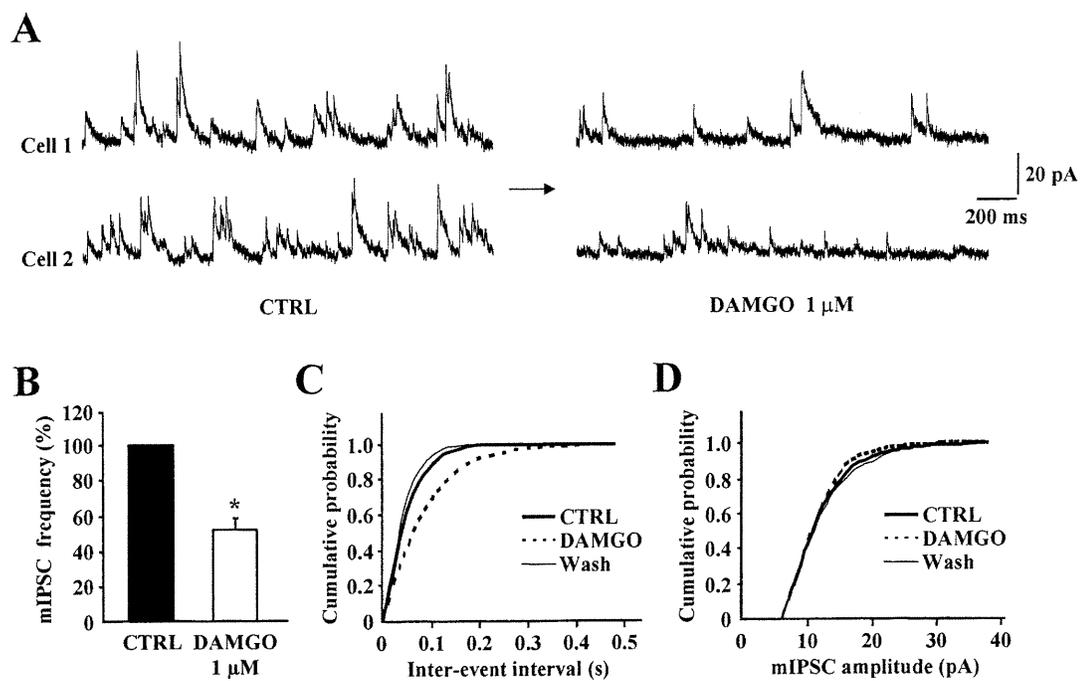


FIGURE 4

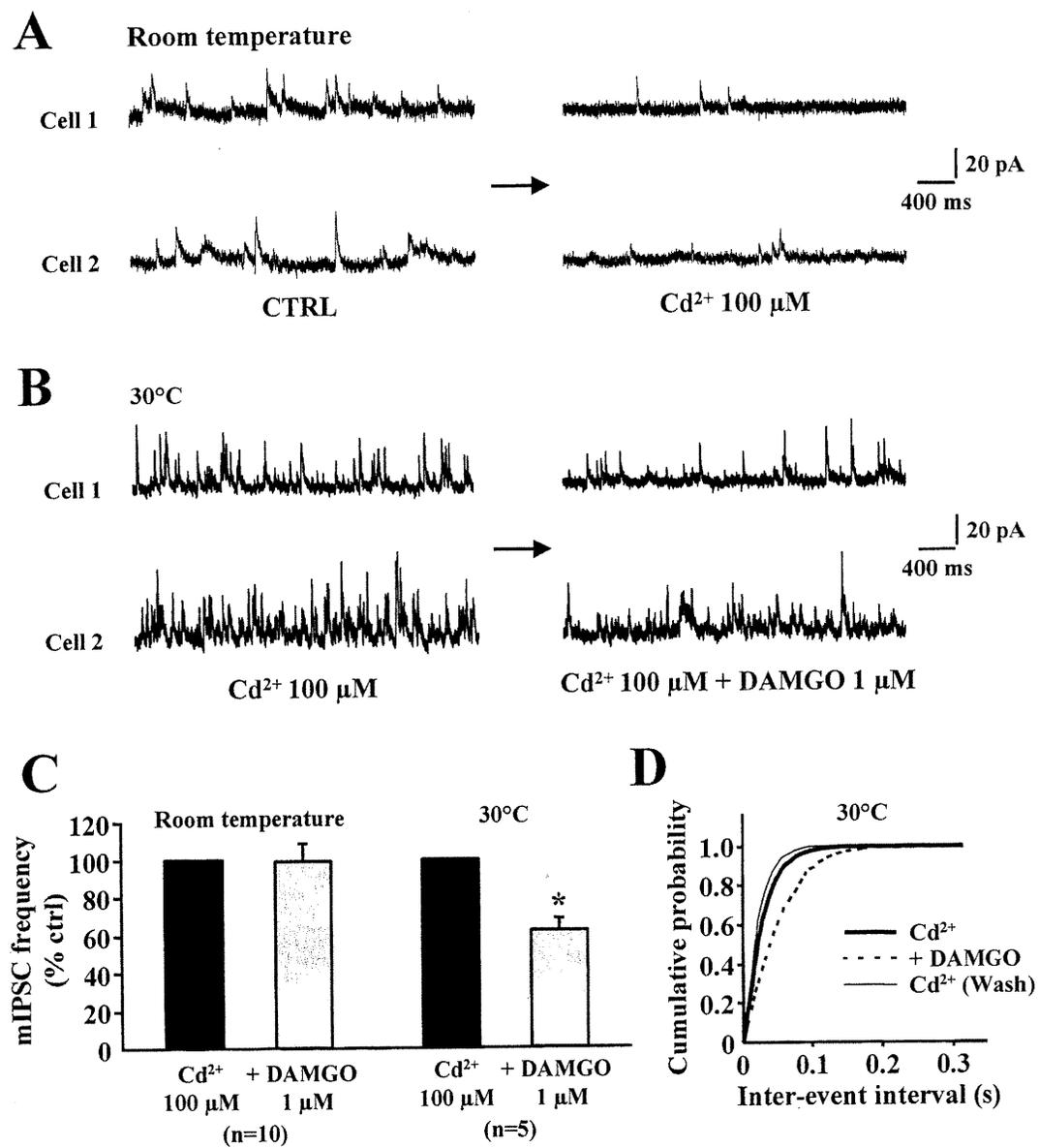


FIGURE 5

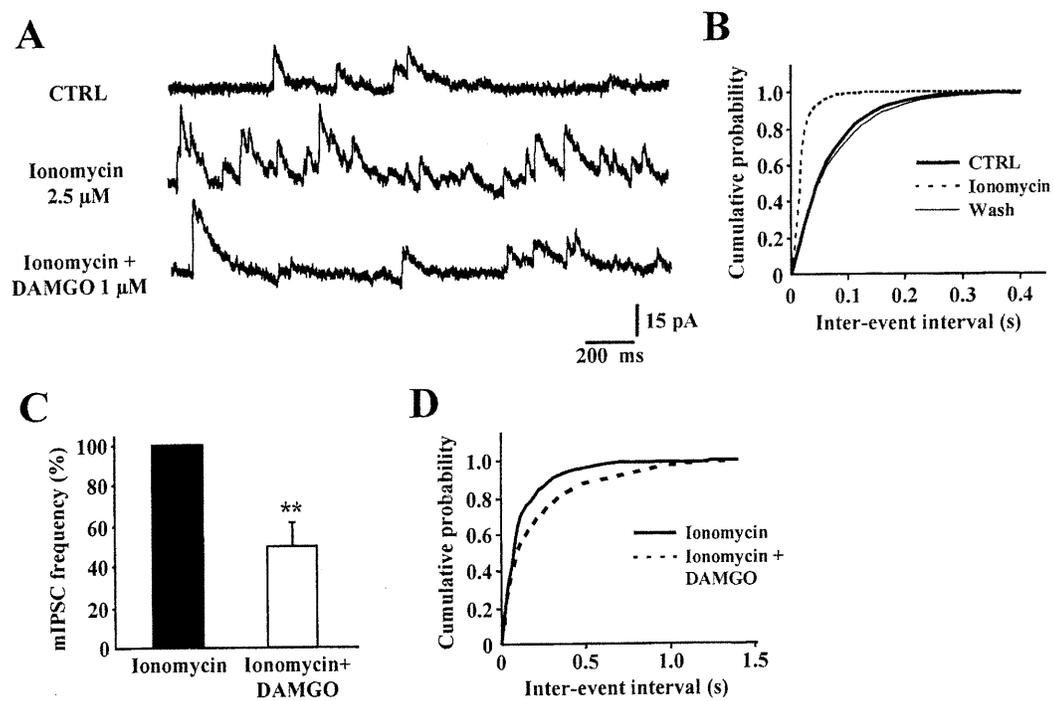


FIGURE 6

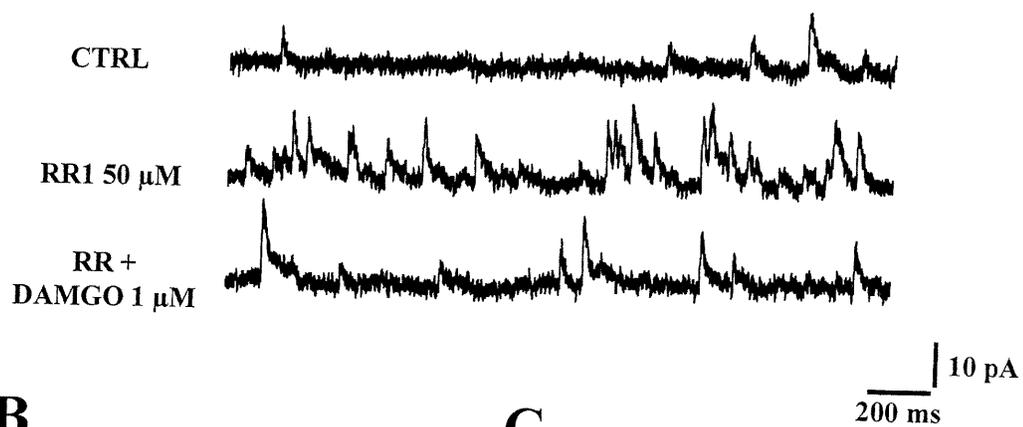
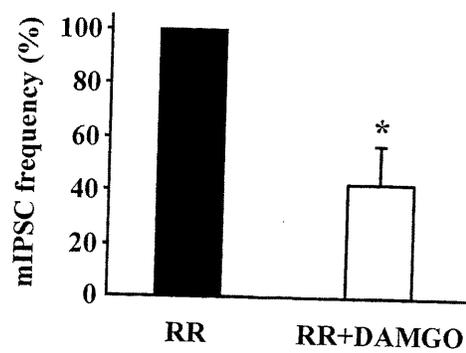
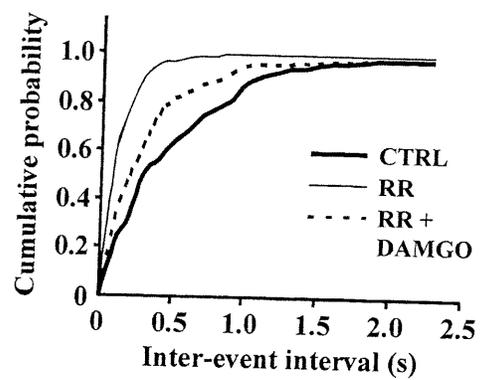
**A****B****C**

