

Université de Montréal

**Rôle des récepteurs glutamatergiques dans l'activité  
épileptiforme des interneurons inhibiteurs de l'hippocampe**

par

Nathalie T Sanon

Département de Physiologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Ph.D  
en Sciences Neurologiques

Décembre, 2010

© Nathalie T Sanon, 2010

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Rôle des récepteurs glutamatergiques dans l'activité  
épileptiforme des interneurons inhibiteurs de l'hippocampe**

présentée par :  
Nathalie T Sanon

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Vincent Castellucci, président-rapporteur et représentant du doyen

Dr. Jean-Claude Lacaille, directeur de recherche

Dr. Lionel Carmant, co-directeur

Dr. Réjean Dubuc, membre du jury

Dr. Katalin Toth, examinateur externe

## Résumé

Les patients atteints d'épilepsie du lobe temporal (TLE) ainsi que les rats injectés à l'acide kaïnique (KA) exhibent des patrons pathophysiologiques similaires de crises, de sclérose de l'hippocampe et de perte de certains types neuronaux. Parmi les cellules atteintes dans le modèle KA du TLE on retrouve certains interneurons inhibiteurs du CA1. En effet, certains interneurons des couches *oriens* et *alveus* (O/A-IN) meurent suite à une injection de KA chez le rat, contrairement aux interneurons à la bordure des couches *radiatum* et *lacunosum/moleculare* (R/LM-IN) de la même région. Bien que cette perte soit empêchée par des antagonistes des récepteurs glutamatergiques métabotropes de groupe I (mGluR1/5), la cause de cette perte sélective des O/A-INs reste à être précisée. Au cours des travaux de cette thèse, nous avons effectué des enregistrements de patch-clamp en configuration cellule-entière en modes courant- et voltage-imposé couplés à l'imagerie calcique pour étudier les causes de la vulnérabilité sélective des O/A-INs dans ce modèle. Dans un premier temps, nous avons évalué les effets d'une application aiguë de KA sur les propriétés membranaires et calciques pour voir s'il y avait des différences entre les O/A-INs et R/LM-INs qui pourraient expliquer la vulnérabilité. Nos résultats montrent que les dépolarisations et variations de résistance d'entrée ainsi que les augmentations de calcium intracellulaire, dépendantes principalement des récepteurs  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionique (AMPA), sont similaires entre les deux types d'interneurones suite à des applications aiguës de KA. Ceci indique que l'effet aigu du KA sur les interneurons ne serait pas la cause de la vulnérabilité des O/A-INs. Dans un second temps nous avons

comparé l'implication des sous-types de récepteurs mGluR1 et 5 dans l'activité épileptiforme des deux types d'interneurones évoquée dans un modèle de tranche désinhibée. Dans ce cas, nos données montrent un rôle important des mGluR1 et 5 activés synaptiquement lors des décharges épileptiformes et ce, de manière spécifique aux O/A-*INs*. Les courants synaptiques sous-tendant ces décharges impliquent des récepteurs ionotropes et métabotropes du glutamate. En présence d'antagonistes des récepteurs ionotropes glutamatergiques, les courants synaptiques sont biphasiques et formés de composantes rapide et lente. Les récepteurs mGluR1 et 5 sont différemment impliqués dans ces composantes: les mGluR5 étant impliqués dans les composantes rapide et lente, et les mGluR1 que dans la composante lente. Ces résultats indiquent que les mGluR1 et 5 contribuent différemment à l'activité épileptiforme, et spécifiquement dans les O/A-*INs*, et pourraient donc être impliqués dans la vulnérabilité sélective de ces interneurones dans le modèle KA.

**Mots-clés :** Épilepsie du lobe temporal (TLE), modèle KA, tranche d'hippocampe, CA1, vulnérabilité sélective, interneurones inhibiteurs, récepteurs métabotropes groupe I(mGluR1/5).

## Abstract

Temporal lobe epilepsy (TLE) patients, as well as kainic acid (KA)-treated rodents, display similar pathophysiological patterns of behavioural seizures, hippocampal sclerosis and loss of certain neuronal types in the hippocampus. Among the cell types selectively vulnerable in the experimental KA model of TLE are certain inhibitory interneurons of the CA1 hippocampal region. Specifically, interneurons located in the *oriens* and *alveus* layers (O/A-IN) are lost following KA injections, whereas interneurons found in the *radiatum/lacunosum-moleculare* layers (R/LM-IN) are resistant. Although it has been shown that the group I metabotropic glutamate receptor (mGluR1/5) inhibitors can block this cell loss seen in the KA model, the precise cause of the selective O/A-IN vulnerability remains to be clarified. In this thesis, we have performed whole-cell patch-clamp recordings with simultaneous calcium imaging in an effort to elucidate the cause of the selective vulnerability of O/A-INs. We first determined the effects of acute KA applications on membrane properties and intracellular calcium rises in hippocampal slices to see if they might be different between O/A-INs and R/LM-INs. Our results reveal similar  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxasole propionic acid (AMPA) receptor dependent membrane depolarizations, input resistance variations and calcium reponses in these cells following KA applications, suggesting that acute KA actions may not cause the selective vulnerability of O/A-INs. Furthermore, we evaluated the contribution of mGluR1/5 to epileptiform discharges evoked in a disinhibited slice model, comparing responses between O/A-INs and R/LM-INs. Our data show an important role of synaptically activated mGluR1/5 during

epileptiform discharges specifically in O/A-INs. In addition we show that the synaptic currents underlying these discharges involve ionotropic and metabotropic glutamate receptors. In the presence of antagonists of ionotropic glutamate receptors, synaptic currents are biphasic and composed of fast and slow components. mGluR1 and mGluR5 are involved differently in these components with mGluR5 implicated in fast and slow components and mGluR1 in the slow component only. Our findings therefore suggest that mGluR1 and 5 contribute differently to epileptiform discharges, and do so specifically in O/A-INs, suggesting that their activation may contribute to the selective vulnerability of these interneurons in the KA model of TLE.

**Keywords** : Temporal lobe epilepsy (TLE), hippocampal slices, CA1, kainic acid model, selective vulnerability, inhibitory interneuron, metabotropic glutamate receptor (mGluR1/5)

# Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Liste des abréviations.....	ix
Liste des figures.....	xi
Remerciements.....	xiv
<b>Chapitre I - Introduction.....</b>	<b>1</b>
1.1 Présentation de la pathologie.....	2
1.1.1 Historique.....	2
1.1.2 L'épilepsie chez l'humain.....	3
1.2. Formation hippocampique.....	6
1.2.1 Organisation anatomique.....	6
1.2.2 Interneurones inhibiteurs de l'hippocampe.....	9
1.2.3 Récepteurs et neurotransmission des voies synaptiques du CA1.....	16
1.3 Épilepsie du lobe temporal et formation hippocampique.....	30
1.3.1 Modèles expérimentaux du TLE.....	33
1.3.2 L'activité épileptiforme dans le circuit hippocampique.....	43
1.4 Problématique abordée au cours de la thèse.....	53
<b>Chapitre II - Short term effect of kainic acid on CA1 hippocampal interneurons differentially vulnerable to excitotoxicity.....</b>	<b>55</b>
<b>Chapitre III - Interneuron sub-type specific activation of mGluR1/5 during epileptiform activity in hippocampus.....</b>	<b>68</b>
<b>Chapitre IV - Discussion générale.....</b>	<b>87</b>
4.1 Perte sélective d'interneurones dans le modèle KA.....	88

4.2	Activité induite par le KA: effets électrophysiologiques.....	91
4.3	Activité induite par le KA: effets sur le calcium intracellulaire .....	94
4.4	Implication différente des mGluR1 et mGluR5 dans l'activité épileptiforme des O/A- INs.....	96
4.5	Activité synaptique épileptiforme dépendante du sous-type d'interneurone .....	100
4.6	Changements dans les courants synaptiques spécifiques aux O/A-INs dans le modèle KA.....	105
4.7	Implications fonctionnelles de la perte d'interneurones dans le modèle KA du TLE..	108
4.8	mGluR1 et mGluR5 comme potentielle cible thérapeutique .....	110
4.9	Perspectives d'avenir.....	112
4.9.1	Régulation de l'activation des mGluR5 par les transporteurs du glutamate..	112
4.9.2	Mécanismes calciques liés à l'activation des mGluR1/5 durant l'activité épileptiforme .....	113
4.9.3	Rôle spécifique des sous-types mGluR1/5 dans les changements chroniques du modèle KA .....	114
4.10	Conclusion générale.....	116
	Annexe I - Cell-type specific changes in spontaneous and minimally evoked excitatory synaptic activity in hippocampal CA1 interneurons of KA-treated rats.....	118
	Annexe II - Liste des coauteurs des articles inclus dans la thèse.....	119
	Annexe III - Contribution de l'étudiante .....	134
	Références bibliographiques .....	135

## Liste des abréviations

AMPA: acide  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionique

CA1: corne d'Ammon région 1

CA3: corne d'Ammon région 3

CPSE: courant post-synaptique excitateur (EPSC)

CPSI: courant post-synaptique inhibiteur (IPSC)

DG: gyrus dentelé

EC: cortex entorhinal

EEG: électro-encéphalogramme

GABA: acide  $\gamma$ -aminobutyrique

GAD: décarboxylase de l'acide glutamique

GPCR: récepteurs couplés aux protéines G (G-protein coupled receptors)

$I_{CAN}$ : courant cationique non-sélectif

KA: acide kaïnique

LTP: potentialisation à long-terme

NMDA: N-methyl-D-aspartate

O/A: oriens/alveus

O/A-IN: interneurone de la couche O/A

P20: 20 jours post-natal

PD: dépolarisation paroxysmique (paroxysmal depolarization)

PV: parvalbumine

Rad: radiatum

R/LM: radiatum/lacunosum-moleculare

R/LM-IN: interneurone de la couche R/LM

SC: collatérales de Schaffer

SS: somatostatine

TA: temporo-ammonique

TLE: épilepsie du lobe temporal (temporal lobe epilepsy)

TRPC1: canaux récepteurs de potentiels transitoires de type 1

VGCC: canaux calciques voltage-dépendants

## Liste des figures

### Introduction

<u>Figure A</u> : Régions et principales voies de l'hippocampe.....	8
<u>Figure B</u> : Types d'interneurones de l'hippocampe.....	11
<u>Figure C</u> : Circuiterie locale de la région CA1 en conditions normale et épileptique.....	48

### Chapitre II

<u>Figure 1</u> : Interneuron loss following KA treatment.....	59
<u>Figure 2</u> : Acute effects of KA on interneurons.....	60
<u>Figure 3</u> : Direct effects of KA on interneurons.....	61
<u>Figure 4</u> : Effects of repeated, prolonged applications of KA.....	62
<u>Figure 5</u> : Effects of non-NMDAR antagonists on KA-induced membrane depolarizations.....	62
<u>Figure 6</u> : Effects of the AMPAR antagonist GYKI52466 on KA-induced depolarizations.....	63
<u>Figure 7</u> : Intracellular Ca <sup>2+</sup> responses induced by KA.....	64
<u>Figure 8</u> : Direct effects of KA and contributions of AMPAR/KAR.....	65

### Chapitre III

<u>Figure 1</u> : Differences in epileptiform burst discharges in O/A <i>versus</i> R/LM interneurons.....	72
<u>Figure 2</u> : Contribution of mGluR5 to epileptiform burst discharges in O/A but not R/LM interneurons.....	73

<u>Figure 3</u> : Implication of mGluR1 $\alpha$ and 5 in paroxysmal depolarizations underlying epileptiform responses in O/A-INs.....	74
<u>Figure 4</u> : Distinct contributions of mGluR1 $\alpha$ and 5 to fast and slow components of postsynaptic currents underlying PDs in O/A-INs.....	75
<u>Additional Figure 1</u> : Difference in epileptiform burst discharge is independent of stimulation site .....	81
<u>Additional Figure 2</u> : No contribution of mGluR1 $\alpha$ to epileptiform burst discharges in either interneuron type.....	83
<u>Additional Figure 3</u> : No contribution of mGluR1 $\alpha$ and 5 to PDs in R/LM-INs.....	84
<u>Additional Figure 4</u> : No contribution of mGluR1 $\alpha$ and 5 to PSCs in R/LM-INs.....	85

## **Chapitre IV**

<u>Figure D</u> : Schéma récapitulatif du rôle des récepteurs glutamatergiques dans l'activité épileptiforme des interneurons inhibiteurs de l'hippocampe.....	104
--	-----

*À Michael H, Noah et Luka ...*

## Remerciements

Je remercie chaleureusement mes directeurs de thèse, le Dr. Jean-Claude Lacaille de m'avoir acceptée comme étudiante dans son laboratoire, et de m'avoir permis d'avoir accès à des ressources favorables à ma formation; et le Dr. Lionel Carmant de m'avoir accordé du temps même quand il n'en avait pas et de m'avoir encouragée au cours du long processus. Je remercie mes directeurs, ainsi que la Fondation Savoy pour l'épilepsie et le fonds de recherche en santé du Québec (FRSQ) pour leur soutien financier.

Je remercie mes parents, mes beaux parents et mes grands-parents qui m'ont, tous ensemble, permis de terminer cette thèse en s'occupant de Noah et de Luka; en me nourrissant abondamment, en me conseillant sagement et en m'encourageant fortement.

Je remercie Tudor pour son éternel soutien, sa patience et sa grande compréhension. Je remercie Noah de m'avoir donné de l'énergie par ses mots doux et Luka par ses sublimes sourires!

Je remercie tout particulièrement mes amis et collègues pour leur aide technique et surtout leur soutien moral, toujours très apprécié!

Je remercie ma mère, Dr. Gina Thésée, de m'avoir montré la voie...

# **Chapitre I**

## **Introduction**

## **1.1 Présentation de la pathologie**

### **1.1.1 Historique**

Le terme épilepsie vient du mot grec 'epilambanein' qui signifie "être saisi" ou "être pris" et ferait référence à une personne en pleine crise (Engel J Jr 1989). L'épilepsie était ainsi considérée au Moyen-âge, et même bien avant, comme étant une emprise transitoire d'un corps par des esprits démoniaques. La personne ainsi atteinte pouvait présenter des manifestations durant lesquelles les yeux se révoltaient dans leur orbite, où le corps tout entier était à la fois crispé et spastique, où elle perdait connaissance et chutait. Ces symptômes étaient lourds de conséquences pour la personne, dite possédée, car à l'époque, la présumée alliance avec le Diable, qu'elle soit légitime ou non, pouvait justifier de faire subir de graves sévices corporels et d'accorder une invitation privilégiée pour le bûcher.