FIGURE 7

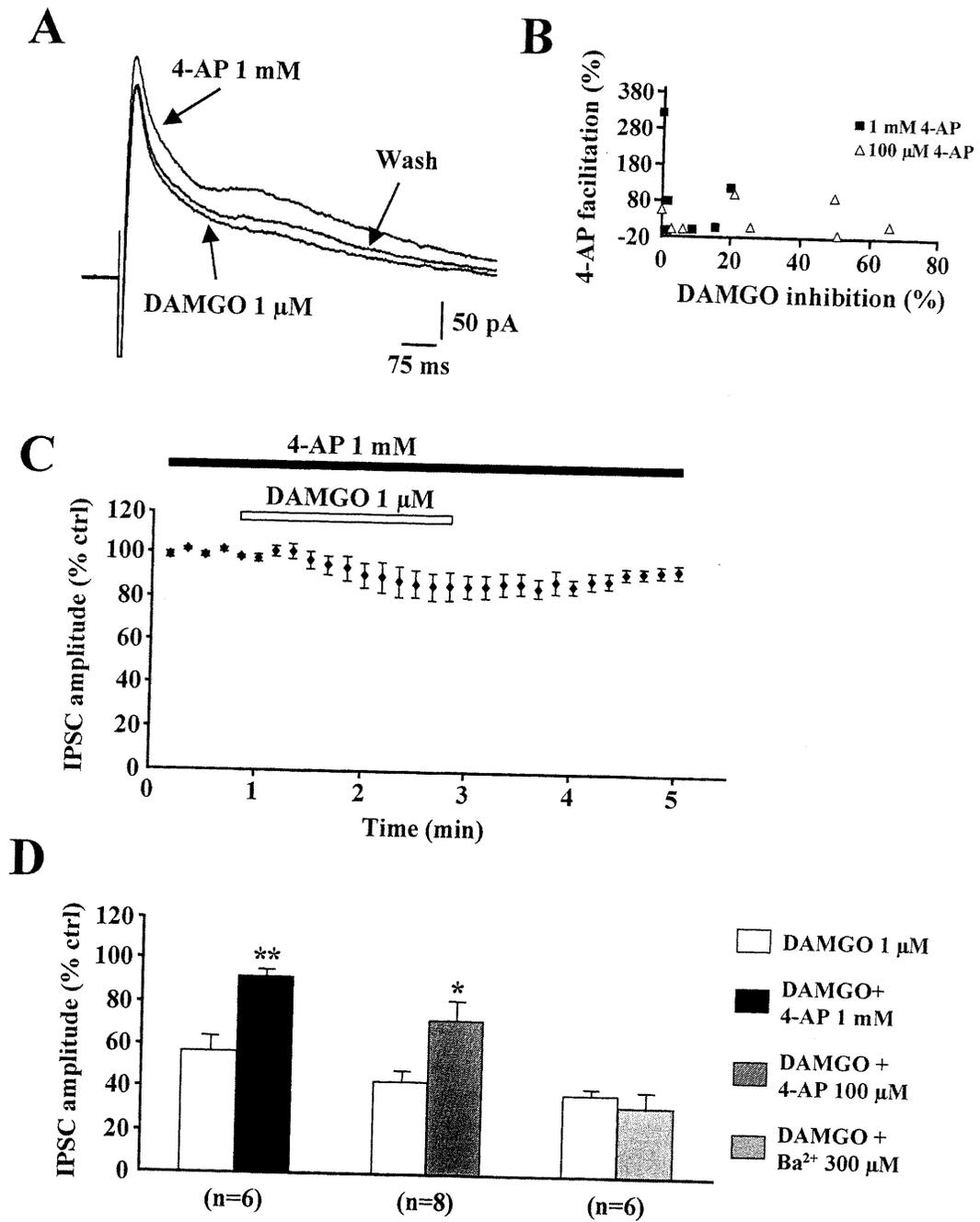
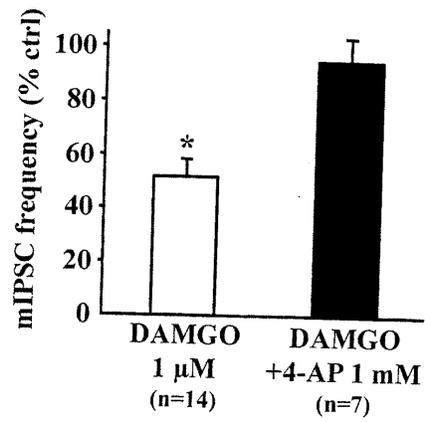
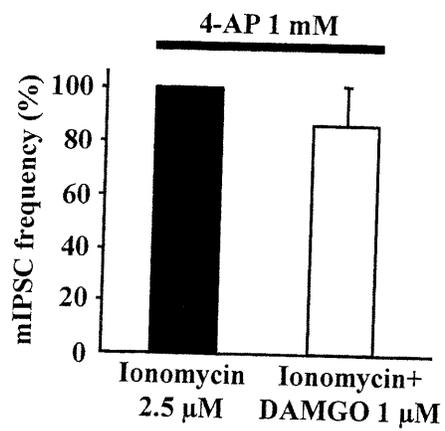
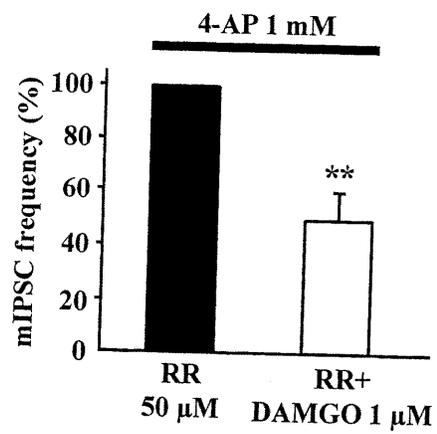


FIGURE 8

**A****B****C**

## **DISCUSSION**

Il a été montré par Johnson et North (1992a) que l'activité des interneurons GABAergiques de l'ATV est inhibée en présence d'agonistes des récepteurs  $\mu$ -opioïdes. Ces auteurs ont conclu que l'activation d'une conductance  $K^+$  somatique serait responsable de cet effet inhibiteur. L'activation de cette conductance suite à l'activation de récepteurs  $\mu$ -opioïdes somatodendritiques résulterait en une hyperpolarisation des interneurons GABAergiques, et donc, en une diminution de leur activité spontanée. Cependant, des évidences suggèrent également la présence de récepteurs  $\mu$ -opioïdes au niveau des terminaisons synaptiques des neurones GABAergiques de l'ATV (Sesack et Pickel 1995). Dans la présente étude, nous avons donc exploré la possibilité que la modulation des interneurons GABAergiques par des agonistes  $\mu$ -opioïdes dans l'ATV implique l'activation de récepteurs  $\mu$ -opioïdes situés au niveau des terminaisons synaptiques.

### **3.1 EFFET DU DAMGO SUR LES NEURONES GABAERGIQUES EN CULTURE**

Nous avons tout d'abord tenté de déterminer si l'activation des récepteurs  $\mu$ -opioïdes avait un effet sur les neurones GABAergiques de l'ATV dans notre modèle de culture primaire. Nous avons observé qu'en présence de met-enképhaline, un agoniste des récepteurs opioïdes, ou de DAMGO, un agoniste spécifique pour les récepteurs  $\mu$ -opioïdes, la fréquence des CPSI spontanés enregistrés à l'aide des

cultures standard est diminuée. Comme la fréquence des CPSI spontanés reflète l'activité spontanée des neurones GABAergiques, ces résultats sont donc en accord avec ceux obtenus par Johnson et North (1992a) sur leur préparation de tranches d'ATV.

La diminution de la fréquence des CPSI spontanés causée par la mé-enképhaline et le DAMGO est accompagnée d'une diminution de leur amplitude. De plus, le DAMGO diminue l'amplitude des CPSI autaptiques enregistrés dans des neurones GABAergiques isolés retrouvés sur les cultures micro-goutte. L'effet du DAMGO sur l'amplitude des CPSI autaptiques et des CPSI spontanés suggère qu'en plus de diminuer la fréquence de décharge des neurones GABAergiques de l'ATV, l'activation des récepteurs  $\mu$ -opioïdes diminue la quantité de GABA libérée suite à chaque potentiel d'action.

Il est à noter que le blocage de l'effet du DAMGO sur la fréquence et l'amplitude des CPSI spontanés par l'antagoniste opioïde naloxone ainsi que par le CTOP, un antagoniste spécifique des récepteurs  $\mu$ -opioïdes, confirme que les effets du DAMGO observés dans cette étude sont dûs à l'activation de récepteurs opioïdes de type  $\mu$ .

### 3.2 MÉCANISMES D'ACTION PRÉSYPNAPTIQUE

L'observation que l'amplitude des CPSI spontanés ainsi que celle des CPSI autaptiques est diminuée en présence de DAMGO suggère l'existence d'un mécanisme autre que celui suggéré par Johnson et North (1992a) quant à l'effet des agonistes opioïdes sur les neurones GABAergiques de l'ATV. En effet, l'amplitude de ces événements est indépendante de la capacité d'un neurone à générer des potentiels d'action. Une modulation par le DAMGO de l'amplitude des CPSI spontanés et des CPSI autaptiques suggère donc l'implication d'un mécanisme n'agissant pas sur l'excitabilité cellulaire. Ce mécanisme pourrait impliquer l'activation de récepteurs  $\mu$ -opioïdes situés au niveau des terminaisons synaptiques. Pour évaluer cette hypothèse, nous avons déterminé l'effet du DAMGO sur les CPSI miniatures. Nous avons observé que la fréquence, mais pas l'amplitude, des CPSI miniatures est réduite en présence de DAMGO. Comme il a été mentionné dans la section 1.6.2, il est connu qu'une modulation de la fréquence des CPSI miniatures correspond généralement à un effet présynaptique. Les résultats obtenus suggèrent donc que l'effet du DAMGO sur les neurones GABAergiques de l'ATV implique, du moins en partie, l'activation de récepteurs  $\mu$ -opioïdes situés au niveau des terminaisons synaptiques.

Il a été proposé que les RCPGs situés au niveau des terminaisons synaptiques peuvent inhiber la libération de neurotransmetteurs via trois principaux mécanismes. Ces trois mécanismes sont l'inhibition de canaux  $\text{Ca}^{2+}$  présynaptiques, l'activation de canaux  $\text{K}^{+}$  présynaptiques hyperpolarisants qui court-circuitent le potentiel d'action,

ou une action directe sur l'appareil sécrétoire (voir section 1.4). Dans la présente étude, nous avons démontré que c'est principalement ce dernier mécanisme qui serait responsable de l'inhibition de la libération de GABA suite à l'activation des récepteurs  $\mu$ -opioïdes situés sur les terminaisons synaptiques des neurones GABAergiques de l'ATV.

### 3.3 MODULATION DIRECTE DE L'APPAREIL SÉCRÉTOIRE

Une modulation directe de l'appareil de sécrétion a été observée pour plusieurs types de RCPGs. En effet, ce type de modulation a été observée entre autre pour le récepteur  $A_1$  de l'adénosine (Scholz et Miller 1992; Capogna et coll. 1996; Trudeau et coll. 1996a), le récepteur  $GABA_B$  (Capogna et coll. 1996), le récepteur à la somatostatine (Boehm et Betz 1997) et le récepteur  $5-HT_{1A}$  de la sérotonine (Koyama et coll. 1999). De plus, il a été suggéré que ce type de mécanisme serait impliqué dans l'inhibition présynaptique de la libération de GABA suite à l'activation du récepteur  $\mu$ -opioïde dans la région CA3 de l'hippocampe (Capogna et coll. 1993; Capogna et coll. 1996). Nous avons donc voulu voir si un tel type de mécanisme pourrait être impliqué dans l'inhibition de la libération de GABA suite à l'activation des récepteurs  $\mu$ -opioïdes dans l'ATV.

Nous avons observé que le DAMGO inhibe la libération de GABA induite par le sécrétagogue ionomycine. L'ionomycine est un ionophore calcique (Beeler et coll.

1979), c'est-à-dire qu'elle provoque une augmentation de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire. L'ionomycine augmente donc la libération de neurotransmetteurs en élevant les niveaux de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire dans les terminaisons synaptiques. Ceci est reflété par une augmentation de la fréquence des CPSI miniatures ou des CPSE miniatures (Capogna et coll. 1996). L'augmentation de la concentration intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$  induite par l'ionomycine n'est pas due à une entrée de ce dernier par les canaux  $\text{Ca}^{2+}$  dépendants du voltage. En effet, l'augmentation de l'exocytose de neurotransmetteurs induite par l'ionomycine n'est pas bloquée en présence de  $\text{Cd}^{2+}$ , un bloqueur non-spécifique des canaux  $\text{Ca}^{2+}$  dépendants du voltage (Capogna et coll. 1996). L'ionomycine augmente donc la libération de neurotransmetteurs d'une façon dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$ , mais indépendamment de l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  par des canaux dépendants du voltage. Étant donné que l'effet de l'ionomycine sur la libération de neurotransmetteurs est indépendant des canaux  $\text{Ca}^{2+}$  dépendants du voltage, l'observation que le DAMGO diminue l'augmentation de la fréquence des CPSI miniatures induite par l'ionomycine démontre l'existence d'un mécanisme autre qu'une inhibition directe des canaux  $\text{Ca}^{2+}$  présynaptiques. En effet, cette observation suggère que le DAMGO inhiberait l'exocytose en agissant sur une étape de la neurotransmission située en aval de l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la terminaison, c'est-à-dire en agissant directement sur l'appareil sécrétoire.

Le DAMGO a également bloqué l'augmentation de la libération de GABA induite par le rouge de ruthénium (RR). Le RR est un sécrétagogue qui comme l'ionomycine, provoque une augmentation de la fréquence des CPSI miniatures et des

CPSE miniatures (Trudeau et coll. 1996a; Trudeau et coll. 1996b; Trudeau et coll. 1998; Sciancalepore et coll. 1998). Par contre, contrairement à cette dernière, le RR induit la libération de neurotransmetteurs de manière totalement indépendante du  $\text{Ca}^{2+}$ . En effet, l'augmentation de l'exocytose de neurotransmetteurs induite par le RR n'est pas affectée par l'absence de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire ou par une déplétion des réserves intracellulaires de  $\text{Ca}^{2+}$  à l'aide de la thapsigargin (Trudeau et coll. 1996a). Le RR constitue donc un outil permettant de détecter une modulation directe de l'appareil sécrétoire. Le fait que l'augmentation de la fréquence des CPSI miniatures induite par le RR soit inhibée par le DAMGO constitue donc une deuxième évidence suggérant que le mécanisme d'action du DAMGO implique une action directe sur les protéines de l'appareil sécrétoire.

Une troisième observation supporte l'hypothèse d'une modulation directe de l'appareil sécrétoire. En effet, nous avons montré qu'en présence de  $\text{Cd}^{2+}$ , à température élevée, l'effet du DAMGO sur la fréquence des CPSI miniatures est toujours présent. Ceci suggère que l'effet du DAMGO ne passe pas par une inhibition directe des canaux  $\text{Ca}^{2+}$  présynaptiques, mais plutôt par un mécanisme agissant en aval de l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la terminaison. Bien que nous ayons observé un effet du DAMGO sur la fréquence des CPSI miniatures en présence de  $\text{Cd}^{2+}$  à température élevée, cet effet était absent à la température de la pièce. Ceci pourrait être dû au fait qu'en présence de  $\text{Cd}^{2+}$  à la température de la pièce, la fréquence basale des CPSI miniatures était à ce point faible qu'il nous était difficile de détecter une baisse additionnelle de la fréquence des CPSI miniatures dans de telles conditions.

Par contre, à température élevée, la fréquence des CPSI miniatures était augmentée. Ceci est en accord avec l'effet classique d'une augmentation de température sur la libération spontanée de neurotransmetteurs. En effet, il est connu depuis longtemps qu'une élévation de température facilite la libération de neurotransmetteurs, ce qui est reflété, à la jonction neuromusculaire des mammifères, par une augmentation de la fréquence des potentiels de plaque motrice miniatures (Fatt et Katz 1952; Boyd et Martin 1956; Liley 1956). L'augmentation de la fréquence des CPSI à température élevée a donc probablement facilité la détection de l'effet inhibiteur du DAMGO en présence de  $\text{Cd}^{2+}$ . Cependant, il est également possible que l'augmentation de la température en soit ait pu modifier l'état du système de manière à rendre le DAMGO plus efficace à inhiber la libération de GABA, par exemple en facilitant le couplage récepteur-effecteur, en modifiant la fonction du récepteur  $\mu$ -opioïde ou en modifiant l'état du complexe des SNAREs.

En résumé, l'ensemble des résultats mentionnés dans cette section suggère que les récepteurs  $\mu$ -opioïdes situés sur les terminaisons synaptiques des interneurons GABAergiques de l'ATV diminueraient la libération de GABA en utilisant un mécanisme agissant en aval de l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la terminaison, c'est-à-dire par une action directe sur l'appareil sécrétoire.

Comme il a été mentionné précédemment, de nombreuses protéines sont impliquées dans l'exocytose de neurotransmetteurs et plusieurs parmi celles-ci pourraient constituer des cibles potentielles pour un mécanisme agissant directement

sur l'appareil sécrétoire. La phosphorylation des protéines responsables de l'exocytose des vésicules synaptiques pourrait d'ailleurs constituer un des mécanismes majeurs de la plasticité synaptique. En effet, comme il a été mentionné à la section 1.4.3, la libération de neurotransmetteurs peut être modulée en aval de l'entrée de  $Ca^{2+}$  dans la terminaison par des activateurs de la PKA et de la PKC. De plus, plusieurs des protéines SNAREs et des protéines régulatrices des SNAREs contiennent des sites de phosphorylation potentiels. En effet, il a été montré que les protéines SNAREs peuvent être phosphorylées par différentes kinases. La syntaxine et SNAP-25 peuvent être phosphorylées par la casein kinase II et la PKA *in vitro* (Risinger et Bennett 1999). SNAP-25 peut également être phosphorylée par la PKC (Shimazaki et coll. 1996). De plus, VAMP contient des sites de phosphorylation pour la calmoduline kinase II (CaMKII) et la casein kinase II (Nieler et coll. 1995). En ce qui concerne les protéines régulant l'activité des SNAREs, il a été montré que la Rabphiline peut être phosphorylée par la PKA (Fykse 1998) et que la nSec1 peut être phosphorylée par la PKC (Fujita et coll. 1996). Finalement, la synaptotagmine peut être phosphorylée par la CaMKII (Verona et coll. 2000). La phosphorylation ou la déphosphorylation de n'importe quelle de ces protéines pourrait donc moduler la libération spontanée et évoquée à une étape en aval de l'entrée de  $Ca^{2+}$  dans la terminaison. Ce type de régulation pourrait donc être impliqué dans l'effet du DAMGO sur la libération de GABA dans l'ATV. Cependant, pour l'instant, il n'existe aucune démonstration directe de l'implication de la phosphorylation d'une protéine synaptique spécifique dans la modulation de l'exocytose par l'intermédiaire d'un RPCG.