Or, déjà aux environs de 400 av. J-C, Hippocrate avait proposé dans un des premiers écrits sur la maladie que les vertus diaboliques attribuées à cette condition n'étaient aucunement fondées et que même la religion et la prière ne permettaient pas d'enrayer les symptômes, maintenant dénommés crises d'épilepsie (Engel J Jr 1989). Ces symptômes sont regroupés dans un ensemble de types d'épilepsies selon des critères particuliers d'altération ou non de la conscience, de spasticité musculaire limitée ou généralisée au corps entier et de l'âge de l'individu à l'apparition des premières crises (Engel J Jr 1989). On reconnaît maintenant, aussi grâce au texte d'Hippocrate, que les crises sont plutôt dues à un dérèglement qui se situe au niveau du cerveau. Mais ce n'est que bien plus tard au cours

des temps modernes que les travaux de chercheurs et neurologues ont contribué de manière significative à la description, l'identification et la compréhension de l'épilepsie chez l'humain. Ceci inclut les travaux de Hughlings Jackson qui a décrit extensivement les crises psychomotrices provenant du lobe temporal, de Wilder Penfield père de la carte somatotopique générée par stimulations électriques corticales chez des patients épileptiques éveillés, et de Herbert Jasper, ancien membre de notre département qui a largement développé l'électroencéphalographie et les enregistrements de cellules unitaires (Feindel W 1999).

La prévalence de ce trouble neurologique est de près de 1% de la population des États-Unis (selon l'American Epilepsy Society). Il est toutefois possible que le nombre de cas soit, en fait, plus élevé puisqu'en bien des endroits du monde les cas ne peuvent être répertoriés faute de neurologues, que la religion et les mœurs anciennes au sein de la population excluent les personnes atteintes, ou que même en pays industrialisés l'origine négative demeure dans l'inconscient collectif rendant la stigmatisation facile.

### **1.1.2 L'épilepsie chez l'humain**

De nos jours, l'épilepsie est reconnue comme étant la manifestation de plusieurs crises récurrentes déclenchées spontanément chez un individu (Engel J Jr 1989). Ces manifestations sont d'origines multiples et leurs causes peuvent être d'ordre génétique, ou dues à des malformations congénitales, des traumatismes périnataux, des traumatismes au courant de la vie ou, comme dans la majorité des cas, de causes inconnues. Les nombreuses causes donnent lieu à divers syndromes épileptiques dont la classification fait l'objet d'une

controverse (Engel J, Jr. 2006; Wieser HG 2003) étant donné le nombre important de types d'épilepsies répertoriés, de types de crises et des critères comportementaux, électrophysiologiques, pathophysiologiques, anatomiques ou génétiques sur lesquels on se base pour les identifier, surtout en absence de lésion. Mais selon une classification simplifiée (Engel J Jr 1989), les crises qui se définissent comme étant une hypersynchronisation de l'activité électrique cérébrale, peuvent être partielles ou généralisées selon que les crises soient initiées uni- ou bi-latéralement ou qu'il y ait propagation subséquente de cette hyperactivité à tout un lobe, un hémisphère ou au cerveau entier à partir de la région initiatrice du foyer épileptique. Les crises partielles sont complexes ou simples selon qu'il y ait ou non altération ou perte de la conscience au moment de l'épisode.

L'une des régions cérébrales la plus souvent atteinte par un foyer épileptique est le lobe temporal. L'épilepsie du lobe temporal est ainsi associée à des sensations émotionnelles très caractéristiques ressenties quelques secondes avant le début d'une crise, soit le phénomène de l'aura qui survient entre autres à cause de l'implication du complexe amygdalien, structure du lobe temporal considérée comme étant le centre des émotions (Bancaud J et al. 1966; Cahill L et al. 1995; Phelps EA 2004). Les manifestations mais surtout les sensations précises et complexes, parfois même intrigantes, reliées aux émotions lors de ce phénomène ont été décrites par des auteurs tels Feodor Dostoïevsky, lui-même épileptique, et dont le protagoniste est atteint d'épilepsie<sup>1</sup> ou encore le Dr. Oliver Sacks relatant une description détaillée de ses patients atteints d'épilepsie du lobe temporal<sup>2</sup>.

---

<sup>1</sup>"L'Idiot" de Feodor Dostoïevsky, 1868-69

<sup>2</sup>"L'homme qui prenait sa femme pour un chapeau" de Dr. Oliver Sacks, 1985

L'épilepsie du lobe temporal (TLE) est un trouble chronique du système limbique marqué par diverses modifications de son circuit neuronal. Parmi les structures les plus impliquées dans l'épileptogenèse et affectées dans la TLE on retrouve l'hippocampe, ainsi que le cortex entorhinal et le complexe amygdalien (Jones RS et Lambert JD 1990; Barbarosie M et Avoli M 1997; Munari C et al. 1979). La première description de la vulnérabilité de l'hippocampe et la dénomination "sclérose de la corne d'Ammon" est attribuée à Sommer un médecin allemand en 1880 (Sommer W 1880; Mathern GW et al. 2007), suite à l'examen microscopique des changements survenus dans la couche pyramidale de l'hippocampe chez des patients épileptiques.

La TLE étant parmi les types d'épilepsies les plus difficiles à traiter par médication, la chirurgie est une forme de thérapie très utilisée menant à des résultats efficaces pour les patients ayant un foyer bien délimité n'étant pas situé dans une zone du cerveau responsable de fonctions importantes tels la mémoire, la parole ou la vision (Penfield W 1959; Duncan JS 2007). Ainsi, l'exérèse de structures du système limbique comme l'hippocampe, l'amygdale, le cortex temporal ou parfois, tout le lobe temporal épileptique permet, dans certains cas, d'enrayer les symptômes de crises récurrentes (Duncan JS 2007; Bocti C et al. 2003; Vigouroux R 1953). Ces procédures chirurgicales ont permis l'expansion de la recherche fondamentale sur le domaine par les études faites sur le tissu humain épileptique après excision du foyer épileptogène (Isokawa M 1996; Gibbs JW, III et al. 1996).

La majorité des changements lors de la TLE ayant lieu dans l'hippocampe, il convient de bien comprendre le fonctionnement de cette région du cerveau dans son état normal avant d'y étudier l'état pathologique.

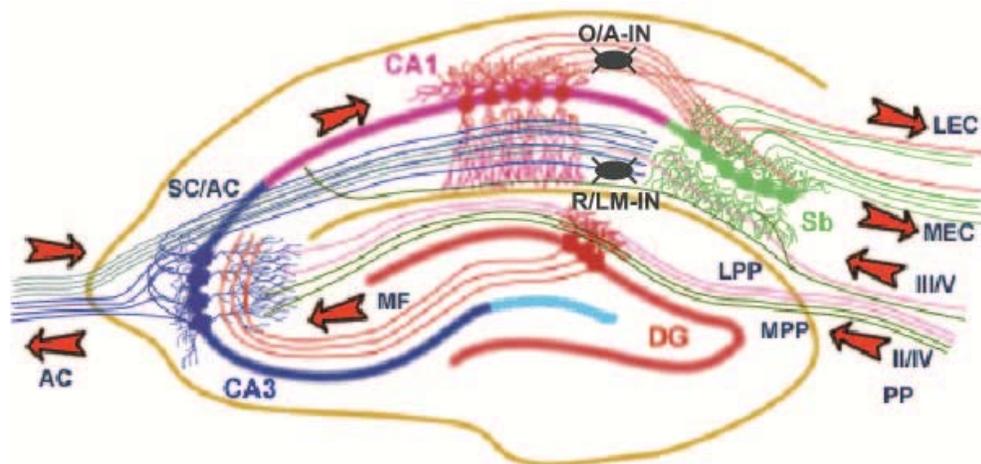
## **1.2. Formation hippocampique**

### **1.2.1 Organisation anatomique**

La formation hippocampique comprend le cortex entorhinal (CE) et le subiculum (Sub) en plus du gyrus dentelé (DG), le CA3 et le CA1, qui sont les trois principales régions de l'hippocampe. Cette structure du lobe temporal tire son nom de sa ressemblance, en coupe transversale, à la forme de la queue de l'hippocampe de mer. La configuration caractéristique de l'hippocampe forme un circuit neuronal intrinsèque constituant une boucle poly-synaptique (Teyler TJ et DiScenna P 1984). Les afférences de l'hippocampe proviennent des aires corticales associatives frontales, pariétales et temporales (Kandel ER et al. 2000) et sous-corticales du septum, du raphé, du locus coeruleus et de l'hypothalamus (Leranth C et Hajszan T 2007) en passant tout d'abord par les cellules pyramidales et les cellules stellaires du CE (Alonso A et Klink R 1993). Les axones de ces neurones de la couche II du CE projettent vers les cellules granulaires du DG formant la voie perforante (Alonso A et Klink R 1993) (Fig A). Les axones des cellules granulaires projettent vers les cellules pyramidales de la région de la Corne d'Ammon (CA3) (Lorente de No 1934) formant la voie des fibres moussues (MF) ainsi nommées à cause de leurs axones épineux. Puis les axones issus du CA3 projettent vers les cellules pyramidales du CA1 formant la voie des collatérales de Schaffer (SC). Finalement, les axones des cellules pyramidales du CA1 projettent aux cellules du subiculum (Sub), qui à leur tour dirigent leurs axones vers le CE (Swanson LW et al. 1978). Les neurones du CE établissent des connexions extra-hippocampiques vers le cortex pré-frontal et olfactif par le fornix et l'aire rétro-spléniale, ou

les aires pariétales et insulaires (Cenquizca LA et Swanson LW 2007). Le CE occupe ainsi une position centrale permettant des interconnexions bidirectionnelles entre l'hippocampe et le reste du cortex cérébral (Amaral DG et al. 1987).

Par contre, des évidences anatomiques et physiologiques montrent qu'il y a aussi des connexions qui outrepassent la boucle poly-synaptique classique de sorte que, d'une part, des axones issus de la couche III du CE projettent vers le CA1 et font des connexions au *stratum lacunosum/moleculare* (L/M), formant la voie temporo-ammonique (Desmond NL et al. 1994; Ang CW et al. 2005), ainsi que des connexions directes au CA3 (Yeckel MF et Berger TW 1990). D'autre part, des afférences extrinsèques à la formation hippocampique issues du cortex péri-rhinal projettent vers le subiculum possiblement impliquées dans le processus de mémoire (Naber PA et al. 1999) et des afférences sous-corticales provenant du noyau reunien du thalamus projettent directement au CA1 (Bertram EH et Zhang DX 1999).



Adapté de: <http://www.bristol.ac.uk/synaptic/info/pathway/hippocampal.htm>

Figure A: Régions et principales voies de l'hippocampe.

Coupe transversale de l'hippocampe illustrant les principales régions (DG: gyrus dentelé; CA3; CA1; Sb: subiculum) ainsi que les voies impliquées dans la boucle poly-synaptique (MPP, LPP: voie perforante médiale et latérale; MF: fibres moussues; SC/AC: colatérales de Schaffer/ fibres associatives et commissurales) et la voie temporo-ammonique. La provenance des principales afférences (couches II/IV,III/V du CE et l'hippocampe contro-latéral par les fibres AC), ainsi que la destination des efférences (CE médial [MEC] et latéral [LEC] et l'hippocampe contro-latéral), sont indiquées. Les deux types d'interneurones étudiés ici (O/A-IN, R/LM-IN) sont présents.

Une des caractéristiques morphologiques de l'hippocampe est la disposition des cellules granulaires et pyramidales qui sont alignées en couches ordonnées. Ainsi dans la région CA1, le *stratum lacunosum/moleculare* correspond à la couche où se trouvent les dendrites apicales les plus distales des cellules pyramidales, le *stratum radiatum* (Rad) correspond aux dendrites apicales distales et proximales, le *stratum pyramidale* (Pyr) correspond aux corps cellulaires, le *stratum oriens* (Or) correspond aux dendrites basales et aux segments initiaux des axones, et l'*alveus* (Alv) correspond aux faisceaux d'axones des cellules pyramidales. Cette organisation laminaire du circuit neuronal, en outre, facilite les enregistrements électrophysiologiques de l'hippocampe étant donné les faisceaux d'axones et les arborisations dendritiques regroupées, ce qui a pour avantage de produire des réponses synaptiques de plus grande amplitude.

Les cellules granulaires et les cellules pyramidales sont les cellules principales de l'hippocampe à cause de leur nombre important et du fait qu'elles forment la boucle synaptique excitatrice intra-hippocampique. Par contre, il existe aussi d'autres types de neurones au sein du réseau hippocampique. Les interneurones, dites cellules non-principales, sont moindres en nombre et majoritairement inhibitrices mais jouent, néanmoins, un rôle important dans le réseau (Freund TF et Buzsaki G 1996; Cobb SR et al. 1995).

### **1.2.2 Interneurones inhibiteurs de l'hippocampe**

Les travaux anatomiques de Ramon y Cajal (DeFelipe J 2002) ont contribué à la découverte que les interneurones constituent un ensemble cellulaire hétérogène. Plus récemment, les interneurones hippocampiques ont été classifiés selon des critères de morphologie cellulaire et de localisation intra-hippocampique, ainsi que de propriétés neurochimiques, électrophysiologiques et synaptiques (Maccaferri G et Lacaille JC 2003; Freund TF et Buzsaki G 1996). Il existe une grande diversité d'interneurones dans chacune des régions de l'hippocampe (Freund TF et Buzsaki G 1996), mais la description suivante portera essentiellement sur la région CA1 qui est traitée dans les travaux de cette thèse.