### 3.4 IMPLICATION D'UN CANAL $K^+$ DÉPENDANT DU VOLTAGE

Il est bien connu que les récepteurs opioïdes ont pour effecteurs certains canaux  $K^+$  (North et coll. 1987). Il a d'ailleurs été montré que les canaux  $K^+$  dépendants du voltage sont impliqués dans l'effet des opioïdes dans différentes régions du cerveau dont l'hippocampe (Wimpey et Chavkin 1991; Simmons et Chavkin 1996), le PAG (Vaughan et coll. 1997), l'ATV (Manzoni et Williams 1999) et le noyau supraoptique (Muller et coll. 1999). Nous avons donc voulu vérifier l'implication possible des canaux  $K^+$  dépendants du voltage dans l'effet présynaptique du DAMGO sur les neurones GABAergiques de l'ATV.

Les résultats ont montré que l'effet du DAMGO sur l'amplitude des CPSI autaptiques est bloqué en présence de 4-AP, un bloqueur des canaux  $K^+$  dépendants du voltage. Ceci suggère l'implication de canaux  $K^+$  dépendants du voltage dans l'effet présynaptique du DAMGO sur les neurones GABAergiques de l'ATV. Le bloc de l'effet du DAMGO par la 4-AP n'est pas dû à une augmentation de la libération de GABA induite par la 4-AP elle-même étant donné que nous avons montré qu'il n'y a aucune corrélation entre l'augmentation de l'amplitude du CPSI autaptique induite par la 4-AP seule et sa capacité à bloquer l'effet du DAMGO. En plus de bloquer l'effet du DAMGO sur l'amplitude des CPSI autaptiques, la 4-AP bloque également l'effet du DAMGO sur la fréquence des CPSI miniatures. Ceci suggère que la diminution de la libération de GABA induite par le DAMGO implique des canaux  $K^+$  localisés au niveau des terminaisons synaptiques. L'inhibition de la

libération de neurotransmetteurs par des récepteurs  $\mu$ -opioïdes présynaptiques impliquant des canaux  $K^+$  dépendants du voltage a déjà été observé pour les neurones GABAergiques dans le PAG (Vaughan et coll. 1997) ainsi que pour les projections glutamatergiques à l'ATV (Manzoni et Williams 1999). Une inhibition présynaptique impliquant des canaux  $K^+$  dépendants du voltage a également été observée pour le récepteur  $\kappa$ -opioïde dans l'hippocampe (Simmons et Chavkin 1996).

Comme les récepteurs opioïdes sont également connus pour activer des canaux  $K^+$  de type GIRK (Williams et coll. 1988; Wimpey et Chavkin 1991; Johnson et North 1992b; Han et coll. 1999), nous avons voulu vérifier si ce type de canal pourrait être impliqué dans l'effet du DAMGO sur les neurones GABAergiques de l'ATV. En présence de  $Ba^{2+}$ , un bloqueur des canaux  $K^+$  de type GIRK, l'effet du DAMGO sur les CPSI autaptiques n'a pas été bloqué. Ces canaux ne joueraient donc aucun rôle majeur dans l'inhibition présynaptique de la libération de GABA suite à l'activation des récepteurs  $\mu$ -opioïdes dans l'ATV.

### **3.5 RÔLE DU CANAL $K^+$ PRÉSYNAPTIQUE**

Comme il a été mentionné dans la section 1.4.2, l'activation d'un canal  $K^+$  présynaptique inhibe habituellement la libération de neurotransmetteurs en activant une conductance qui hyperpolarise la terminaison et court-circuite ainsi le potentiel d'action dans cette région du neurone. Ceci entraîne une réduction de l'entrée de

$\text{Ca}^{2+}$  dans la terminaison par les canaux  $\text{Ca}^{2+}$  dépendants du voltage et donc une diminution de l'exocytose de neurotransmetteurs. Cependant, bien que nous ayons montré qu'une partie des CPSI miniatures dans notre préparation sont dépendants de l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  par des canaux  $\text{Ca}^{2+}$  dépendants du voltage, ce type de mécanisme ne semble pas impliqué dans l'inhibition de la libération de GABA suite à l'activation des récepteurs  $\mu$ -opioïdes dans l'ATV. En effet, l'effet du DAMGO sur les CPSI miniatures persiste en présence de  $\text{Cd}^{2+}$  (à température élevée), ce qui suggère que le mécanisme d'action du DAMGO est indépendant de l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  par des canaux  $\text{Ca}^{2+}$  dépendants du voltage. Une hyperpolarisation de la terminaison ne devrait donc pas être impliquée dans l'effet du DAMGO. De plus, nous avons observé que le DAMGO inhibe l'augmentation de la fréquence des CPSI miniatures induite par l'ionomycine. Comme l'effet de l'ionomycine ne dépend pas d'un changement du potentiel membranaire et est indépendant de l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la terminaison par des canaux  $\text{Ca}^{2+}$ , il est peu probable que le mécanisme d'action du DAMGO implique une hyperpolarisation de la terminaison menant à une fermeture des canaux  $\text{Ca}^{2+}$ .

Si les canaux  $\text{K}^+$  sont impliqués dans la modulation de l'exocytose de GABA, mais pas via une hyperpolarisation de la terminaison, comment ceux-ci pourraient-ils exercer leur rôle? Plusieurs études ont montré une interaction fonctionnelle directe et régulable entre des protéines de l'appareil sécrétoire et les canaux  $\text{Ca}^{2+}$  dépendants du voltage. Par exemple, des expériences ont montré l'association de la syntaxine (Bennett et coll. 1992; Martin et coll. 1996) et de SNAP25 (Rettig et coll. 1996) avec les canaux  $\text{Ca}^{2+}$  de type N et P/Q. Ces interactions entre les canaux  $\text{Ca}^{2+}$  et l'appareil

sécrétoire serviraient à réguler la libération de neurotransmetteurs (Bennett 1997). D'autres types de canaux peuvent également interagir physiquement avec des protéines de l'appareil sécrétoire. En effet, il a été montré que le canal Cl<sup>-</sup> CFTR peut interagir avec la protéine syntaxine (Naren et coll. 1998) et que certains canaux Na<sup>+</sup> peuvent interagir avec la syntaxine (Qi et coll. 1999; Saxena et coll. 1999) ainsi que la synaptotagmine (Sampo et coll. 2000). Une interaction entre un canal K<sup>+</sup> et des protéines de l'appareil sécrétoire pourrait réguler la libération de neurotransmetteurs et expliquer la majorité de nos observations expérimentales. En effet, la 4-AP a bloqué l'effet inhibiteur du DAMGO sur l'augmentation de la libération de GABA induite par l'ionomycine. Le blocage du canal K<sup>+</sup> semble donc influencer l'efficacité de l'exocytose, ce qui suggère qu'il pourrait y avoir une interaction directe ou indirecte entre une sous-unité d'un canal K<sup>+</sup> et l'appareil sécrétoire. Ce type d'interaction entre une sous-unité du canal potassique Kv 1.1 et la protéine syntaxine a d'ailleurs été mise en évidence tout récemment (Fili et coll. 2001). De plus, il semblerait que ce type de régulation de l'appareil sécrétoire par un canal K<sup>+</sup> existe dans d'autres types neuronaux. En effet, un mécanisme impliquant une interaction entre un canal K<sup>+</sup> dépendant du voltage et des protéines de l'appareil sécrétoire a récemment été proposé pour expliquer l'inhibition présynaptique évoquée par des agonistes D<sub>2</sub> sur les neurones dopaminergiques de l'ATV (Congar et coll. 2001). Une interaction entre un canal K<sup>+</sup> dépendant du voltage et l'appareil sécrétoire pourrait également expliquer les résultats obtenus par Vaughan et coll. (1997), qui ont observé que dans le PAG, la diminution de la libération spontanée de GABA suite à l'activation de récepteurs  $\mu$ -opioïdes situés au niveau des terminaisons synaptiques est bloquée par la 4-AP et la

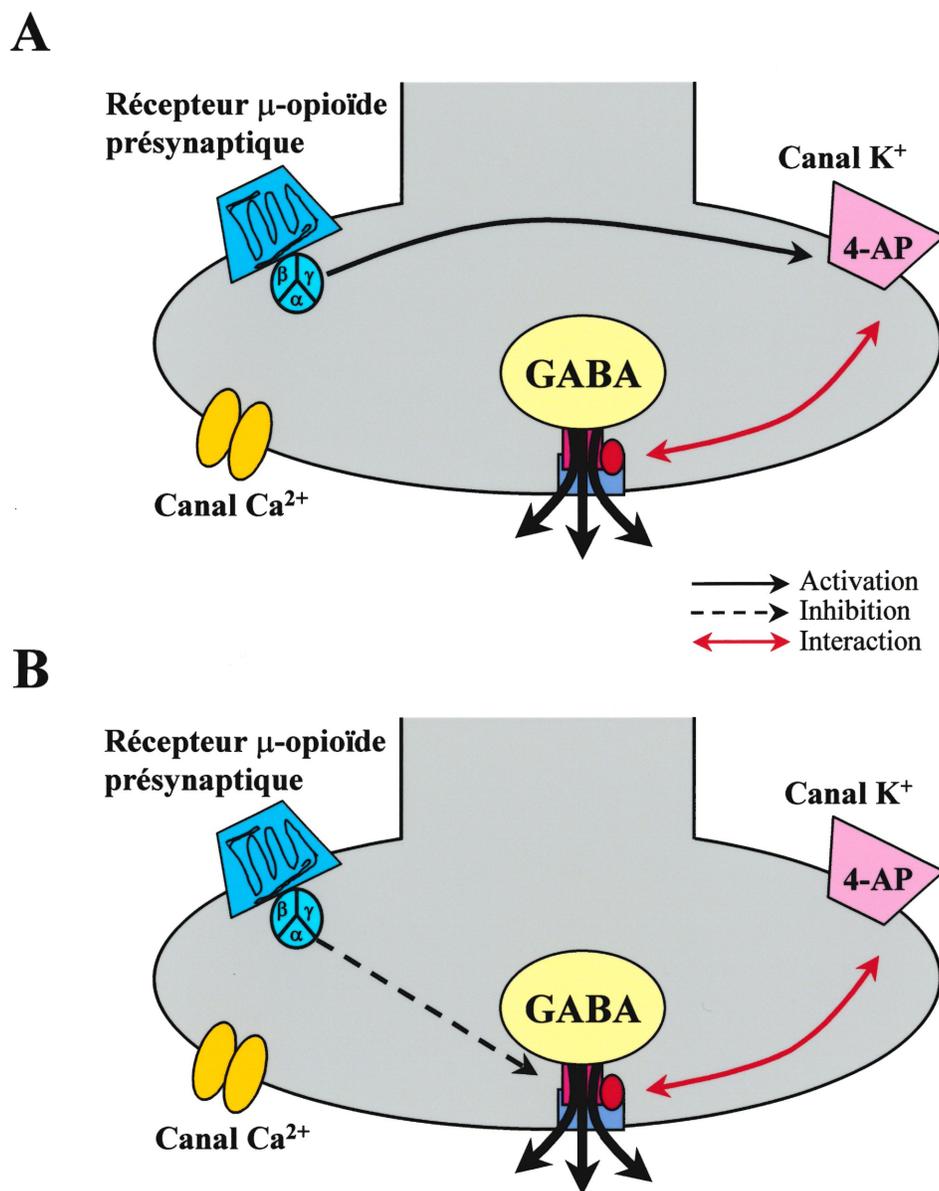
dendrotoxine, deux bloqueurs de canaux  $K^+$  dépendants du voltage, mais pas par le  $Cd^{2+}$ . Par contre, dans cette étude, la possibilité d'une modulation directe de l'appareil sécrétoire n'a pas été explorée.

Suite aux deux études présentées ici, deux modèles peuvent être suggérés pour expliquer l'inhibition de la libération de GABA suite à l'activation de récepteurs  $\mu$ -opioïdes situés au niveau des terminaisons synaptiques des neurones GABAergiques de l'ATV (figure 6).

- 1) L'activation du récepteur  $\mu$ -opioïde pourrait entraîner la modulation d'un canal  $K^+$  présynaptique dépendant du voltage et sensible à la 4-AP. La modulation de ce canal serait nécessaire pour provoquer l'inhibition de la libération de GABA et celui-ci exercerait son influence sur l'exocytose de neurotransmetteurs en interagissant directement avec une protéine de l'appareil sécrétoire (figure 6A).
- 2) Le récepteur  $\mu$ -opioïde pourrait inhiber la libération de GABA en modulant une protéine autre qu'un canal  $K^+$  et qui est impliquée dans l'exocytose de neurotransmetteurs. Un canal  $K^+$  situé au niveau de la terminaison synaptique pourrait indépendamment influencer l'appareil sécrétoire sans l'intermédiaire du récepteur  $\mu$ -opioïde. La liaison de la 4-AP à ce canal pourrait provoquer un changement de la conformation de ce dernier et ainsi perturber l'appareil sécrétoire. Cette perturbation de l'appareil sécrétoire ayant lieu en présence de 4-AP pourrait alors empêcher l'effet inhibiteur du DAMGO (figure 6B).

C'est la seconde hypothèse qui semble être la plus réaliste, car elle pourrait expliquer plus facilement nos résultats obtenus avec le RR. En effet, nous avons observé que la 4-AP ne bloque pas l'effet du DAMGO sur la libération induite par le RR (libération indépendante du  $Ca^{2+}$ ). Cette observation suggère qu'il existe une dissociation entre la cible de la 4-AP et celle du récepteur  $\mu$ -opioïde, comme le suggère le second modèle.

Comme il a été mentionné à la section 1.3.1, l'apposition directe entre les terminaisons immunoréactives pour le GABA et celles immunoréactives pour l'enképhaline dans l'ATV (Sesack et Pickel 1995) suggère une localisation présynaptique des récepteurs  $\mu$ -opioïdes sur les neurones GABAergiques. Il peut être suggéré que lors de l'activation des neurones enképhalinerigiques endogènes, l'enképhaline libérée synaptiquement sera mieux positionnée pour agir sur les récepteurs  $\mu$ -opioïdes terminaux que sur les récepteurs  $\mu$ -opioïdes somatodendritiques. Il est donc possible que les résultats observés dans la présente étude, démontrant un mécanisme impliquant des récepteurs  $\mu$ -opioïdes situés au niveau des terminaisons synaptiques, soient plus pertinents physiologiquement que les résultats ayant été décrits précédemment et suggérant un mécanisme impliquant des récepteurs  $\mu$ -opioïdes somatodendritiques (Johnson et North 1992a).



**Figure 6** : Mécanismes d'action des agonistes  $\mu$ -opioïdes dans l'ATV. Nous avons identifié deux modèles possibles pour expliquer l'inhibition de la libération de GABA suite à l'activation de récepteurs  $\mu$ -opioïdes situés au niveau des terminaisons synaptiques des neurones GABAergiques (voir texte).

### 3.6 CONSIDÉRATIONS MÉTHODOLOGIQUES

Comme il a été mentionné à la section 1.1.1, *in vivo*, les neurones GABAergiques ont pour cible les neurones dopaminergiques. Cependant, dans la présente étude, nous avons étudié le mécanisme d'action du DAMGO sur les neurones GABAergiques sans tenir compte de leur cible postsynaptique. En effet, dans les expériences effectuées à l'aide des cultures standard, le phénotype du neurone enregistré, c'est-à-dire dopaminergique ou GABAergique, était inconnu. De plus, dans les expériences effectuées avec les cultures  $\mu$ -goutte, la cible postsynaptique était le neurone enregistré, c'est-à-dire un neurone GABAergique. Nous n'avons donc pas exploré la possibilité que le mécanisme d'action du DAMGO soit différent selon que la cible postsynaptique soit un neurone GABAergique ou dopaminergique.

En ce qui concerne les enregistrements effectués à l'aide des cultures micro-goutte, nos résultats indiquent que dans ce modèle, seulement 18 des 45 neurones GABAergiques enregistrés ont répondu au DAMGO par une diminution de l'amplitude du CPSI autaptique. Il semble donc que dans ce modèle, le récepteur  $\mu$ -opioïde n'est pas exprimé par tous les neurones GABAergiques. Deux hypothèses pourraient expliquer cette observation. Premièrement, il est possible qu'il existe une hétérogénéité dans la population de neurones GABAergiques de l'ATV quant à l'expression du récepteur  $\mu$ -opioïde. Deuxièmement, il est possible que dans les cultures  $\mu$ -goutte, un certain support trophique nécessaire à l'expression des récepteurs  $\mu$ -opioïdes par les neurones GABAergiques soit absent. Ceci pourrait se

traduire par un niveau d'expression hétérogène du récepteur  $\mu$ -opioïdes. Il serait possible de tester ces hypothèses en utilisant la technique de l'hybridation *in situ*. Cette technique permet la détection de molécules d'ARNm dans leur cellule d'origine. Les molécules sont détectées à l'aide de sondes radioactives d'ARN ou d'ADN capables de former un hybride avec l'ARNm (Alberts et coll. 1994). Il serait possible d'utiliser une telle technique pour déterminer si une partie seulement des cellules GABAergiques isolées sur les cultures micro-goutte expriment l'ARNm du récepteur  $\mu$ -opioïde, ce qui supporterait la première hypothèse, ou si toutes les cellules GABAergiques isolées sont marquées (mais à des niveaux différents), ce qui supporterait la seconde hypothèse.

Enfin, l'identification du mécanisme d'action du DAMGO repose en grande partie sur l'interprétation d'expériences d'enregistrement de CPSI miniatures. Bien qu'il soit possible que ces événements soient modulés différemment des CPSI évoqués par des potentiels d'action, il semble que ces deux types d'événements sont habituellement régulés de la même manière (Bouron 2001). Il est donc fort probable que le mécanisme identifié dans cette étude soit applicable à la libération de GABA évoquée par des potentiels d'action et qu'il constitue un mécanisme physiologiquement important.

**CONCLUSION ET  
PERSPECTIVES**

À la lumière de nos observations, nous pouvons conclure qu'en plus des effets somatodendritiques déjà décrits, l'effet des agonistes  $\mu$ -opioïdes dans l'ATV implique l'activation de récepteurs  $\mu$ -opioïdes situés au niveau des terminaisons synaptiques des neurones GABAergiques intrinsèques à cette structure. La diminution de la libération de GABA suite à l'activation de ces récepteurs fait appel à un mécanisme agissant en aval de l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la terminaison présynaptique. En effet, nos résultats suggèrent que l'activation du récepteur  $\mu$ -opioïde influence directement l'efficacité de l'appareil sécrétoire au niveau des terminaisons synaptiques des neurones GABAergiques. De plus, nos résultats suggèrent que la modulation de la libération de GABA par les récepteurs  $\mu$ -opioïdes serait sous l'influence d'un nouveau type de mécanisme de régulation impliquant un canal  $\text{K}^+$  dépendant du voltage, sans toutefois que celui-ci exerce son effet en hyperpolarisant la terminaison. D'autres expériences seront nécessaires à l'identification de la nature exacte de ce nouveau mécanisme.

Suite à la présente étude, différentes expériences devront être complétées pour poursuivre ce travail. Nous avons montré l'influence d'un canal  $\text{K}^+$  dépendant du voltage sur l'effet du DAMGO. Par contre, dans la présente étude, nous n'avons pas déterminé l'identité moléculaire exacte de ce canal. Ceci pourrait être fait à l'aide de marquages immunofluorescents, en utilisant des anticorps dirigés contre différentes sous-unités des canaux  $\text{K}^+$  dépendants du voltage, par hybridation *in situ*, à l'aide de sondes dirigées contre l'ARNm de différentes sous-unités de canaux  $\text{K}^+$ , ou par PCR à partir de cellules uniques. Il serait également peut-être possible de déterminer

l'identité du canal par une approche pharmacologique, à l'aide d'antagonistes spécifiques pour différents canaux  $K^+$ . Suite à l'identification du canal  $K^+$  impliqué, la démonstration de l'existence d'une interaction entre celui-ci et des protéines de l'appareil sécrétoire serait cruciale pour une meilleure compréhension des résultats obtenus dans cette étude.

Il serait également intéressant de déterminer quels sont les seconds messagers impliqués dans la diminution de la libération de GABA suite à l'activation des récepteurs  $\mu$ -opioïdes dans l'ATV. Il a été montré que la voie de l'acide arachidonique et des lipoxgénases serait impliquée dans l'inhibition présynaptique de l'exocytose de neurotransmetteurs suite à l'activation du récepteur  $\mu$ -opioïde dans le PAG (Vaughan et al. 1997) et l'ATV (Manzoni et Williams 1999). Comme l'effet du DAMGO dans ces deux régions semble impliquer l'activation d'un canal  $K^+$  dépendant du voltage, il serait intéressant de vérifier si la voie identifiée par ces auteurs pourrait être responsable de l'inhibition de la libération de GABA dans l'ATV.