#### *Critères morphologiques*

Généralement, la forme oblongue ou multipolaire du corps cellulaire des interneurones les distingue des cellules pyramidales de forme triangulaire (Lacaille JC et Schwartzkroin PA 1988b). Une classification morphologique des interneurones du CA1 a été élaborée en se basant sur la localisation de leur corps cellulaire et la distribution de leurs

arborisations dendritiques et axonales (Somogyi P et Klausberger T 2005). Initialement selon ces auteurs, seize types d'interneurones forment des synapses sur les cellules pyramidales locales (figure B), incluant: 1) les cellules ayant des terminaisons dans la région péri-somatique (cellules axo-axoniques et à panier); 2) les cellules ayant des terminaisons au niveau des synapses des collatérales de Schaffer et des fibres commissurales (cellules bistratifiées, O-LM, associées aux collatérales de Schaffer et neurogliales); 3) les cellules ayant des terminaisons dans d'autres régions (cellules associées à la voie perforante du DG, trilaminaires projetant au subiculum, de rétro-projection vers le CA3 et le DG, et à double projection vers le subiculum et le septum) et finalement 4) les cellules spécifiques aux interneurones (Somogyi P et Klausberger T 2005). Ce nombre a récemment été révisé à la hausse atteignant jusqu'à 21 types d'interneurones par l'ajout des cellules "Ivy" similaires aux bistratifiées mais à décharge lente, des cellules innervant les dendrites apicales, des cellules dans l'oriens ou le radiatum projetant vers le subiculum et le EC, et des cellules exprimant principalement la calbindine ou l'acétylcholine (Klausberger T et Somogyi P 2008).

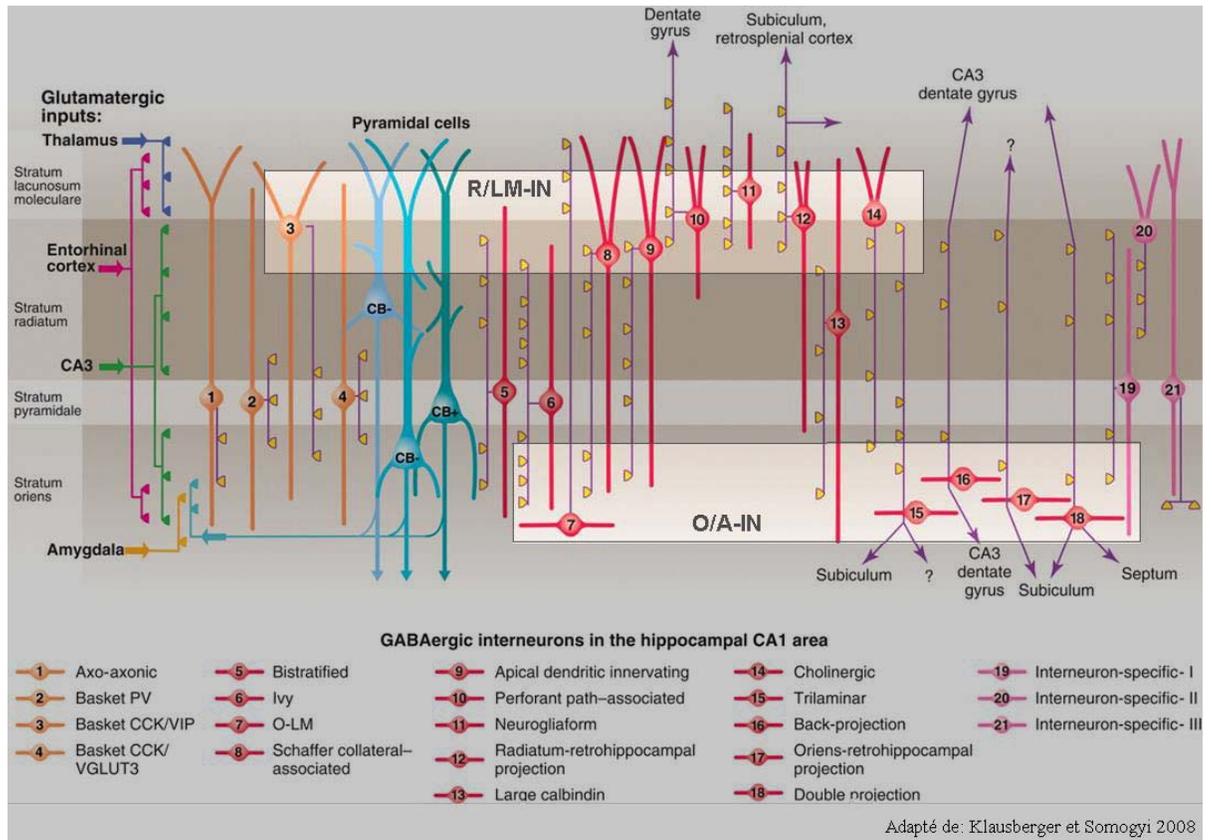


Figure B: Types d'interneurones de l'hippocampe.

Schéma illustrant 21 types d'interneurones identifiés du CA1 de l'hippocampe faisant synapse à divers niveaux sur les cellules pyramidales et interneurones. Les principales afférences vers le CA1 sont indiquées à gauche, les axones des interneurones sont en mauve et les terminaisons synaptiques principales sont jaunes. Les deux encadrés clairs représentent les divers types d'interneurones qui ont pu être enregistrés dans notre étude en choisissant les interneurones selon leur localisation dans les strates (O/A et R/LM).

### Critères neurochimiques

L'identification de l'expression de marqueurs intracellulaires spécifiques à certains interneurones permet de mieux cerner leur différent rôle biochimique. L'acide  $\gamma$ -

aminobutyrique (GABA), neurotransmetteur inhibiteur ainsi que la decarboxylase de l'acide glutamique (GAD65,67), l'enzyme de synthèse du GABA sont présents dans les interneurones, indiquant que les interneurones sont inhibiteurs (Ribak CE 1978, Woodson W et al. 1989). Le GABA se lie aux récepteurs GABA<sub>A</sub> ionotropes couplés à un canal chlore (Cl<sup>-</sup>) causant une hyperpolarisation rapide de la cellule (Alger BE et Nicoll RA 1982) et aux récepteurs GABA<sub>B</sub> couplés aux protéines G favorisant une conductance potassique lente (Dutar P et Nicoll RA 1988; Newberry NR et Nicoll RA 1985).

Outre le neurotransmetteur GABA, divers peptides sont présents dans certains interneurones incluant la somatostatine (SS), la cholécystokinine (CCK), le peptide intestinal vaso-actif (VIP), la substance P (SP) et le neuropeptide Y (NPY). Le rôle de ces peptides est peu connu mais semble impliquer la modulation de la relâche de GABA dans les terminaisons nerveuses comme la modulation par la SS (Iversen LL et al. 1978), ou comme la libération non-synaptique de la SP au niveau des dendrites et soma (Duggan AW et al. 1990).

De plus, on retrouve certaines protéines liant le Ca<sup>2+</sup> comme la calretinine (CR), la parvalbumine (PV) ou la calbindine (CB) sélectivement dans certains interneurones permettant ainsi d'identifier différents sous-types (Freund TF et Buzsaki G 1996, Maccaferri G et Lacaille JC 2003). Le rôle précis de l'expression sélective des chélateurs calciques est aussi peu connu mais cette expression hétérogène ne semble pas être impliquée dans la dégénérescence cellulaire (Bouilleret V et al. 2000). Certains marqueurs peptidiques ou protéiques se retrouvent parfois co-localisés. La substance P, par exemple, est présente dans les cellules GABAergiques (Magloczky Z et al. 2000) et est co-localisée

avec la calbindine, mais non pas avec d'autres chélateurs calciques, ni avec la CCK (Toth K et al. 2007). Par contre, la PV ou la SS sont parfois co-localisées avec d'autres marqueurs, rendant très complexe la classification des interneurones selon des critères purement neurochimiques.

### *Critères électrophysiologiques*

Il existe des divergences au niveau de l'activité électrophysiologique des interneurones. Certains d'entre eux ont un patron de décharge régulier sans aucune adaptation tout au long de l'imposition d'un créneau de courant positif, d'autres ont un patron de décharge irrégulier, et certains déchargent avec des potentiels d'action en bouffée (Parra P et al. 1998). En plus du type de décharge, la fréquence de décharge est aussi variable selon les interneurones. Certains interneurones sont connus comme étant des cellules à décharge rapide (FS: "fast spiking") avec une fréquence de près de 100Hz (interneurones du O/A) (Lacaille JC et Williams S 1990) ou de 200-500Hz (cellules à panier, cellules bistratifiées) (Han ZS et al. 1993; Mott DD et al. 1997; Lubke J et al. 1998). En contraste, d'autres interneurones, telles les cellules du LM, sont des cellules à décharge plus lente (Lacaille JC et Schwartzkroin PA 1988a). Cette distinction est analogue à celle pour les interneurones du cortex: "fast spiking" (cellules FS) et "low threshold spiking" (cellules LTS) (Kawaguchi Y et Kubota Y 1993; Xiang Z et al. 1998).

De plus, l'expression de canaux ioniques, notamment potassiques, diffère entre interneurones. Ces canaux ont un rôle important dans l'établissement du potentiel de repos membranaire, la durée du potentiel d'action, la fréquence de décharge (Martina M et Jonas

P 1997) et lors des oscillations de potentiel membranaire intrinsèques qui régulent la fréquence de décharge (Bourdeau ML et al. 2007).

### *Critères de connectivité synaptique*

On reconnaît trois types de connectivité synaptique des interneurones. Le premier type est l'inhibition proactive ("feed-forward"), où un interneurone du CA1, par exemple, est excité par les collatérales de Schaffer ou les fibres commissurales (Schwartzkroin PA et Mathers LH 1978; Buzsaki G et Eidelberg E 1982; Lacaille JC et al. 1987) et inhibe une cellule pyramidale. Cette dernière reçoit donc des afférences du CA3 par une connexion excitatrice monosynaptique et inhibitrice disynaptique (Buzsaki G 1984). On retrouve cette inhibition par exemple dans les interneurones du CA1 (*oriens et radiatum*) et du CA3 (Lawrence JJ et McBain CJ 2003; Mori M et al. 2004).

Dans le second type de connexion synaptique, les interneurones effectuent une inhibition rétroactive ("feed-back") où un interneurone inhibe une cellule pyramidale qui active ce même interneurone. On retrouve ce type d'inhibition par exemple dans les interneurones des couches *oriens* et *pyramidale* du CA1 et du CA3 (Knowles WD et Schwartzkroin PA 1981; Lacaille JC et al. 1987; Lacaille JC et Schwartzkroin PA 1988b). Cette inhibition constitue un mécanisme d'auto-régulation qui sert à favoriser l'activité dans une voie au détriment des autres voies moins actives (Kandel ER et al. 2000).

Enfin, le troisième type de connexion synaptique implique les connexions inhibitrices spécifiquement entre interneurons (Freund TF et Buzsaki G 1996; Gulyas AI et al. 1996). En effet, selon Klausberger et Somogyi 2008, trois types d'interneurones font synapse spécifiquement sur d'autres interneurons (cellules IS: "interneuron-specific"). Ces interneurons sont encore peu connus mais leurs corps cellulaires sont situés dans toutes les couches du CA1. Ils expriment la calrétinine ou le VIP, et leur axone projette localement vers les interneurons de toutes les couches du CA1, ainsi que du DG, CA3 ou septum.

#### *Difficulté de consensus de classification*

Une étude tenant compte d'un nombre important de facteurs de classification et se concentrant sur les interneurons inhibiteurs de la région CA1 de l'hippocampe a conclu qu'il était difficile, sinon impossible, de regrouper les interneurons en un nombre restreint de classes (Parra P et al. 1998). De plus, un type d'interneurone selon une classification donnée peut correspondre à différents types selon une autre classification (DeFelipe J 2002): comme par exemple, les cellules immuno-positives pour la parvalbumine incluent les cellules axo-axoniques faisant synapse sur le segment initial de l'axone et les cellules à panier faisant synapse sur les dendrites proximaux et le corps cellulaire (Freund TF et Buzsaki G 1996); toutes deux sont caractérisées différemment selon leur cible axonale bien que neurochimiquement semblables. Malgré une telle diversité et complexité de catégorisation, il est tout de même utile de distinguer les interneurons selon certains critères, même si d'autres facteurs peuvent éventuellement mener à une classification plus appropriée.

Au cours des travaux de cette thèse nous avons employé une classification des interneurons basée sur l'emplacement du corps cellulaire pour deux raisons: d'une part il s'agit d'une classification qui permet la sélection des cellules par visualisation lors d'enregistrement électrophysiologique sur tranches *in vitro*, et d'autre part, ce critère permet de distinguer deux populations d'interneurons différemment vulnérables chez les patients avec l'épilepsie du lobe temporal (TLE) et dans le modèle kainate du TLE chez le rat.

### **1.2.3 Récepteurs et neurotransmission des voies synaptiques du CA1**

Les connexions synaptiques intra-hippocampiques sont principalement excitatrices, via le glutamate, ou inhibitrices, via le GABA (Kandel ER et al. 2000). Ces synapses sont très variées et impliquent plusieurs types de mécanismes glutamatergiques (Nicoll RA et Malenka RC 1995) et GABAergiques (Thompson SM et al. 1993). Ces synapses démontrent des propriétés très variées de plasticité (Zucker RS 1989). En fait, il a été montré qu'aux synapses d'un même axone la plasticité à court-terme dépend de l'identité de la cible cellulaire postsynaptique (Scanziani M et al. 1998). De plus, des récepteurs présynaptiques régulent la libération de neurotransmetteurs et la plasticité (Losonczy A et al. 2003). Les divers éléments pré- et post-synaptiques jouent donc un rôle clé dans la transmission de l'information dans l'hippocampe.

### **1.2.3.1 Transmission synaptique médiée par les récepteurs glutamatergiques ionotropes**

Le principal neurotransmetteur libéré par les neurones excitateurs de l'hippocampe est le glutamate. Celui-ci a un effet excitateur rapide sur les neurones par l'intermédiaire de récepteurs-canaux situés sur les neurones post-synaptiques. La liaison du glutamate sur le récepteur provoque l'ouverture du canal et l'entrée de cations sodiques ( $\text{Na}^+$ ) et calciques ( $\text{Ca}^{2+}$ ) et la sortie d'ions potassiques ( $\text{K}^+$ ). Ceci crée un courant entrant (positif) et une dépolarisation du potentiel membranaire vers le seuil d'activation, provoquant une excitation par rapport au potentiel membranaire de repos (Randall AD et Collingridge GL 1992). Trois types de récepteurs glutamatergiques ionotropes ont été identifiés sur la base de leur propriétés pharmacologiques (McLennan H 1983; Foster AC et Fagg GE 1984; Seeburg PH 1993). Un récepteur est composé de 4 sous-unités, chacune ayant 3 domaines transmembranaires (M1, M3 et M4) (Bennett JA et Dingledine R 1995). Chaque type de récepteur a un rôle particulier lors de la transmission synaptique.

#### *Les récepteurs AMPA*

Leur nom provient de l'agoniste glutamatergique qui leur est spécifique, l'acide propionique  $\gamma$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole (AMPA). De plus le glutamate et le KA se lient à ces récepteurs avec une affinité différente. Les récepteurs AMPA (AMPA) sont formés à partir de quatre des sous-unités, GluR1 à GluR4, issues de gènes différents. Les AMPAR ont une cinétique d'activation très rapide, de l'ordre de la milliseconde, de sorte que les courants synaptiques s'activent et se désactivent rapidement, et, de plus, sont habituellement de grande amplitude (Jonas P 1993; Jones MV et Westbrook GL 1996). Les

AMPA sont généralement perméables seulement aux ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  (Collingridge GL et Lester RA 1989). Ils ont une courbe courant-voltage (I/V) qui forme une droite à pente positive avec un potentiel de renversement autour de 0mV correspondant à la somme des potentiels de renversement pour chacun de ces ions donnée par l'équation de Nernst (Hille B 2001). Donc, à des potentiels de repos négatifs, les courants issus de ces récepteurs sont entrants et de grande amplitude, diminuent jusqu'au potentiel de 0mV, puis augmentent à des potentiels positifs formant des courants sortants de grande amplitude. Les AMPAR sont impliqués dans la composante initiale de la réponse synaptique (Hestrin S et al. 1990; Koh DS et al. 1995).

#### *Les récepteurs NMDA*

Les récepteurs NMDA sont sélectivement activés par l'agoniste N-méthyl-D Aspartate (NMDA), en plus du glutamate. Ils sont composés des sous-unités NR1, NR2 (Monyer H et al. 1992) et NR3 (Sun L et al. 1998) qui elles-mêmes ont plusieurs isoformes issues de l'épissage alternatif (Durand GM et al. 1992; Nakanishi N et al. 1992). Contrairement aux AMPAR, la conductance des récepteurs NMDA (NMDAR) varie en fonction du voltage de sorte qu'à des potentiels proches du potentiel de repos les NMDAR sont bloqués par le magnésium ( $\text{Mg}^{2+}$ ). Ce n'est que lors d'une dépolarisation aux environs de -40mV que les NMDAR peuvent se défaire de leur blocage par le  $\text{Mg}^{2+}$  (Hestrin S et al. 1990; Koh DS et al. 1995). Les NMDAR sont activés avec une cinétique plus lente que celle des AMPAR, de l'ordre de la centaine de millisecondes. De plus, les NMDAR ont une perméabilité marquée pour le  $\text{Ca}^{2+}$  de sorte que l'un de leurs rôles est la transduction de

l'activité neuronale par l'augmentation de la concentration intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$  (Mayer ML et Westbrook GL 1987).

La forte sensibilité au voltage des NMDAR, dû à leur blocage par le magnésium, leur confère un rôle supplémentaire de détecteurs moléculaires de coïncidence (Bliss TV et Collingridge GL 1993). Basé sur le conditionnement classique qui suggère la nécessité de pairage d'un stimulus non-conditionnant à un stimulus conditionnant pour l'obtention d'un apprentissage associatif, Hebb a proposé que le pendant neurobiologique de cet apprentissage serait la consolidation de la synapse lorsque des activités pré- et post-synaptiques sont temporellement coïncidentes (Hebb DO 1949). Dans ce modèle les NMDAR pourraient être responsables de la détection de cette coïncidence (Bliss TV et Collingridge GL 1993). La plasticité synaptique à long-terme a depuis été très étudiée dans l'hippocampe à cause des évidences de son implication dans la mémoire et l'apprentissage (Teyler TJ et DiScenna P 1985). Maintenant, il est clairement établi que l'induction de la potentialisation et de la dépression à long terme sont dépendants, entre autres, de l'activation des NMDAR (Morris RG et al. 1986), bien que d'autres types de plasticité synaptique indépendants des NMDAR sont maintenant connus (McBain CJ 2008; Bashir ZI et al. 1993a).

### *Les récepteurs KA*

Pendant longtemps inclus, avec les AMPAR, dans la catégorie des récepteurs non-NMDA, les récepteurs KA (KAR) ont depuis une quinzaine d'années été étudiés plus en détails. Nombre d'études ont montré leurs caractéristiques bien distinctes des AMPAR et

leur rôle particulier dans la transmission synaptique (Paternain AV et al. 1995; Chittajallu R et al. 1996). Dans l'hippocampe, des sites de liaison du KA ont été montrés au niveau des cellules granulaires du DG, dans la couche pyramidale du CA3 et dans le *stratum lucidum* où la plus haute densité de ces récepteurs a été montrée (Berger M et Ben-Ari Y 1983; Schmitz D et al. 2001), ainsi que dans le CA1 où une distribution claire mais éparse a été montrée (Monaghan DT et Cotman CW 1982). La localisation précise des KAR a longtemps été controversée mais des évidences suggèrent une présence pré-synaptique de ces récepteurs notamment sur les terminaisons axonales des cellules granulaires (Represa A et al. 1987, Semyanov A et Kullmann DM 2001), en plus de leur présence post-synaptique (Schmitz D et al. 2000). Au niveau des interneurons du CA1, l'activation des KAR dendritiques et somatiques favorise une excitation des interneurons menant à une inhibition subséquente des cellules pyramidales (Frerking M et al. 1998, Cossart R et al. 1998). Par contre, la présence de KAR pré-synaptiques sur les terminaisons axonales des interneurons a pour rôle de diminuer la libération synaptique de GABA sur les cellules pyramidales (Rodriguez-Moreno A et al. 1997; Rodriguez-Moreno A et al. 2000; Frerking M et al. 1999; Mulle C et al. 2000) ce qui résulte en une augmentation de l'excitation.

Les KAR sont des tétramères formés à partir des sous-unités GluR5-7 (Wenthold RJ et al. 1994; Petralia RS et al. 1994), KA1 et KA2 (Herb A et al. 1992); ou encore GRIK1-3 pour GluR5-7 et GRIK4-5 pour KA1 et KA2 (Szpirer C et al. 1994) selon la nomenclature génétique. La sous-unité GluR5 est exprimée en abondance par les interneurons du CA1 (Cossart R et al. 1998) ce qui peut expliquer l'expression diffuse des

sites de liaison du KA dans le CA1, tandis que la sous-unité GluR6 est plutôt présente du côté pré-synaptique sur les terminaisons axonales des cellules granulaires du gyrus dentelé (DG) (Wisden W et Seeburg PH 1993).

Le rapport du courant en fonction du voltage des KAR est similaire à celui des AMPAR décrivant une droite (Hille B 2001). Par contre l'amplitude du courant post-synaptique excitateur (CPSE) est plus faible et la cinétique d'activation est plus lente pour les KAR, comparativement aux AMPAR, étant de l'ordre des dizaines de millisecondes (Frerking M et al. 1998; Cossart R et al. 1998). La caractéristique des KAR d'avoir une conductance persistant après l'élimination du glutamate de la fente synaptique peut, à la manière des NMDAR mais à moindre échelle, favoriser une intégration de l'input synaptique et maintenir un état dépolarisé de la cellule.

### **1.2.3.2 Transmission synaptique médiée par les récepteurs glutamatergiques métabotropes**

En plus de se lier aux récepteurs ionotropes, le glutamate agit également sur des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR). Les GPCR sont formés de 7 domaines transmembranaires (Savarese TM et Fraser CM 1992), d'un site de liaison du neurotransmetteur (O'Hara PJ et al. 1993), et d'un site de liaison intracellulaire pour le couplage à une protéine G (Bouvier M et al. 1995). Les protéines G sont formées de trois sous-unités (Katada T et al. 1984): les sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  formant un complexe dimérique pouvant se lier à certains canaux ioniques, et la sous-unité  $\alpha$  pouvant se lier au récepteur et à des enzymes effectrices telles l'adénylate cyclase (AC), la phospholipase C (PLC), la phospholipase A (PLA), la tyrosine kinase ou encore la MAP kinase, faisant d'elles des

protéines transductrices. La sous-unité  $\alpha$ , dont il existe divers types comme s, i/o et q/11, se lie au nucléotide guanosine tri-phosphate (GTP) et contient une activité GTPase qui permet de stimuler ou inhiber un effecteur, selon le type de sous-unité  $\alpha$  auquel il est lié.

Les récepteurs métabotropes du glutamate (mGluR) sont composés de 8 sous-types de récepteurs, mGluR1 à 8. Ces huit sous-types sont divisés en trois groupes selon des critères incluant la protéine G à laquelle ils sont associés, leurs affinités pharmacologiques pour des agonistes spécifiques, leur homologie de séquence et leurs propriétés biochimiques (Kandel ER et al. 2000).

Les mGluR de groupe I (mGluRI) sont sélectivement activés par le 3,5-dihydroxyphenylglycine (DHPG) (Schoepp DD et al. 1994) et sont sélectivement bloqués par l'acide (RS) aminoindan-1,5-dicarboxylique (AIDA) (Pellicciari R et al. 1995; Renaud J et al. 2002). Les mGluRI sont classiquement couplés à la protéine Go/q, impliquée dans l'activation de la PLC et les voies de l'inositol 1,3,5-trisphosphate/diacylglycerol (IP<sub>3</sub>/DAG), bien que des études en système hétérologue ont montré aussi l'implication d'autres types de protéines G et d'autres effecteurs (Houamed KM et al. 1991; Aramori I et Nakanishi S 1992). Les mGluRI comprennent deux sous-types soient mGluR1 et mGluR5 qui diffèrent essentiellement au niveau de la séquence de l'extrémité C-terminale intracellulaire de la protéine (Houamed KM et al. 1991), et sont sélectivement bloqués par différents antagonistes soient le LY367385 pour les mGluR1 (Seal AJ et al. 1994; Brabet I et al. 1995; Clark BP et al. 1997), et le 2-méthyl-6-(phényléthynyl)-pyridine (MPEP) pour les mGluR5 (Gasparini F et al. 1999; Salt TE et al. 1999).

Les mGluRII sont activés par l'agoniste DCG-IV (Gereau RW et Conn PJ 1995) et sont bloqués par la 2S,1'S2S'-2-méthyl-2-(2'-carboxycyclopropyl) glycine (MCCG) (Vignes M et al. 1995). Ils sont composés des sous-unités mGluR2 et mGluR3 et sont couplés à la protéine Gi qui inhibe l'adénylate cyclase. Par ailleurs, les mGluRIII comprennent les sous-unités mGluR4, mGluR6, mGluR7 et mGluR8. Ils sont, comme les mGluRII, négativement couplés à l'adénylate cyclase mais sont spécifiques à différents agonistes et antagonistes: ils sont activés par le L-2-amino-4-phosphonobutyrate (L-AP4) et bloqués par le (R,S)-α-méthylserine-O-phosphate (MeSOP).

Selon des études immuno-histochimiques les mGluRI sont largement exprimés dans le cerveau, mais sont particulièrement exprimés dans la région CA3 de l'hippocampe (Fotuhi M et al. 1994; Lujan R et al. 1996). Dans la région CA1, chez le sous-type mGluR1, mGluR1α est la seule isoforme produite par épissage alternatif dans les cellules non-pyramidales de l'hippocampe (Baude A et al. 1993; Shigemoto R et al. 1997; Ferraguti F et al. 1998) et est fortement localisée dans les couches *oriens* et *alveus* au niveau des interneurons. Le sous-type mGluR5 est exprimé dans toutes les couches sauf la couche pyramidale. Parmi les autres mGluR que l'on retrouve dans le CA1, le sous-type mGluR7 (groupe III) est aussi exprimé dans toutes les couches non-pyramidales, tandis que les sous-types mGluR2 et 3 (groupe II) sont exprimés uniquement dans les couches profondes (L/M) (Shigemoto R et al. 1997).

La transmission synaptique médiée par les mGluR produit une réponse très lente, qui peut durer des dizaines de secondes (Poncer JC et Miles R 1995). Cette réponse comprend l'implication d'un signal externe qui agit comme premier messager sur un

récepteur métabotrope, comme la liaison du glutamate sur le récepteur mGluR1. La transduction de ce signal s'effectue par l'intermédiaire d'une protéine G intracellulaire à une enzyme effectrice, comme la transduction du signal glutamatergique par la protéine Gq qui active la phospholipase C (PLC) en la phosphorylant. Une fois activé, ce premier effecteur entraîne la formation de molécules agissant à titre de seconds messagers, comme la formation d'inositol triphosphate (IP3) et de diacylglycérol (DAG) à partir de l'hydrolyse du phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>). Ces seconds messagers agissent sur des effecteurs secondaires pour produire une réponse ou pour agir sur d'autres effecteurs, ainsi, l'IP3 et le DAG produisent respectivement une relâche de calcium des stocks intracellulaires et l'activation de la phosphokinase C (PKC) qui peut agir sur d'autres effecteurs cytoplasmiques tels que Raf et Ras ou sur d'autres enzymes effectrices telle que l'adénylate cyclase. Ainsi, le fait qu'un seul neurotransmetteur puisse agir sur diverses enzymes effectrices activant des cascades différentes, favorise une diversité de réponses intracellulaires.