Finalement, il serait intéressant de confirmer les résultats obtenus à l'aide de notre modèle de culture cellulaire dans un modèle plus complexe, c'est-à-dire des tranches d'ATV. Ce type d'expérience, par contre, poserait quelques difficultés. En effet, il serait difficile de distinguer les CPSI provenant de neurones GABAergiques intrinsèques à l'ATV des CPSI évoqués par des axones provenant d'autres structures externes à l'ATV. Pour éviter un tel problème, il serait nécessaire d'effectuer des

expériences de double-patch (enregistrement pairés), ce qui rendrait la tâche plus compliquée.

En conclusion, bien qu'il s'agisse d'un modèle simplifié qui possède certaines limitations, la culture neuronale nous a permis de clarifier les bases cellulaires de l'effet des agonistes  $\mu$ -opioïdes dans l'ATV. Les résultats obtenus dans le cadre de cette étude n'ont pas d'application thérapeutique à court terme. Toutefois, ceux-ci permettent une meilleure compréhension de la régulation des interneurons GABAergiques par le récepteur  $\mu$ -opioïde dans l'ATV. Ces nouvelles connaissances pourraient donc, à long terme, fournir des pistes intéressantes pour l'élaboration d'agents pharmacologiques ciblés à cette population de neurones et potentiellement applicables au traitement des maladies mentales et des problèmes de dépendance aux drogues d'abus. Par exemple, comme il est connu que la morphine agit sur les récepteurs  $\mu$ -opioïdes, il serait envisageable d'élaborer une classe d'agents thérapeutiques qui pourraient contrer les effets de dépendance et de tolérance engendrés par cette drogue en ciblant certaines composantes des mécanismes cellulaires responsables de l'effet des opioïdes dans l'ATV. L'apport de nouvelles informations par le biais d'expériences supplémentaires telles que celles mentionnées ci-haut sera cependant essentiel dans le but éventuel d'atteindre un tel objectif.

## RÉFÉRENCES

Akil H, Watson SJ, Young E, Lewis ME, Khachaturian H, Walker JM. Endogenous opioids: biology and function. *Annu Rev Neurosci* 7: 223-55, 1984.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Molecular biology of the cell*, 3rd edition. New York: Garland Publishing Inc. 1994.

Asher P, Nowak L. Quisqualate- and kainate-activated channels in mouse central neurones in culture. *J Physiol (Lond)* 399: 227-245, 1988.

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

Beckstead RM. An autoradiographic examination of corticocortical and subcortical projections of the mediodorsal-projection (prefrontal) cortex in the rat. *J Comp Neurol* 184: 43-62, 1979.

Beeler TJ, Jona I, Martonosi A. The effect of ionomycin on calcium fluxes in sarcoplasmic reticulum vesicles and liposomes. *J Biol Chem* 254: 6229-31, 1979.

Bell DS. The experimental reproduction of amphetamine psychosis. *Arch Gen Psychiatry* 29: 35-40, 1973.

Bennett MK. Ca<sup>2+</sup> and the regulation of neurotransmitter secretion. *Curr Opin Neurobiol* 7: 316-22, 1997.

Bennett MK, Calakos N, Scheller RH. Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones. *Science* 257: 255-9, 1992.

Bernard J, Lahsaini A, Baudry M, Massicotte G. The phospholipase A2 inhibitor bromophenacyl bromide prevents the depolarization-induced increase in [3H]AMPA binding in rat brain synaptoneuroosomes. *Brain Res* 628: 340-4, 1993.

Boehm S, Betz H. Somatostatin inhibits excitatory transmission at rat hippocampal synapses via presynaptic receptors. *J Neurosci* 17: 4066-4075, 1997.

Bouron A. Modulation of spontaneous quantal release of neurotransmitters in the hippocampus. *Prog Neurobiol* 63: 613-35, 2001.

Bouron A, Reuter H. Muscarinic stimulation of synaptic activity by protein kinase C is inhibited by adenosine in cultured hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 12224-9, 1997.

Boyd IA, Martin AR. The endplate potentials in mammalian muscle. *J Physiol (Lond)* 132: 74-91, 1956.

Bozarth MA, Wise RA. Intracranial self-administration of morphine into the ventral tegmental area in rats. *Life Sci* 28: 551-555, 1981.

Broekkamp CL, Phillips AG, Cools AR. Stimulant effects of enkephalin microinjection into the dopaminergic A10 area. *Nature* 278: 560-562, 1979.

Buchhalter JR, Dichter MA. Neurons. Dans: Boulton AA, Baker GB, Walz W, éditeurs. *Practical cell culture techniques*. New Jersey: The Humana Press Inc. 241-264, 1992.

Calakos N, Bennett MK, Peterson KE, Scheller RH. Protein-protein interactions contributing to the specificity of intracellular vesicular trafficking. *Science* 263: 1146-9, 1994.

Capogna M, Gähwiler BH, Thompson SM. Mechanism of mu-opioid receptor-mediated presynaptic inhibition in the rat hippocampus in vitro. *J Physiol (Lond)* 470: 539-558, 1993.

Capogna M, Gähwiler BH, Thompson SM. Presynaptic enhancement of inhibitory synaptic transmission by protein kinases A and C in the rat hippocampus in vitro. *J Neurosci* 15: 1249-60, 1995.

Capogna M, Gähwiler BH, Thompson SM. Presynaptic inhibition of calcium-dependent and -independent release elicited with ionomycin, gadolinium, and alpha-latrotoxin in the hippocampus. *J Neurophysiol* 75: 2017-2028, 1996.

Cardozo DL. Midbrain dopaminergic neurons from postnatal rat in long-term primary culture. *Neuroscience* 56: 409-421, 1993.

Carr DB, Sesack SR. GABA-containing neurons in the rat ventral tegmental area project to the prefrontal cortex. *Synapse* 38: 114-23, 2000.

Chiodo LA, Bunney BS. Typical and atypical neuroleptics: differential effects of chronic administration on the activity of A9 and A10 midbrain dopaminergic neurons. *J Neurosci* 3: 1607-19, 1983.

Christie MJ, Bridge S, James LB, Beart PM. Excitotoxin lesions suggest an aspartatergic projection from rat medial prefrontal cortex to ventral tegmental area. *Brain Res* 333: 169-72, 1985.

Cohen GA, Doze VA, Madison DV. Opioid inhibition of GABA release from presynaptic terminals of rat hippocampal interneurons. *Neuron* 9: 325-335, 1992.

Congar P, Trudeau LE. On the mechanism of modulation of glutamate release by presynaptic dopamine receptors in dopaminergic neurons of the ventral tegmental area. *Soc Neurosci Abstracts* 25: 1258, 1999.

Congar P, Bergevin A, Trudeau LE. Modulation of neurotransmitter release by presynaptic dopamine receptors in dopaminergic neurons: implication of a mechanism downstream of calcium influx. *J Neurophysiol*, 2002 (sous presse).

Connor M, Christie MD. Opioid receptor signalling mechanisms. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26: 493-9, 1999.

Dahlstrom A, Fuxe K. Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. *Acta Physiol Scand* 62 (Suppl. 232): 1-55, 1964.

Devine DP, Leone P, Pocock D, Wise RA. Differential involvement of ventral tegmental mu, delta and kappa opioid receptors in modulation of basal mesolimbic dopamine release: in vivo microdialysis studies. *J Pharmacol Exp Ther* 266: 1236-1246, 1993.

Devine DP, Wise RA. Self-administration of morphine, DAMGO, and DPDPE into the ventral tegmental area of rats. *J Neurosci* 14: 1978-1984, 1994.

Dhawan BN, Cesselin F, Raghurir R, Reisine T, Bradley PB, Portoghese PS, Hamon M. International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioid receptors. *Pharmacol Rev* 48: 567-92, 1996.

Di Chiara G. In-vivo brain dialysis of neurotransmitters. *Trends Pharmacol Sci* 11: 116-21, 1990.

Dilts RP, Kalivas PW. Autoradiographic localization of mu-opioid and neurotensin receptors within the mesolimbic dopamine system. *Brain Res* 488: 311-327, 1989.

Fallon JH, Leslie FM. Distribution of dynorphin and enkephalin peptides in the rat brain. *J Comp Neurol* 249: 293-336, 1986.

Fatt P, Katz B. Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. *J Physiol (Lond)* 117: 109-128, 1952.

Fili O, Michaelievski I, Bledi Y, Chikvashvili D, Singer-Lahat D, Boshwitz H, Linial M, Lotan I. Direct interaction of a brain voltage-gated K<sup>+</sup> channel with syntaxin 1A: functional impact on channel gating. *J Neurosci* 21: 1964-74, 2001.

Fonnum F, Walaas I, Iversen E. Localization of GABAergic, cholinergic and aminergic structures in the mesolimbic system. *J Neurochem* 29: 221-30, 1977.

Fujita Y, Sasaki T, Fukui K, Kotani H, Kimura T, Hata Y, Sudhof TC, Scheller RH, Takai Y. Phosphorylation of Munc-18/n-Sec1/rbSec1 by protein kinase C: its implication in regulating the interaction of Munc-18/n-Sec1/rbSec1 with syntaxin. *J Biol Chem* 271: 7265-8, 1996.

Fukuda K, Kato S, Morikawa H, Shoda T, Mori K. Functional coupling of the delta-, mu-, and kappa-opioid receptors to mitogen-activated protein kinase and arachidonate release in Chinese hamster ovary cells. *J Neurochem* 67: 1309-16, 1996.

Fykse EM. Depolarization of cerebellar granule cells increases phosphorylation of rabphilin-3A. *J Neurochem* 71: 1661-9, 1998.

Gibb AJ, Edwards FA. Patch clamp recordings from cells in sliced tissues. Dans: Ogden D, éditeur. *Microelectrode Techniques*, 2nd edition. London: The company of biologists limited. 255-274, 1994.

Goldstein M, Deutch AY. Dopaminergic mechanisms in the pathogenesis of schizophrenia. *FASEB J* 6: 2413-21, 1992.

Grace AA. Phasic versus tonic dopamine release and the modulation of dopamine system responsivity: a hypothesis for the etiology of schizophrenia. *Neuroscience* 41: 1-24, 1991.

Gray EG, Whittaker VP. The isolation of synaptic vesicles from the central nervous system. *J Physiol* 153: 35-37, 1960.

Grenhoff J, Nisell M, Ferre S, Aston-Jones G, Svensson TH. Noradrenergic modulation of midbrain dopamine cell firing elicited by stimulation of the locus coeruleus in the rat. *J Neural Transm Gen Sect* 93: 11-25, 1993.

Gysling K, Wang RY. Morphine-induced activation of A10 dopamine neurons in the rat. *Brain Res* 277: 119-127, 1983.

Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391: 85-100, 1981.

Han SH, Cho YW, Kim CJ, Min BI, Rhee JS, Akaike N. Mu-opioid agonist-induced activation of G-protein-coupled inwardly rectifying potassium current in rat periaqueductal gray neurons. *Neuroscience* 90: 209-219, 1999.

Hebb CO, Whittaker VP. Intracellular distributions of acetylcholine and choline acetylase. *J Physiol* 142: 187-196, 1958.

Henderson G, McKnight AT. The orphan opioid receptor and its endogenous ligand--nociceptin/orphanin FQ. *Trends Pharmacol Sci* 18: 293-300, 1997.

Hescheler J, Rosenthal W, Trautwein W, Schultz G. The GTP-binding protein, Go, regulates neuronal calcium channels. *Nature* 325: 445-7, 1987.

Hille B. *Ionic channels of excitable membranes*, 2nd edition. Massachusetts: Sinauer associates Inc. 1992.

Isaac JT, Nicoll RA, Malenka RC. Evidence for silent synapses: implications for the expression of LTP. *Neuron* 15: 427-34, 1995.

Jin W, Lee NM, Loh HH, Thayer SA. Dual excitatory and inhibitory effects of opioids on intracellular calcium in neuroblastoma x glioma hybrid NG108-15 cells. *Mol Pharmacol* 42: 1083-9, 1992.

Johnson SW, North RA. Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *J Neurosci* 12: 483-488, 1992a.

Johnson SW, North RA. Two types of neurone in the rat ventral tegmental area and their synaptic inputs. *J Physiol (Lond)* 450: 455-468, 1992b.

Kalivas PW. Neurotransmitter regulation of dopamine neurons in the ventral tegmental area. *Brain Res Brain Res Rev* 18: 75-113, 1993.

Kalivas PW, Churchill L, Klitenick MA. GABA and enkephalin projection from the nucleus accumbens and ventral pallidum to the ventral tegmental area. *Neuroscience* 57: 1047-60, 1993.

Kalivas PW, Duffy P. Effect of acute and daily neurotensin and enkephalin treatments on extracellular dopamine in the nucleus accumbens. *J Neurosci* 10: 2940-2949, 1990.

Katz B. *The Release of Neural Transmitter Substances*. Liverpool: Liverpool University Press. 1969.

Kawagoe KT, Zimmerman JB, Wightman RM. Principles of voltammetry and microelectrode surface states. *J Neurosci Methods* 48: 225-40, 1993.

Kelley AE, Stinus L, Iversen SD. Interactions between D-ala-met-enkephalin, A10 dopaminergic neurones, and spontaneous behaviour in the rat. *Behav Brain Res* 1: 3-24, 1980.

Kieffer BL. Opioids: first lessons from knockout mice. *Trends Pharmacol Sci* 20: 19-26, 1999.

Klitenick MA, DeWitte P, Kalivas PW. Regulation of somatodendritic dopamine release in the ventral tegmental area by opioids and GABA: an in vivo microdialysis study. *J Neurosci* 12: 2623-2632, 1992.

Knapp RJ, Malatynska E, Collins N, Fang L, Wang JY, Hruby VJ, Roeske WR, Yamamura HI. Molecular biology and pharmacology of cloned opioid receptors. *FASEB J* 9: 516-25, 1995.

Koob GF, Le Moal M. Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science* 278: 52-58, 1997.

Koyama S, Kubo C, Rhee JS, Akaike N. Presynaptic serotonergic inhibition of GABAergic synaptic transmission in mechanically dissociated rat basolateral amygdala neurons. *J Physiol (Lond)* 518 ( Pt 2): 525-538, 1999.

Liao D, Hessler NA, Malinow R. Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced LTP in CA1 region of hippocampal slice. *Nature* 375: 400-4, 1995.

Liley AW. An investigation of spontaneous activity at the neuromuscular junction of the rat. *J Physiol (Lond)* 132: 650-666, 1956.

Lin RC, Scheller RH. Mechanisms of synaptic vesicle exocytosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16: 19-49, 2000.

Lindvall O, Bjorklund A, Moore RY, Stenevi U. Mesencephalic dopamine neurons projecting to neocortex. *Brain Res* 81: 325-31, 1974.

Lupica CR. Delta and mu enkephalins inhibit spontaneous GABA-mediated IPSCs via a cyclic AMP-independent mechanism in the rat hippocampus. *J Neurosci* 15: 737-749, 1995.

Malenka RC, Nicoll RA. Silent synapses speak up. *Neuron* 19: 473-6, 1997.

Malgaroli A, Tsien RW. Glutamate-induced long-term potentiation of the frequency of miniature synaptic currents in cultured hippocampal neurons. *Nature* 357: 134-9, 1992.

Manzoni OJ, Williams JT. Presynaptic regulation of glutamate release in the ventral tegmental area during morphine withdrawal. *J Neurosci* 19: 6629-6636, 1999.

Martin F, Salinas E, Vazquez J, Soria B, Reig JA. Inhibition of insulin release by synthetic peptides shows that the H3 region at the C-terminal domain of syntaxin-1 is crucial for Ca(2+)- but not for guanosine 5'-[gamma-thio]triphosphate-induced secretion. *Biochem J* 320 ( Pt 1): 201-5, 1996.

Martin WR, Eades CG, Thompson JA, Huppler RE, Gilbert PE. The effects of morphine- and nalorphine- like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *J Pharmacol Exp Ther* 197: 517-32, 1976.

Matsuda Y, Fujimura K. Action of habenular efferents on ventral tegmental area neurons studied in vitro. *Brain Res Bull* 28: 743-9, 1992.

Matthes HW, Maldonado R, Simonin F, Valverde O, Slowe S, Kitchen I, Befort K, Dierich A, Le Meur M, Dolle P, Tzavara E, Hanoune J, Roques BP, Kieffer BL. Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. *Nature* 383: 819-23, 1996.

Matthews G. Neurotransmitter release. *Annu Rev Neurosci* 19: 219-33, 1996.

McBride WJ, Murphy JM, Ikemoto S. Localization of brain reinforcement mechanisms: intracranial self- administration and intracranial place-conditioning studies. *Behav Brain Res* 101: 129-52, 1999.

McMahon HT, Nicholls DG. The bioenergetics of neurotransmitter release. *Biochim Biophys Acta* 1059: 243-64, 1991.

Meunier JC, Mollereau C, Toll L, Suaudeau C, Moisand C, Alvinerie P, Butour JL, Guillemot JC, Ferrara P, Monsarrat B, Mazarguil H, Vassart G, Parmentier M, Costentin J. Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor- like ORL1 receptor. *Nature* 377: 532-5, 1995.

Miles R, Poncer JC. Paired recordings from neurones. *Curr Opin Neurobiol* 6: 387-94, 1996.

Miller RJ. Presynaptic receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38: 201-227, 1998.

Mollereau C, Parmentier M, Mailleux P, Butour JL, Moisand C, Chalon P, Caput D, Vassart G, Meunier JC. ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. *FEBS Lett* 341: 33-8, 1994.

Mugnaini E, Oertel WH. An atlas of the distribution of GABAergic neurons and terminals in the rat CNS as revealed by GAD immunohistochemistry. Dans: Bjorklund A, Hokfelt T, éditeurs. Handbook of chemical neuroanatomy, vol. 4: GABA and neuropeptides in the CNS, Part I. New York: Elsevier. 436-608, 1985.

Muller W, Hallermann S, Swandulla D. Opioidergic modulation of voltage-activated K<sup>+</sup> currents in magnocellular neurons of the supraoptic nucleus in rat. *J Neurophysiol* 81: 1617-1625, 1999.

Nagai T, McGeer PL, McGeer EG. Distribution of GABA-T-intensive neurons in the rat forebrain and midbrain. *J Comp Neurol* 218: 220-38, 1983.

Naren AP, Quick MW, Collawn JF, Nelson DJ, Kirk KL. Syntaxin 1A inhibits CFTR chloride channels by means of domain-specific protein-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 10972-7, 1998.

Neher E, Sakmann B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260: 799-802, 1976.

Nicholls DG. Release of glutamate, aspartate, and gamma-aminobutyric acid from isolated nerve terminals. *J Neurochem* 52: 331-41, 1989.

Nielander HB, Onofri F, Valtorta F, Schiavo G, Montecucco C, Greengard P, Benfenati F. Phosphorylation of VAMP/synaptobrevin in synaptic vesicles by endogenous protein kinases. *J Neurochem* 65: 1712-20, 1995.

North RA, Williams JT, Surprenant A, Christie MJ. Mu and delta receptors belong to a family of receptors that are coupled to potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 5487-91, 1987.

Oakman SA, Faris PL, Kerr PE, Cozzari C, Hartman BK. Distribution of pontomesencephalic cholinergic neurons projecting to substantia nigra differs significantly from those projecting to ventral tegmental area. *J Neurosci* 15: 5859-69, 1995.

Olds ME, Olds J. Approach-avoidance analysis of rat diencephalon. *J Comp Neurol* 120: 259-295, 1963.

Oyler GA, Higgins GA, Hart RA, Battenberg E, Billingsley M, Bloom FE, Wilson MC. The identification of a novel synaptosomal-associated protein, SNAP-25, differentially expressed by neuronal subpopulations. *J Cell Biol* 109: 3039-52, 1989.

Pasternak GW. Insights into mu opioid pharmacology the role of mu opioid receptor subtypes. *Life Sci* 68: 2213-9, 2001.

Phillips AG, LePiane FG. Reinforcing effects of morphine microinjection into the ventral tegmental area. *Pharmacol Biochem Behav* 12: 965-968, 1980.