L'efficacité de la transmission synaptique peut être augmentée ou diminuée pour une longue période de temps lors des phénomènes de LTP et de LTD respectivement. L'activation des mGluRI régule l'induction de la potentialisation à long terme (LTP) (Bashir ZI et al. 1993a; Bortolotto ZA et al. 1994; Raymond CR et al. 2000) et induit la dépression à long-terme (LTD) (Bashir ZI et al. 1993b; Oliet SH et al. 1997; Bolshakov VY et Siegelbaum SA 1994; Huber KM et al. 2000) dans les cellules pyramidales. Au niveau de certains interneurones, la LTP est dépendante des mGluRs (Topolnik L et al. 2006; LeVasseur M et al. 2008). Ce phénomène de LTP est observé à la synapse

excitatrice sur les interneurons mais est exprimé de manière cellule-spécifique. En effet, la LTP est provoquée par une stimulation  $\theta$  couplée à une dépolarisation post-synaptique dans les interneurons O/A mais non dans ceux du R/LM (Ouardouz M et Lacaille JC 1995) et indépendamment de l'activation de NMDAR (Perez Y et al. 2001). Il a récemment été montré que le mécanisme par lequel s'effectue cette LTP dans les interneurons comprend l'activation du sous-type mGluR1 $\alpha$ , la phosphorylation de la kinase régulée extracellulairement (ERK) via Src (Topolnik L et al. 2006) et l'entrée de calcium via les canaux récepteurs de potentiels transitoires (TRP). Par ailleurs, à l'inverse de cette LTP de type hebbien, un autre type de LTP NMDAR-indépendante mais dépendante des canaux AMPA perméables au calcium a également été décrit dans des interneurons O-LM, axo-axoniques et à panier, soit la LTP de type anti-hebbien où une forte activité pré-synaptique, sans dépolarisation post-synaptique, est nécessaire (Lamsa KP et al. 2007).

### **1.2.3.3 Transmission synaptique médiée par les récepteurs GABAergiques**

L'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) est le principal neurotransmetteur inhibiteur du cerveau. Il est synthétisé dans les interneurons inhibiteurs de l'hippocampe par l'enzyme de synthèse du GABA, la GAD (Otsuka M et al. 1966) que l'on retrouve sous deux isoformes, GAD65 et GAD67 (Erlander MG et al. 1991; Kaufman DL et al. 1991). Le GABA exerce son effet inhibiteur en se liant soit aux récepteurs ionotropes GABA<sub>A</sub>, soit aux récepteurs métabotropes GABA<sub>B</sub>, ou encore aux récepteurs GABA<sub>C</sub> présents surtout dans les cellules bipolaires de la rétine (Enz R et al. 1996). Le récepteur GABA<sub>A</sub> (GABA<sub>A</sub>R) est un hétéropentamère (Nayeem N et al. 1994) composé de plusieurs isoformes des sous-unités

( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\varepsilon$ ,  $\delta$ ,  $\rho$ , et  $\theta$ ) agencées de manière préférentielle en un nombre limité de récepteurs fonctionnels (Bonnert TP et al. 1999) qui sont perméables aux ions chlore ( $\text{Cl}^-$ ) et carbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ). L'ouverture rapide de ces récepteurs-canaux est responsable de l'inhibition synaptique et tonique dans les cellules suite à l'activation du récepteur par le GABA.

Par contre, la fonction des récepteurs GABAergiques est labile (Thompson SM et Gahwiler BH 1989). Cette fonction est dépendante d'une part, de l'activité cellulaire car la réponse GABAergique est diminuée lorsque les niveaux de calcium intracellulaire augmentent ce qui diminue la phosphorylation du récepteur GABA<sub>A</sub> par la glyceraldéhyde-3 phosphate déhydrogénase (GAPDH) (Chen QX et al. 1990; Laschet JJ et al. 2004). D'autre part, la réponse GABAergique est aussi dépendante de l'internalisation des GABA<sub>A</sub>R de manière sous-unités spécifique (Goodkin HP et al. 2008), rendant ces récepteurs non-disponibles lors d'une forte activation. Finalement, le sens de la réponse GABAergique est dépendante du potentiel de renversement du  $\text{Cl}^-$  (Staley KJ et al. 1995) tel que dicté par la présence et la fonction des cotransporteurs KCC2 et NKCC1 (Rivera C et al. 1999; Kitamura A et al. 2008). Ainsi, au cours du développement néo-natal, plutôt que d'être inhibiteur le GABA est excitateur à cause de la prédominance de l'expression de NKCC1 qui maintient la concentration de chlore intracellulaire élevée, en l'absence de KCC2 exprimé plus tard dans le développement (Wang C et al. 2002), ce qui favorise une dépolarisation du potentiel membranaire par une sortie des ions  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  (Cherubini E et al. 1998). Dans certaines cellules comme dans les cellules granulaires du DG, le GABA peut être co-libéré avec le glutamate et il a été suggéré qu'en réponse à une libération

massive de glutamate, telle une activité épileptique, un changement fonctionnel a lieu dans ces cellules, les faisant passer de cellules excitatrices à cellules inhibitrices (Sloviter RS et al. 1996).

Les récepteurs GABA<sub>B</sub> (GABA<sub>B</sub>R) sont des hétérodimères composés de sous-unités GABA<sub>B</sub>1 qui lie le neurotransmetteur et GABA<sub>B</sub>2 qui lie la protéine G (Ong J et al. 2005). Les GABA<sub>B</sub>R sont localisés pré- et post-synaptiquement (Vigot R et al. 2006) et sont couplés à deux mécanismes effecteurs: l'inhibition des canaux calciques voltage-dépendants (Lambert NA et Wilson WA 1996) et l'activation d'un canal potassique à rectification entrante protéine G-dépendant (GIRK) (Luscher C et al. 1997). Via ces mécanismes, les GABA<sub>B</sub>R génèrent une inhibition postsynaptique lente (Mott DD et al. 1999) et une inhibition présynaptique de la libération de transmetteurs (Dutar P et Nicoll RA 1988).

Tout comme les synapses excitatrices, les synapses inhibitrices du CA1 démontrent aussi une plasticité à long terme. Cette plasticité est fonction du protocole de stimulation et du type de synapse. En effet, il a été montré qu'à une même synapse inhibitrice sur les cellules pyramidales, une stimulation à haute fréquence entraîne une dépression des IPSPs tandis qu'une stimulation similaire au rythme theta (TBS) cause une LTP des IPSPs dépendante des récepteurs GABA<sub>B</sub> et mGluRs ainsi que d'une entrée de Ca<sup>2+</sup> post-synaptiques (Patenaude C et al. 2003). Par ailleurs, un même protocole de stimulation peut entraîner de la LTD ou de la LTP selon que la synapse a pour cible les dendrites ou le soma des cellules pyramidales (Mendoza E et al. 2006). Ceci suggère que des mécanismes

distincts sont impliqués dans les plasticités des synapses excitatrices et inhibitrices, et que la plasticité des synapses inhibitrices est dépendante de leur activité.

#### **1.2.3.4 Transmission synaptique médiée par d'autres récepteurs**

Bien que les principaux neurotransmetteurs de l'hippocampe soient le glutamate et le GABA, certaines terminaisons libèrent d'autres neurotransmetteurs tels la dopamine, la sérotonine (5-HT), l'acétylcholine (ACh), et des peptides neuromodulateurs, tel le neuropeptide Y.

L'ACh excite les interneurons du CA1 via les récepteurs nicotiques en provoquant un courant entrant (Jones S et Yakel JL 1997) et excite certains types d'interneurones ou en inhibe d'autres (Parra P et al. 1998) via des récepteurs muscariniques (Hajos N et al. 1998). Comme les récepteurs cholinergiques, les 5-HT<sub>3</sub> provoquent une dépolarisation dans certains interneurons via les récepteurs 5-HT<sub>3</sub> (Ropert N et Guy N 1991; Kawa K 1994) ou une hyperpolarisation dans d'autres via les récepteurs 5-HT<sub>1</sub> (Schmitz D et al. 1995). Il a été suggéré que la dopamine module l'inhibition "feed-forward" sur des interneurons via les récepteurs dopaminergiques du sous-type D<sub>4</sub> dans le CA1 (Romo-Parra H et al. 2005). La norépinéphrine a un effet excitateur sur les interneurons du CA1 via le sous-type  $\alpha$ -adrénergique mais inhibe certains interneurons dans Rad et LM via le sous-type  $\beta$ -adrenergique (Bergles DE et al. 1996).

Le peptide neuromodulateur somatostatine, peut être co-libéré à la synapse avec un neurotransmetteur classique tel le GABA et agir sur les sites post-synaptiques en diminuant les PPSI rapides (GABA<sub>A</sub>) et lents (GABA<sub>B</sub>) tout en hyperpolarisant les neurones du CA1

(Xie Z et Sastry BR 1992). Il peut, de plus, potentialiser les réponses glutamatergiques médiées par les NMDAR (Wang YT et al. 1993). Finalement, les molécules endocannabinoïdes (CB) modulent la suppression de la relâche du GABA par un effet des récepteurs CB1 pré-synaptiques sur les canaux calciques (Wilson RI et al. 2001), et les opiacés provoquent une suppression de l'output synaptique surtout des cellules à panier sur les cellules pyramidales favorisant leur excitation (Glickfeld LL et al. 2008) via les récepteurs opioïdes exprimés sélectivement sur les interneurons (Stumm RK et al. 2004).

Ainsi la grande variété de neurotransmetteurs ayant des effets excitateurs ou inhibiteurs, et la variété de sous-types de récepteurs auxquels ils se lient favorise une diversité de réponses. De plus, la modulation des transmissions glutamatergique et GABAergique par certaines molécules permet une fine régulation de l'output synaptique.

#### **1.2.3.5 Rôles fonctionnels des interneurons inhibiteurs**

Puisque les interneurons effectuent des connexions synaptiques GABAergiques sur les cellules pyramidales, ils ont donc une action inhibitrice qui module l'activité des neurones de projection du réseau hippocampique (Alger BE et Nicoll RA 1982; Lacaille JC et Schwartzkroin PA 1988b). De plus, via leurs interconnexions synaptiques complexes avec les autres éléments du réseau, les interneurons ont également un rôle de synchronisation lors de l'activité rythmique du réseau neuronal (Buzsaki G et Chrobak JJ 1995; Maccaferri G et Lacaille JC 2003; Freund TF et Buzsaki G 1996; Cobb SR et al. 1995; Klausberger T et al. 2003; Cossart R et al. 2005). L'activité rythmique du réseau de l'hippocampe joue un rôle important lors de l'exploration de l'environnement et des

processus de mémoire et d'apprentissage. À l'électroencéphalogramme (EEG), les oscillations rapides à une fréquence  $\gamma$  (30-90Hz) sont prédominantes lors de l'état d'éveil et sont impliquées dans des fonctions complexes d'intégration d'information sensorielles et de stockage des mémoires immédiates (Csicsvari J et al. 2003; Mann EO et Paulsen O 2005), tandis que le rythme  $\theta$  (4-8Hz) est visible pendant des activités d'exploration mobile et la phase du sommeil paradoxal R.E.M (Montgomery SM et al. 2008).

Les divers types d'interneurones semblent contribuer différemment aux oscillations hippocampiques puisque les interneurones CCK- et PV-immunopositifs possèdent des cinétiques de décharges distinctes en association avec l'activité rythmique *in vivo* (Klausberger T et al. 2005). Il a de plus été proposé que les décharges rythmiques des interneurones ainsi que leurs oscillations intrinsèques contribuent aux rythmes oscillatoires (Cobb SR et al. 1995). On peut donc supposer que les interneurones jouent également un rôle lors des rythmes anormaux enregistrés chez les patients épileptiques.

### **1.3 Épilepsie du lobe temporal et formation hippocampique**

En clinique, le *status epilepticus* (SE) est un état pendant lequel une crise d'épilepsie continue, ou de multiples crises sans retour à la conscience, durent pendant plus de cinq minutes (Lowenstein DH et al. 1999). Le SE est aussi appelé l'ictus. Ainsi, la période lors du SE est caractérisée comme étant la période ictale, tandis que la période entre les épisodes de crises est la période interictale (de Curtis M et Avanzini G 2001). L'activité électrique détectée au cours de ces deux périodes est le résultat de bouffées de potentiels

d'action au niveau de neurones individuels, ainsi que d'une hyper-synchronie de l'activité électrique du réseau neuronal (Stafstrom CE 2006) entraînant la formation de potentiels de champs détectés et enregistrés par des électrodes placées sur le scalp et reliées à un électroencéphalogramme (EEG).

L'EEG peut détecter l'activité d'ensemble des cellules pyramidales corticales grâce à deux de leurs propriétés. D'une part, la structure caractéristique du cortex fait que les cellules pyramidales sont orientées sensiblement dans le même sens, avec leurs dendrites près de la surface du cerveau, et d'autre part, un grand nombre de ces cellules déchargent simultanément. Lorsqu'une afférence excitatrice est activée au niveau des dendrites d'une de ces cellules, une accumulation de charges positives s'effectue dans la cellule par l'entrée massive d'ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$ , laissant le milieu extracellulaire à proximité des dendrites négativement chargé, tandis que le milieu extracellulaire près du soma est, à l'inverse, positivement chargé. Ainsi, en considérant l'ensemble des cellules pyramidales, leur orientation formant un dipôle électrique et la somme de ces dipôles créés par les centaines de cellules pyramidales engendrent un potentiel de champs décelable par des électrodes placées sur le scalp (Kandel ER et al. 2000).

Parmi les types d'activités enregistrées par les électrodes de surface, il y a l'activité normale basale généralement de faible amplitude mais de fréquences variables selon l'état d'éveil de l'individu (ex: rythme  $\alpha$  8-14 Hz éveil normal, rythme  $\theta$  4-8 Hz sommeil léger). Mais chez les individus épileptiques l'activité enregistrée à l'EEG comporte des anomalies transitoires du rythme basal se présentant sous forme de pointe (spike) correspondant à des bouffées de potentiels d'action simultanés dans un ensemble de cellules; d'onde (wave) et

de complexes pointe-onde correspondant à ces deux patrons répétés (Spehlmann R 1988), et généralement de plus grande amplitude et de rythme plus lent que le tracé obtenu chez un individu normal éveillé (Westmoreland BF 1996). L'activité inter-ictale, observée entre les périodes de crises chez les individus épileptiques, comporte néanmoins des complexes pointe-onde à l'EEG, mais elle se distingue de l'activité ictale surtout par sa durée: les décharges interictales à l'EEG durent moins de quelques secondes tandis que les décharges ictales durent au-delà de quelques secondes (Spehlmann R 1988).

Comparativement aux potentiels de surface enregistrés à l'EEG, lors du SE l'activité électrique à l'échelle neuronale enregistrée intracellulairement est composée d'enveloppes dépolarisantes surmontées de bouffée de potentiels d'action et est de courte durée. Ces décharges paroxymiques (paroxysmal depolarizing shift:PDS) sont alors qualifiées de décharges de type ictal étant de l'ordre des secondes, tandis que les décharges entre les crises sont qualifiées de type inter-ictal étant de l'ordre des centaines de millisecondes (Dichter MA 1987).

Parmi les études *in vitro*, des données sur tranches de néocortex, obtenues de cerveaux humains, ont permis de mettre en évidence l'implication de plusieurs facteurs dans la TLE. D'une part l'implication des récepteurs ionotropes glutamatergiques, avec la surexpression des AMPAR dans tous les tissus provenant des patients épileptiques, et des densités différentes de récepteurs NMDA entre les foyers épileptiques avec ou sans décharges spontanées (Zilles K et al. 1999; Isokawa M et Levesque MF 1991). D'autres études sur le néocortex ont montré que l'inhibition demeure fonctionnelle, malgré l'altération du système GABAergique dans le tissu humain épileptique, par la présence

d'interneurones inhibiteurs et de l'inhibition GABAergique (Menendez de la Prida L et al. 2002) ou par l'implication de ces interneurones dans la modulation de l'activité épileptique (Avoli M et al. 1997). Par ailleurs, dans l'hippocampe, la présence de nouveaux axones aberrants du gyrus dentelé formant des fibres collatérales de la voie des fibres mossues est associé à une augmentation du nombre d'épines dendritiques des cellules granulaires sur ces mêmes cellules en tissu épileptique humain (Isokawa M 1997).

La recherche sur des tranches de tissu épileptique humain comporte néanmoins des inconvénients majeurs tels la grande fragilité du tissu, et la faible disponibilité des tissus contrôle pour des raisons éthiques. Ainsi, des modèles expérimentaux ont dû être développés afin d'étudier la pathophysiologie du TLE de manière fiable et reproductible.

### **1.3.1 Modèles expérimentaux du TLE**

Des modèles animaux arborant un comportement de *status epilepticus* et démontrant une pathophysiologie similaire à celle de l'humain ont été mis au point pour l'étude des principes de base de fonctionnement du cerveau, des mécanismes de l'épileptogénèse, des bases neurophysiologiques du TLE et de l'efficacité des drogues anti-convulsivantes.

#### **1.3.1.1 Divers modèles du TLE**

Parmi les structures du système limbique, l'hippocampe est la région la plus atteinte par la mort cellulaire lors des crises récurrentes dans le TLE. C'est, de plus, la région à partir de laquelle origine l'activité épileptique avant de se propager aux autres structures du cerveau (Stoop R et Pralong E 2000). Ainsi, un bon modèle du TLE en est un qui reproduit chez l'animal: 1) les crises comportementales observées chez l'humain, 2) l'activité

synchrone du réseau neuronal de l'hippocampe et la propagation de cette activité, ou 3) la perte et/ou la réorganisation cellulaires présentes dans l'hippocampe humain.

### *Modèles in vivo*

#### *Modèle "Kindling"*

Le modèle du "kindling" est obtenu par des applications focales répétées d'un stimulus électrique ou chimique (comme par exemple avec le pentylènetétrazole (Gutierrez R 2000) à une intensité ou dose initialement sous-convulsive, et entraînant éventuellement des crises (Goddard GV et al. 1969; McNamara JO et al. 1993). La magnitude de ces crises augmente à chaque stimulus, selon l'échelle comportementale des crises de Racine (Racine RJ 1972). L'intensité des crises évoquées est évaluée en cinq stades de crises comportementales allant de clonies faciales et mouvements de la tête à la perte générale de posture "rearing and falling", et correspondent selon la classification internationale des crises chez l'humain (Gastaut H 1970) à des crises allant de partielles à secondairement généralisées (Sutula TP 1991). Le "kindling" a l'avantage de reproduire de manière fiable et contrôlée le processus graduel d'épileptogénèse. Ceci a permis d'identifier la progression des altérations induites en fonction du nombre de crises évoquées, celles-ci débutant avec de l'apoptose, de la neurogenèse, de la gliose, du sprouting et une sclérose de l'hippocampe dans les 30 premières stimulations, puis suit la perte d'interneurones et la diminution de l'inhibition après environ 90 stimulations (Sutula TP 1991).

#### *Modèles post-status epilepticus*

Ces modèles sont obtenus suite à un événement causant un *status epilepticus* (SE) dans la période aigüe pouvant durer quelques heures, suivi d'une période latente de deux à six semaines, et l'apparition de crises spontanées récurrentes dans la période chronique (Cavalheiro EA et al. 1991). Le SE peut être provoqué par une simple stimulation électrique soutenue dans une région du lobe temporal, telle l'hippocampe (Rempe DA et al. 1997), ou par une stimulation chimique. Les deux agents proconvulsivants typiquement employés pour induire le SE sont l'acide kaïnique et la pilocarpine qui, bien qu'ayant des cibles différentes, causent une sclérose de l'hippocampe similaire (Curia G et al. 2008). Dans le cas du modèle pilocarpine (Turski WA et al. 1983), l'injection systémique ou intra-cérébrale de l'agoniste muscarinique entraîne une diminution des afférences excitatrices sur les interneurons du DG (Doherty J et Dingledine R 2001) tandis que les afférences excitatrices sur les interneurons du CA1 (notamment ceux innervant le soma des cellules pyramidales) ne sont pas affectées (Esclapez M et al. 1997). Il est à noter que ce résultat est contraire à la diminution des afférences excitatrices évoquées sur les interneurons R/LM du CA1 dans le modèle KA (Morin F et al. 1998a); ce modèle sera discuté plus bas. L'induction du SE par la pilocarpine est dépendante de l'activation des récepteurs muscariniques puisque le SE n'est pas induit dans des animaux mutants déficients en récepteur M1 (Hamilton SE et al. 1997), et son induction est bloquée par l'atropine, un antagoniste muscarinique (Clifford DB et al. 1987). Il est toutefois possible que le maintien subséquent des crises soit dépendant de l'activation des NMDAR (Smolders I et al. 1997). En plus de la présence de crises récurrentes et spontanées chez l'animal (Cavalheiro EA et al. 1991, les modèles post-*status epilepticus* ont comme

principal avantage qu'ils reproduisent fidèlement les patrons de perte cellulaire et de réarrangement de fibres dans l'hippocampe observés chez les patients TLE.

### *Modèles génétiques*

En plus des modèles *in vivo*, il existe des souches de souris et de rats génétiquement épileptiques, tels les rats GAERS (Marescaux C et al. 1992) et WAG/Rij (Coenen AM et al. 1992) spécifiques à l'épilepsie de type absence, les souris avec des délétions spécifiques pour des gènes codant pour des canaux ioniques tel les calciques et sodiques (Barclay J et Rees M 1999), et les souris EL répliquant des crises partielles complexes secondairement généralisées typiques du TLE et montrant une diminution de l'expression de transporteurs gliaux du glutamate dans le CA3 (Ingram EM et al. 2001). Outre les modèles chez le rat et la souris, certains modèles de l'épilepsie ont été développés chez d'autres espèces animales afin de mieux comprendre les différences inter-espèces qui surviennent. Ces modèles comprennent des animaux tels la gerboise, le chien, le babouin et même la drosophile, où le patron de décharge d'activité synchrone exprimé dans des muscles des ailes suite à un traitement d'électro-choc a permis de mettre en évidence des mutations génétiques de certains canaux potassiques et sodiques (Lee J et Wu CF 2002; Lee J et Wu CF 2006).

### *Modèles in vitro*

Dans le but d'étudier l'activité épileptiforme à l'échelle du réseau, cellulaire ou sub-cellulaire, il est nécessaire d'utiliser des modèles *in vitro* de l'épilepsie. Ceux-ci emploient des tranches de cerveau en culture ou des tranches aiguës provenant d'animaux épileptiques ou naïfs. Dans ce dernier cas, l'activité épileptiforme est déclenchée par

l'application de stimulations électriques ou d'agents pharmacologiques sur la tranche, ou par des modifications du milieu extracellulaire. Les modèles *in vitro* sont des versions simplifiées qui reproduisent un aspect spécifique d'un type d'épilepsie, mais étant donné la facilité de contrôle de multiples paramètres tels les concentrations ioniques intra- et extracellulaire, la présence d'agonistes et d'antagonistes, la température, ils ont l'avantage de permettre une compréhension détaillée de l'aspect étudié.

#### *Variations de concentrations ioniques*

La modification des concentrations extracellulaires des principaux ions composant le liquide cérébro-spinal artificiel (ACSF) affecte l'excitabilité neuronale, la transmission synaptique et l'activité intra-cellulaire (Heinemann U et al. 2006). La concentration extracellulaire de calcium ( $[Ca^{2+}]_o$ ) *in vivo* est d'environ 1,2mM mais des concentrations plus élevées (1,6 - 2mM) sont en général employées dans l'ACSF pour pallier l'effet chélateur du  $HCO^{3-}$  (Heinemann U et al. 2006). Le fait de diminuer la  $[Ca^{2+}]_o$  à 0mM bloque la transmission synaptique et résulte en des décharges en bouffées spontanées, en plus du développement d'activité épileptiforme synchrone dans la tranche (Jefferys JG et Haas HL 1982; Taylor CP et Dudek FE 1982). Les décharges obtenues sont entre autres dues au fait que moins de  $Ca^{2+}$  est disponible pour l'activation des canaux hyperpolarisants  $K^+-Ca^{2+}$ -dépendants (Alger BE et Nicoll RA 1980).

La concentration extra-cellulaire du potassium ( $[K^+]_o$ ) *in vivo* est d'environ 3mM (Lux HD et al. 1986) alors qu'elle est de près de 140mM dans la cellule. Le gradient de concentration du  $K^+$  au potentiel de repos de -60mV créant une force électromotrice plus

importante que son gradient électrique, entraîne une sortie de  $K^+$  hyperpolarisant la cellule. Ainsi une augmentation de la  $[K^+]_o$  freine l'hyperpolarisation et favorise l'excitabilité de la cellule. En effet, l'augmentation de la  $[K^+]_o$  à 8,5mM dans la tranche est suffisante pour induire des décharges épileptiformes de type ictal dans la région CA1 durant de 20 à 90 secondes (Traynelis SF et Dingledine R 1988). Le modèle de haute  $[K^+]_o$  est souvent combiné au modèle de zéro  $[Ca^{2+}]_o$  et entraîne des décharges récurrentes dans le CA3 ainsi que de l'activité de type ictal dans le CA1 (Leschinger A et al. 1993).

En conditions physiologiques, l'ion  $Mg^{2+}$  effectue un bloc des NMDAR à des potentiels membranaires inférieurs à -40mV (Mayer ML et al. 1984). À basse concentration extracellulaire de  $Mg^{2+}$  ( $[Mg^{2+}]_o$ ) les NMDAR perdent ce bloc et deviennent activable contribuant à la hausse de l'excitabilité. La concentration de l'ion magnésium *in vivo* mesurée dans les ventricules cérébraux se situe entre 0,9 et 1,2mM mais peut être plus élevée dans l'espace interstitiel (Heinemann U et al. 2006). Ainsi une diminution de la concentration extra-cellulaire de magnésium  $[Mg^{2+}]_o$  de 2mM à 1mM a un effet facilitateur sur la transmission synaptique (Hamon B et al. 1987), tandis qu'à 0,9mM il y a induction d'activité épileptiforme dans des tranches de rats jeunes (Gloveli T et al. 1995), se propageant du CA3 au CA1.

#### *Agonistes des mGluRI*

L'activation des mGluR des groupes II et III est connue comme ayant un effet anticonvulsivant via une inhibition pré-synaptique de la libération du glutamate (Attwell PJ et al. 1998; Gasparini F et al. 1999). À l'inverse, il est connu que l'activation des mGluRI,

a un effet pro-convulsivant (Camon L et al. 1998; Chapman AG et al. 2000), et ce à long terme bien après la présence de l'agoniste (Merlin LR et Wong RK 1997). Ainsi diverses études emploient les agonistes des mGluRI comme modèle *in vitro* de l'épilepsie. L'application de l'agoniste mGluRI DHPG induit une activité épileptiforme de type ictal avec une activité synaptique synchrone localisée surtout au CA3 à cause de la forte concentration de ces récepteurs (Fotuhi M et al. 1994; Lujan R et al. 1996). De plus, l'induction de cette activité de type ictal est bloquée par la présence de l'un ou l'autre des antagonistes des sous-types mGluR1/5 (Karr L et Rutecki PA 2008). Il a été montré que l'implication des mGluRI dans l'activité épileptiforme passe par la voie de la phospholipase C (PLC) (Chuang SC et al. 2001), mais les mGluRI peuvent aussi être impliqués dans une activité épileptiforme indépendante de la voie de la PLC, dépendamment du type d'activation, dans les cellules pyramidales du CA3 (Lee AC et al. 2002).

#### *Antagonistes des canaux ioniques*

La bicuculline (BIC) est un antagoniste des récepteurs GABAergiques ionotropes (Krnjevic K 1970) et des canaux potassiques calcium-dépendants à petite conductance (SK) responsables de la post-hyperpolarisation (Johnson SW et Seutin V 1997; Khawaled R et al. 1999). L'application de BIC sur la tranche diminue l'inhibition du réseau par les interneurons inhibiteurs principalement en empêchant le GABA de se lier aux récepteurs (Simmonds MA 1980). Par ailleurs la picrotoxine, aussi un antagoniste GABA<sub>A</sub>, agit plutôt en bloquant l'entrée de chlore (Cl<sup>-</sup>) par le pore du canal (Etter A et al. 1999). Ces deux antagonistes empêchent la repolarisation des cellules suite aux potentiels d'action et favorisent l'hyperexcitabilité du réseau.