Phillips AG, LePiane FG, Fibiger HC. Dopaminergic mediation of reward produced by direct injection of enkephalin into the ventral tegmental area of the rat. *Life Sci* 33: 2505-2511, 1983.

Phillipson OT. The cytoarchitecture of the interfascicular nucleus and ventral tegmental area of Tsai in the rat. *J Comp Neurol* 187: 85-98, 1979.

Qi J, Peters KW, Liu C, Wang JM, Edinger RS, Johnson JP, Watkins SC, Frizzell RA. Regulation of the amiloride-sensitive epithelial sodium channel by syntaxin 1A. *J Biol Chem* 274: 30345-8, 1999.

Raiteri L, Raiteri M. Synaptosomes still viable after 25 years of superfusion. *Neurochem Res* 25: 1265-74, 2000.

Reinscheid RK, Nothacker HP, Bourson A, Ardati A, Henningsen RA, Bunzow JR, Grandy DK, Langen H, Monsma FJ Jr, Civelli O. Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioidlike G protein- coupled receptor. *Science* 270: 792-4, 1995.

Rekling JC. Effects of met-enkephalin on GABAergic spontaneous miniature IPSPs in organotypic slice cultures of the rat hippocampus. *J Neurosci* 13: 1954-1964, 1993.

Rettig J, Sheng ZH, Kim DK, Hodson CD, Snutch TP, Catterall WA. Isoform-specific interaction of the  $\alpha 1A$  subunits of brain  $Ca^{2+}$  channels with the presynaptic proteins syntaxin and SNAP-25. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 7363-8, 1996.

Risinger C, Bennett MK. Differential phosphorylation of syntaxin and synaptosome-associated protein of 25 kDa (SNAP-25) isoforms. *J Neurochem* 72: 614-24, 1999.

Robitaille R, Adler EM, and Charlton MP. Strategic location of calcium channels at transmitter release sites of frog neuromuscular synapses. *Neuron* 5: 773-779, 1990.

Sakmann B, Bormann J, Hamill OP. Ion transport by single receptor channels. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 48 Pt 1: 247-257, 1983.

Sampo B, Tricaud N, Leveque C, Seagar M, Couraud F, Dargent B. Direct interaction between synaptotagmin and the intracellular loop I- II of neuronal voltage-sensitive sodium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 3666-71, 2000.

Saxena S, Quick MW, Tousson A, Oh Y, Warnock DG. Interaction of syntaxins with the amiloride-sensitive epithelial sodium channel. *J Biol Chem* 274: 20812-7, 1999.

Scholz KP, Miller RJ. Inhibition of quantal transmitter release in the absence of calcium influx by a G protein-linked adenosine receptor at hippocampal synapses. *Neuron* 8: 1139-1150, 1992.

Schwartz RD, Skolnick P, Hollingsworth EB, Paul SM. Barbiturate and picrotoxin-sensitive chloride efflux in rat cerebral cortical synaptoneuroosomes. FEBS Lett 175: 193-6, 1984.

Sciancalepore M, Savic N, Gyori J, Cherubini E. Facilitation of miniature GABAergic currents by ruthenium red in neonatal rat hippocampal neurons. J Neurophysiol 80: 2316-2322, 1998.

Seeman P, Lee T, Chau-Wong M, Wong K. Antipsychotic drug doses and neuroleptic/dopamine receptors. Nature 261: 717-9, 1976.

Segev I. Computer study of presynaptic inhibition controlling the spread of action potentials into axonal terminals. J Neurophysiol 63: 987-98, 1990.

Sesack SR, Pickel VM. Ultrastructural relationships between terminals immunoreactive for enkephalin, GABA, or both transmitters in the rat ventral tegmental area. Brain Res 672: 261-275, 1995.

Shahar A, de Vellis J, Vernadakis A, Haber B, éditeurs. A dissection and tissue culture manual of the nervous system. New York: Alan R. Liss. 1989.

Sharma SK, Klee WA, Nirenberg M. Opiate-dependent modulation of adenylate cyclase. Proc Natl Acad Sci U S A 74: 3365-9, 1977.

Shimazaki Y, Nishiki T, Omori A, Sekiguchi M, Kamata Y, Kozaki S, Takahashi M. Phosphorylation of 25-kDa synaptosome-associated protein. Possible involvement in protein kinase C-mediated regulation of neurotransmitter release. *J Biol Chem* 271: 14548-53, 1996.

Simmons ML, Chavkin C.  $\kappa$ -Opioid receptor activation of a dendrotoxin-sensitive potassium channel mediates presynaptic inhibition of mossy fiber neurotransmitter release. *Mol Pharmacol* 50: 80-85, 1996.

Stahl S. *Essentials psychopharmacology: neuroscientific basis and practical applications*. Cambridge: CUP. 1997.

Stanford IM, Cooper AJ. Presynaptic mu and delta opioid receptor modulation of GABAA IPSCs in the rat globus pallidus in vitro. *J Neurosci* 19: 4796-4803, 1999.

Stevens CF, Sullivan JM. Regulation of the readily releasable vesicle pool by protein kinase C. *Neuron* 21: 885-93, 1998.

Strader CD, Fong TM, Tota MR, Underwood D, Dixon RA. Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annu Rev Biochem* 63: 101-32, 1994.

Sugita S, Johnson SW, North RA. Synaptic inputs to GABAA and GABAB receptors originate from discrete afferent neurons. *Neurosci Lett* 134: 207-11, 1992.

Sulzer D, Joyce MP, Lin L, Geldwert D, Haber SN, Hattori T, Rayport S. Dopamine neurons make glutamatergic synapses in vitro. *J Neurosci* 18: 4588-4602, 1998.

Surprenant A, Shen KZ, North RA, Tatsumi H. Inhibition of calcium currents by noradrenaline, somatostatin and opioids in guinea-pig submucosal neurones. *J Physiol* 431: 585-608, 1990.

Suter KJ, Smith BN, Dudek FE. Electrophysiological recording from brain slices. *Methods* 18: 86-90, 1999.

Tong G, Malenka RC, Nicoll RA. Long-term potentiation in cultures of single hippocampal granule cells: a presynaptic form of plasticity. *Neuron* 16: 1147-57, 1996.

Trimble WS, Cowan DM, Scheller RH. VAMP-1: a synaptic vesicle-associated integral membrane protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 4538-42, 1988.

Trudeau LE, Doyle RT, Emery DG, Haydon PG. Calcium-independent activation of the secretory apparatus by ruthenium red in hippocampal neurons: a new tool to assess modulation of presynaptic function. *J Neurosci* 16: 46-54, 1996a.

Trudeau LE, Emery DG, Haydon PG. Direct modulation of the secretory machinery underlies PKA-dependent synaptic facilitation in hippocampal neurons. *Neuron* 17: 789-797, 1996b.

Trudeau LE, Fang Y, Haydon PG. Modulation of an early step in the secretory machinery in hippocampal nerve terminals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 7163-7168, 1998.

Tsai C. The optic tracts and centers of the opossum, *Didelphis virginiana*. *J Comp Neurol* 39: 173-216. 25.

Ungerstedt U. Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain. *Acta Physiol Scand Suppl* 367: 1-48, 1971.

Van Bockstaele EJ, Pickel VM. GABA-containing neurons in the ventral tegmental area project to the nucleus accumbens in rat brain. *Brain Res* 682: 215-21, 1995.

Vaughan CW, Christie MJ. Presynaptic inhibitory action of opioids on synaptic transmission in the rat periaqueductal grey in vitro. *J Physiol (Lond)* 498 ( Pt 2): 463-472, 1997.

Vaughan CW, Ingram SL, Connor MA, Christie MJ. How opioids inhibit GABA-mediated neurotransmission. *Nature* 390: 611-614, 1997.

Verona M, Zanotti S, Schafer T, Racagni G, Popoli M. Changes of synaptotagmin interaction with t-SNARE proteins in vitro after calcium/calmodulin-dependent phosphorylation. *J Neurochem* 74: 209-21, 2000.

Vertes RP. A PHA-L analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 313: 643-68, 1991.

Walaas I, Fonnum F. Biochemical evidence for gamma-aminobutyrate containing fibres from the nucleus accumbens to the substantia nigra and ventral tegmental area in the rat. *Neuroscience* 5: 63-72, 1980.

Wallace DM, Magnuson DJ, Gray TS. The amygdalo-brainstem pathway: selective innervation of dopaminergic, noradrenergic and adrenergic cells in the rat. *Neurosci Lett* 97: 252-8, 1989.

Whittaker VP. The morphology of fractions of rat forebrain synaptosomes separated on continuous sucrose density gradients. *Biochem J* 106: 412-7, 1968.

Whittaker VP. Thirty years of synaptosome research. *J Neurocytol* 22: 735-42, 1993.

Williams JT, North RA, Tokimasa T. Inward rectification of resting and opiate-activated potassium currents in rat locus coeruleus neurons. *J Neurosci* 8: 4299-4306, 1988.

Wimpey TL, Chavkin C. Opioids activate both an inward rectifier and a novel voltage-gated potassium conductance in the hippocampal formation. *Neuron* 6: 281-289, 1991.

Wise RA. Addictive drugs and brain stimulation reward. *Annu Rev Neurosci* 19: 319-340, 1996.

Wu LG, Saggau P. Adenosine inhibits evoked synaptic transmission primarily by reducing presynaptic calcium influx in area CA1 of hippocampus. *Neuron* 12: 1139-1148, 1994.

Yamamoto C, McIlwain H. Electrical activities in thin sections from the mammalian brain maintained in chemically-defined media in vitro. *J Neurochem* 13: 1333-43, 1966.

Yawo H, Chuhma N. Preferential inhibition of omega-conotoxin-sensitive presynaptic Ca<sup>2+</sup> channels by adenosine autoreceptors. *Nature* 365: 256-258, 1993.

Yim CY, Mogenson GJ. Effect of picrotoxin and nipecotic acid on inhibitory response of dopaminergic neurons in the ventral tegmental area to stimulation of the nucleus accumbens. *Brain Res* 199: 466-73, 1980.

Zadina JE, Hackler L, Ge LJ, Kastin AJ. A potent and selective endogenous agonist for the mu-opiate receptor. *Nature* 386: 499-502, 1997.

Zahm DS. The ventral striatopallidal parts of the basal ganglia in the rat--II. Compartmentation of ventral pallidal efferents. *Neuroscience* 30: 33-50, 1989.