La 4-aminopyridine (4-AP) est un antagoniste des canaux potassiques ( $K^+$ ) voltage-dépendants responsables des courants transitoires de type  $I_A$  et  $I_D$  (Ficker E et Heinemann U 1992; Storm JF 1987, Storm JF 1988). Ces courants  $K^+$  sont surtout impliqués dans la repolarisation et la détermination de la fréquence des potentiels d'action lors d'un burst dans des neurones spinaux (Segal M et al. 1984). Au niveau des cellules de l'hippocampe, le bloc de ces courants par la 4-AP entraîne une augmentation de la concentration pré-synaptique de  $Ca^{2+}$  (Jones RS et Heinemann U 1987) favorisant une potentialisation de la relâche de glutamate (Rutecki PA et al. 1987). Ceci a pour effet de favoriser les réponses glutamatergiques ionotropes, mais également de recruter les récepteurs glutamatergiques métabotropes (Perreault P et Avoli M 1991). Au niveau du réseau de neurones, la 4-AP engendre de l'activité épileptiforme dans l'hippocampe (Heinemann U et al. 2006) et les structures parahippocampiques telles le EC, le subiculum, le néocortex temporal (Avoli M 1996) ainsi que dans l'amygdale (Klueva J et al. 2003). Ainsi, l'ajout de 4-AP à une tranche désinhibée par la bicuculline fait passer le réseau hyperexcitable présentant des décharges de type inter-ictal (Khalilov I et al. 1997), à des décharges prolongées de type ictal, et permet de mettre en évidence l'activation de récepteurs métabotropes (Merlin LR et al. 1995; Lee AC et al. 2002). De plus, l'application simultanée des deux antagonistes, ou le modèle BIC+4-AP, entraîne dans la tranche une activité épileptiforme qui est résistante aux drogues anti-convulsivantes (phénytoïne, carbamazépine, acide valproïque et phénobarbital). Selon Brückner et al., ceci fait en sorte que le modèle BIC+4-AP constitue un modèle de l'épilepsie intractable à la médication, tel que la TLE (Bruckner C et al. 1999).

### 1.3.1.2 Modèle KA

Le modèle KA développé par Ben-Ari à la fin des années 70 a été très utilisé surtout pour la compréhension de l'hyperexcitabilité de l'hippocampe et de l'épileptogénèse (Ben-Ari Y et al. 1979). Ce modèle emploie l'acide kainique (KA), un agoniste glutamatergique se liant préférentiellement aux récepteurs kainate mais aussi aux récepteurs AMPA bien qu'avec une moindre affinité (Werner P et al. 1991). Le KA génère une réponse lente qui ne se désensibilise que peu ou pas en se liant à ces récepteurs comparativement au glutamate, de sorte que le KA exerce un effet neurotoxique (Hampson DR et Manalo JL 1998). Selon les études utilisant le KA *in vivo* quatre modes d'injection sont employés: 1) intra-cérébroventriculaire (i.c.v.) (Morin F et al. 1998b; Perez Y et al. 2006; Cossart R et al. 2001), 2) intra-hippocampique (Represa A et al. 1987; Schwarcz R et al. 1978), 3) intra-péritonéal (i.p.) (Renaud J et al. 2002) et 4) sous-cutané (s.c) (Najm IM et al. 1998). Les quatre types d'injection engendrent un *status epilepticus*, mais entraînent un patron de perte neuronale différent. Dans les deux premiers types la perte neuronale est plus localisée, tandis que l'injection i.p. ou sous-cutanée cause une lésion qui s'étend au-delà de l'hippocampe (Ben Ari Y 1985).

Lorsqu'injecté chez le rat éveillé (i.p. ou s.c.), le KA entraîne tout d'abord un *status epilepticus* accompagné de mouvements involontaires dits "wet dog shake, rearing, falling", puis il s'ensuit des crises récurrentes, la mort de cellules pyramidales du CA3 et CA1, des cellules du hile du DG et une perte sélective des interneurons O/A du CA1, ainsi qu'une hyperexcitabilité de l'hippocampe (Nadler JV 1981, Ben Ari Y 1985, Best N et al. 1993, Williams S et al. 1993, Perez Y et al. 1996, Morin F et al. 1998b, Franck JE et

Schwartzkroin PA 1985). En plus de l'hippocampe, le status épilepticus causé par le KA (i.p. et s.c) engendre aussi des dommages dans le complexe amygdalien : on y observe une perte des interneurons marqués à la somatostatine deux semaines post-injection (Tuunanen J et al. 1996) favorisant une hyperexcitabilité de l'amygdale en partie due à la diminution de l'inhibition (Smith BN et Dudek FE 1997).

Certaines études ont suggéré qu'un effet direct du KA lors d'injections systémiques ou intra-cérébroventriculaires soit responsable de la neurotoxicité et de la perte sélective de certains neurones soit par un effet direct sur la sous-unité GluR6 des récepteurs KA qui est impliquée dans la transmission synaptique et l'épileptogénèse (Mulle C et al. 1998), soit par l'action directe d'une concentration élevée de KA sur les cellules parvalbumine-positives sans expression préalable de la HSP-72 empêchant toute tolérance au KA (Best N et al. 1996), ou encore par le phénomène de dendrotoxicité distale tel qu'observé dans les interneurons somatostatinerigiques suite à une relâche excessive de glutamate (Oliva AA, Jr. et al. 2002). Ces exemples d'effets directs sont en opposition au "*two-hit hypothesis*", hypothèse voulant que les crises initiales causées par le KA soient plutôt la cause du processus de l'épileptogénèse (Schmid R et al. 1999; Ben-Ari Y 2001). Il y a ainsi nécessité d'avoir un premier traumatisme au système nerveux central (ex. convulsions causées par une infection ou une forte fièvre prolongée) notamment à un jeune âge causant des changements au cerveau le rendant vulnérable, ce qui fait en sorte que des convulsions subséquentes se transforment rapidement en véritables crises épileptiques récurrentes (Schmid R et al. 1999; Hoffmann AF et al. 2004; Somera-Molina KC et al. 2007). Un autre exemple de cette 'double insulte' est montré par une lésion corticale néonatale

effectuée chez le rat qui diminue le seuil de déclenchement de convulsions fébriles généralisées et prolonge ces manifestations par rapport aux animaux non-lésés (Scantlebury MH et al. 2004).

L'acide domoïque, un autre agoniste glutamatergique présent dans certaines espèces d'algues, a également la capacité de se lier aux KAR et d'avoir un effet neurotoxique (Stewart GR et al. 1990) tel qu'il a été observé au Canada lors d'une intoxication à l'acide domoïque suite à l'ingestion par plusieurs personnes de moules contaminées (Olney JW et al. 1990). Dans le cas de l'acide domoïque (DA), la neurotoxicité entraîne de la perte cellulaire dans le CA3 et CA1 par un processus de nécrose impliquant la transcription des gènes Bcl-2 et Bax (Ananth C et al. 2001)

### **1.3.2 L'activité épileptiforme dans le circuit hippocampique**

#### 1.3.2.1 Hyperexcitabilité du réseau

Étant donné que l'activité qui a lieu dans une tranche de cerveau de rat est différente de celle chez un individu atteint du TLE, on ne peut pas parler de réelle condition épileptique qui ne peut se manifester que dans un cerveau in vivo. Lorsque chez des patients une activité électro-encéphalographique avec des caractéristiques typiques de pointe-onde survient en absence de manifestation clinique, l'activité est dite épileptiforme puisqu'elle ne correspond pas et ne mène pas nécessairement à une crise épileptique (Engel J Jr 1989). La condition épileptiforme en tranche fait plutôt référence à un état d'hyperexcitabilité du réseau neuronal dû à des modifications aiguës ou chroniques. Tel que vu précédemment, le KA est un de ces agents pharmacologiques qui cause de

l'hyperexcitabilité dans le circuit hippocampique par son effet excitotoxique. L'excitotoxicité a été décrite par Olney (Olney JW et Sharpe LG 1969) pour signifier les dommages causés par le glutamate libéré massivement lors de crises d'épilepsie. L'utilisation de ce terme a, depuis, été élargie aux dommages causés par d'autres molécules telles le KA, l'AMPA et le DA. Dans la matière blanche de la moelle épinière par exemple, l'excitotoxicité du glutamate est associée à une entrée massive de calcium médiée par les AMPAR (Li S et Stys PK 2000). D'autre part, en tranche d'hippocampe en culture la toxicité médiée par les récepteurs AMPA est diminuée par les acides gras poly-insaturés (Ménard C et al. 2009), pouvant expliquer en partie les bienfaits de la diète cétogène sur les crises d'épilepsie chez les enfants (Schwartz RH et al. 1989).

#### *Les décharges synchrones*

Le concept d'hyperexcitabilité est principalement associé à l'apparition de décharges synchrones dans un réseau de neurones excitateurs. Dans des tranches d'hippocampe, la région CA3 est très susceptible à ce type d'activité synchrone qui se développe lorsque l'inhibition par les cellules GABAergiques est diminuée (Cohen I et al. 2006). La perte d'inhibition mène à la propagation des décharges en bouffée des cellules pyramidales via les fibres excitatrices récurrentes (Miles R et Wong RK 1987). Ce phénomène de l'activité rythmique et synchrone a été reproduit par modélisation de la région CA3 de l'hippocampe et est dépendant de trois facteurs: 1) des propriétés intrinsèques des cellules pyramidales du CA3, notamment leur capacité de décharger en bouffée; 2) de l'inter-connectivité des cellules pyramidales du CA3 via les fibres récurrentes et 3) de la diminution de l'inhibition

GABAergique (Traub RD et al. 1989). L'hyperexcitabilité de la région CA3 peut, entre autres, être exacerbée par le "*sprouting*" des fibres mossues du DG (Mello LE et al. 1993) et par la neurogénèse ayant lieu en permanence dans le DG mais qui connaît une recrudescence lors de l'activité épileptiforme (Parent JM et al. 1997).

Certaines études ont tenté de comprendre le lien entre les différentes composantes de la formation hippocampique lors de la propagation de l'activité épileptiforme en tranche *in vitro*. Ces études ont trouvé que cette propagation ne suivait pas toujours le parcours de la boucle tri-synaptique classique de l'hippocampe lors d'une activité de type ictale. Elle peut outrepasser le DG et le CA3 pour se rendre directement au CA1 à partir du EC par la voie temporo-ammonique (Barbarosie M et al. 2000; D'Antuono M et al. 2002; Shetty AK 2002). Elle peut aussi outrepasser le DG pour se rendre au CA3, et ensuite effectuer une "rétroprojection" vers le DG contribuant potentiellement à l'activité épileptiforme (Scharfman HE 2007).

#### *La perte d'inhibition*

Dans le modèle KA, la région CA1 est très susceptible à l'hyperexcitabilité entre autre à cause de la perte d'interneurones (Morin F et al. 1998b). Cette perte n'est toutefois pas totale et on retrouve des interneurones du CA1 qui survivent au traitement par le KA. On parle donc de perte sélective d'interneurones. Les interneurones qui sont touchés sont ceux de la couche O/A avec un arbre dendritique horizontalement orienté (Lacaille JC et Schwartzkroin PA 1988a), plus spécifiquement ceux qui sont PV-, SS- et GAD-immunopositifs (Best N et al. 1993; Morin F et al. 1998b). Il a été montré que ces

interneurones "vulnérables" projettent leur axone dans la couche L/M au niveau des dendrites distales des cellules pyramidales du CA1 (Franck JE et al. 1988) ayant un effet important sur le contrôle de l'excitation dendritique de ces cellules et l'intégration des potentiels post-synaptiques (Maccaferri G et McBain CJ 1995; Miles R et al. 1996). Bien que chez l'animal jeune les cellules pyramidales du CA3 sont moins vulnérables au traitement par le KA (Holmes GL et Ben-Ari Y 2001), la perte sélective d'interneurones du CA1 a quand-même lieu chez les jeunes rats (Renaud J et al. 2002). Par ailleurs, les interneurones dont l'axone projète dans la couche *pyramidale* telles les cellules à panier sur le corps cellulaire ou les cellules axo-axoniques ne sont pas vulnérables dans le modèle KA (Cossart R et al. 2001) et continuent d'assurer un certain contrôle sur les cellules pyramidales (Franck JE et al. 1988).

#### *La formation de nouvelles synapses et modification de synapses*

Étant donné la perte importante de l'excitation provenant des collatérales de Schaffer due à la dégénérescence des cellules pyramidales CA3 et la perte partielle des interneurones locaux du CA1, comment expliquer l'hyperexcitabilité de la région CA1 dans le modèle KA? À l'échelle du réseau (Figure C), la perte sélective d'interneurones serait en partie responsable de l'hyperexcitabilité du CA1 (Nadler JV 1981; Ben Ari Y 1985; Franck JE et Schwartzkroin PA 1985; Perez Y et al. 1996; Morin F et al. 1998b; Cossart R et al. 2001; Best N et al. 1993; Williams S et al. 1993). D'autre part, la formation de nouvelles fibres collatérales et terminaisons récurrentes des cellules pyramidales du CA1 contribue à augmenter l'hyperexcitabilité du circuit puisque ces collatérales favorisent alors des boucles

récurrentes d'activation entre les cellules pyramidales (Perez Y et al. 1996). Enfin, malgré qu'il n'y ait pas de perte des interneurons R/LM et que ceux-ci soient résistants dans le modèle KA il y a néanmoins une déafférentation partielle de l'apport exciteur sur ces interneurons les rendant moins actifs (Morin F et al. 1998a; Williams S et al. 1993).

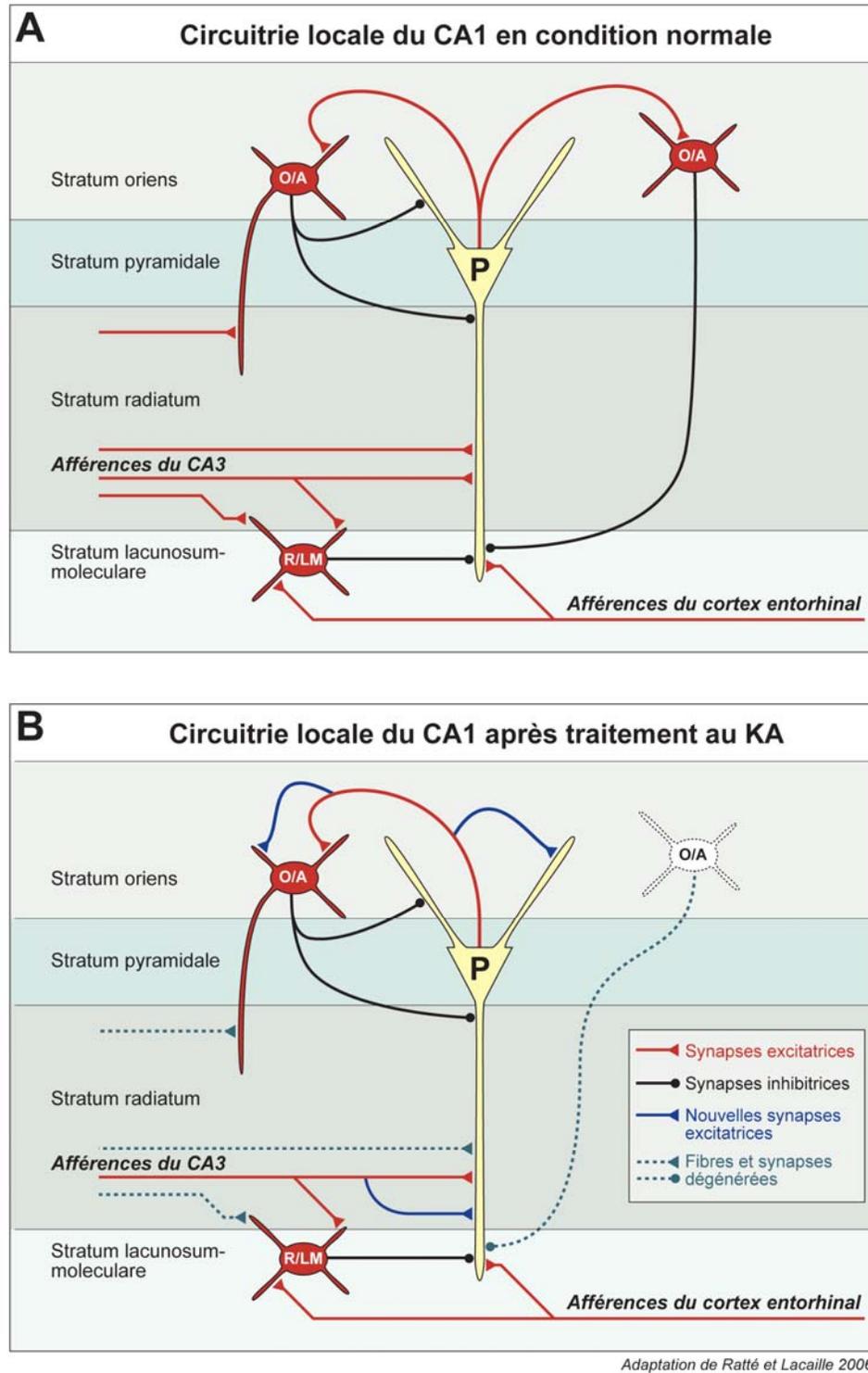


Figure C: Circuitrie locale de la région CA1 en conditions normale et épileptiforme.

Schéma simplifié des modifications synaptiques des interneurons O/A et R/LM dans le réseau du CA1, suite au traitement au KA. En A) en condition normale les interneurons O/A, dont les afférences proviennent des cellules du CA3 et/ou du CA1 (en rouge), projettent sur les dendrites des cellules pyramidales du CA1 à des endroits divers (en noir). D'autre part, les interneurons R/LM sont activés par les fibres du CA3 ainsi que des afférences du EC (en rouge) et inhibent les dendrites distales (en noir). En B), suite à la condition épileptiforme, des pertes d'afférences excitatrices (du CA3) et inhibitrices (perte d'interneurones O-LM du CA1) ont lieu (en vert), en plus de l'apparition de nouvelles fibres excitatrices des afférences du CA3 sur les dendrites distales des cellules pyramidales, et de "*sprouting*" des axones pyramidaux sur les interneurons O/A résistants ainsi que sur leur propre dendrites basaux (en bleu), faisant état de la plasticité du CA1 en condition épileptiforme.

### *L'implication d'autres récepteurs dans l'hyperexcitabilité*

D'autres facteurs contribuent également à l'activité épileptiforme des cellules pyramidales à l'échelle de la transmission synaptique. Le GABA devient dépolarisant plutôt qu'hyperpolarisant en condition épileptiforme induite *in vivo* (Alger BE et Nicoll RA 1979; Grover LM et al. 1993; Timofeev I et al. 2002; Fujiwara-Tsukamoto Y et al. 2003) par un changement d'expression de ses co-transporteurs des ions chlore et bicarbonate (Dzhala VI et al. 2005; Galanopoulou AS 2007). D'autre part des changements au niveau des sous-unités des NMDAR dans la condition épileptiforme causent une sensibilité moindre du récepteur pour l'ion magnésium (Chen Y et al. 1999) ce qui facilite la décharge en bouffée des cellules pyramidales. Ceci combiné au fait que les synapses excitatrices nouvellement

formées semblent avoir une plus grande proportion de NMDAR (Avoli M et Olivier A 1987) favorise l'hyperexcitabilité du réseau CA1. Par ailleurs, dans le modèle KA l'activité synaptique spontanée dépendante des NMDAR des interneurons O/A résistants à l'excitotoxicité a une cinétique plus lente qu'en contrôle résultant en des courants synaptiques de plus longue durée (Perez Y et al. 2006). Ainsi, de multiples phénomènes peuvent avoir lieu dans le réseau neuronal en réponse à des crises ou à un agent convulsivant, et contribuer au processus d'épileptogenèse chronique.

### **1.3.2.2 Implication des mGluRs dans l'hyperexcitabilité du réseau hippocampique**

Un autre facteur impliqué dans l'hyperexcitabilité de l'hippocampe et possiblement dans la genèse de décharges de type ictal est l'activation de mGluRs. Des changements de l'expression et de la fonction des mGluRs ont été observés dans l'hippocampe de patients atteints de TLE (Blumcke I et al. 2000; Dietrich D et al. 2002). Selon la classe de mGluR impliqué, leur activation a soit un effet pro-convulsif ou anti-convulsif. L'injection d'un antagoniste mGluRI (AIDA) chez le rat *in vivo* précédant une injection de KA diminue la perte d'interneurone induite par le KA et améliore la performance dans des tâches de mémorisation spatiale dépendantes de l'hippocampe chez les rats KA (Renaud J et al. 2002). *In vitro*, l'application de l'agoniste mGluRI DHPG cause des décharges épileptiformes et une potentialisation des réponses synaptiques des cellules pyramidales du CA3 qui persistent à long terme après l'application de l'agoniste (Merlin LR et Wong RK 1997), ce qui confirme le rôle pro-convulsivant des mGluRI.

Dans certains interneurons O/A du CA1, l'activation de mGluR induit *in vitro* de larges courants entrants. Ces réponses ont d'abord été caractérisées comme étant médiées par les mGluRI/II (McBain CJ et al. 1994), puis l'utilisation d'agonistes spécifiques a permis de préciser l'implication aux sous-types mGluR1 et 5 du groupe I (van Hoof JA et al. 2000). Il a de plus été montré par des applications locales de glutamate que des oscillations calciques étaient déclenchées de manière mGluRs-dépendante (Carmant L et al. 1997). Ces oscillations calciques accompagnant les courants entrants mGluR-dépendants sont dus à une entrée de  $Ca^{2+}$  par les canaux calciques voltage-dépendants et à une libération des stocks intra-cellulaires (Woodhall G et al. 1999). Il est à noter que ces oscillations sont observées spécifiquement dans des interneurons O/A, plus précisément ceux qui projettent leur axone au niveau des dendrites distales des cellules pyramidales contrairement aux autres interneurons (McBain CJ et al. 1994). Plus récemment, il a été démontré que l'activation de mGluR1 et 5 déclenchait des cascades de signalisation distinctes dans les interneurons du O/A. Dans un cas, l'activation mGluR1 entraîne une augmentation calcique issue des canaux récepteurs de potentiel transitoire (TRP) et des stocks intracellulaires, tandis que l'activation mGluR5 entraîne une augmentation de calcium provenant uniquement des stocks intracellulaires (Topolnik L et al. 2006).

Les sous-types mGluR1 et 5 ont des rôles distincts mais complémentaires dans l'activité épileptiforme à long terme induite *in vitro* dans les cellules pyramidales du CA3 (Mannaioni G et al. 2001). En effet, bien que les deux soient nécessaires à l'épileptogénèse, les mGluR5 jouent un rôle plus important dans l'induction tandis que les mGluR1 sont plutôt impliqués dans le maintien de l'activité épileptiforme (Wong RK et al. 2005; Merlin

LR 2002). Plusieurs données existent sur le rôle des mGluR1 et 5 en conditions épileptiques dans les cellules pyramidales de l'hippocampe, mais il y a peu de données dans les interneurons de l'hippocampe dans le contexte particulier de la condition épileptique.

L'emploi d'un modèle *in vitro* de l'activité épileptiforme de type ictal a été développé employant la bicuculline (BIC) et la 4-aminopyridine (4-AP) pour augmenter l'excitabilité du réseau et favoriser l'activation synaptique des mGluRs pendant les décharges épileptiformes des cellules pyramidales (Lee AC et al. 2002). Ce modèle a pour avantage de développer une activité de type ictal comportant des décharges de potentiels d'action en bouffée surmontant une enveloppe dépolarisante de longue durée, et ce, rapidement dans une tranche issue d'un rat naïf. Ce modèle nous est apparu potentiellement intéressant pour étudier le rôle des mGluR1 et 5 dans les interneurons du CA1 lors de l'activité épileptiforme.

## 1.4 Problématique abordée au cours de la thèse

Dans cette thèse nous aborderons la problématique du rôle des récepteurs glutamatergiques dans l'activité épileptiforme des interneurons des couches *oriens* et *alveus* (O/A), possiblement lié à leur vulnérabilité sélective dans l'épilepsie du lobe temporal, en utilisant des techniques électrophysiologiques de patch-clamp et d'imagerie calcique en tranche d'hippocampe de rat.

Dans le premier article, nous caractériserons, selon leurs propriétés neurochimiques, les types d'interneurones du CA1 qui sont vulnérables dans le modèle KA. Cette caractérisation sera faite également en fonction de l'âge étant donné que le rat jeune est normalement plus résistant aux séquelles des crises épileptiformes que le rat adulte (Holmes GL et Ben-Ari Y 2001), bien qu'il y ait néanmoins une perte d'interneurones du CA1 malgré l'absence de perte des cellules pyramidales du CA3 à cet âge (Renaud J et al. 2002). Ensuite, étant donné que certaines études suggèrent que l'effet épileptogène de l'injection de KA s'effectue directement et rapidement par le KA (Mulle C et al. 1998; Best N et al. 1996; Oliva AA, Jr. et al. 2002) nous déterminerons si la vulnérabilité sélective des interneurones O/A peut être expliquée par des réponses différentes entre les interneurones, à une application aiguë de KA. Cette étude permettra de déterminer si l'on peut différencier les interneurones O/A et R/LM par leurs réponses au KA à court-terme afin de savoir si ces réponses pourraient être impliquées dans la vulnérabilité sélective des interneurones O/A.

Une implication des mGluR1/5 a été démontrée dans l'activité épileptiforme des cellules pyramidales induite par l'agoniste mGluR1/5 (Merlin LR 2002) et par une activation synaptique (Lee AC et al. 2002). De plus, l'activation des mGluR1/5 entraîne des réponses différentes dans différents types d'interneurones (Carmant L et al. 1997; Woodhall G et al. 1999). Par contre, l'implication des mGluR1/5 lors de l'activité épileptiforme n'a pas encore été évaluée dans les interneurones. Donc dans la deuxième partie de la thèse, nous examinerons les contributions respectives des sous-types mGluR1 et mGluR5 dans les interneurones du CA1 lors de l'activité épileptiforme induite *in vitro*. Nous examinerons plus particulièrement si l'implication des mGluR1/5 est différente entre les sous-types d'interneurones afin d'évaluer si l'activation de ces récepteurs peut être impliquée dans la vulnérabilité sélective des interneurones O/A dans les modèles du TLE.

Enfin, une étude est présentée en annexe à laquelle j'ai contribué et qui traite des changements qui ont lieu au niveau des propriétés des synapses excitatrices sur les interneurones inhibiteurs suite à la réorganisation synaptique chez les rats traités au KA. Nous examinerons les changements de l'activité synaptique chez les interneurones O/A et les interneurones du Radiatum qui survivent aux crises épileptiques.

## **Chapitre II**

### **Short term effect of kainic acid on CA1 hippocampal interneurons differentially vulnerable to excitotoxicity**

Sanon N, Carmant L, Émond M, Congar P, Lacaille J-C

*Epilepsia* 46 (6): 837-848, 2005

## Short-term Effects of Kainic Acid on CA1 Hippocampal Interneurons Differentially Vulnerable to Excitotoxicity

\*†Nathalie Sanon, †Lionel Carmant, †Martine Emond, \*Patrice Congar, and \*Jean-Claude Lacaille

\*Centre de Recherche en Sciences Neurologiques, Département de Physiologie, and †Département de Pédiatrie, Centre de recherche de l'Hôpital Sainte-Justine, Université de Montréal, Québec, Canada

**Summary:** *Purpose:* We sought to identify the inhibitory interneurons of the rat hippocampal CA1 region selectively vulnerable in the kainic acid (KA) model of temporal lobe epilepsy and to determine whether their selective vulnerability could be due to differential short-term KA effects.

*Methods:* We quantified vulnerable interneurons in *stratum oriens-aleveus* (O/A) by using immunohistochemistry for glutamic acid decarboxylase (GAD), parvalbumin (PV), and somatostatin (SS) after KA injections in rats, and then compared in normal slices the effects of KA on interneurons either in O/A (vulnerable to KA) or in *strata radiatum and lacunosum-moleculare* (R/LM) (resistant to KA) by using whole-cell recording and calcium imaging.

*Results:* GAD-, PV- and SS-positive cells in O/A were decreased after KA treatment in P20 and P30 rats. Both short

(1-min) and long (10-min) applications of KA produced similar tetrodotoxin (TTX)-insensitive membrane depolarization and decrease in input resistance in O/A and R/LM interneurons. KA responses were antagonized by CNQX and GYKI52466, suggesting AMPA receptor activation. KA also generated a similar increase in intracellular  $Ca^{2+}$  in O/A and R/LM interneurons, which was antagonized by CNQX and GYKI52466.

*Conclusions:* The selective vulnerability of GAD-, PV-, and SS-immunopositive O/A interneurons in the KA model may not arise from cell-specific short-term membrane effects or calcium responses induced by KA, but from other glutamate receptor-mediated excitotoxic processes. **Key Words:** Temporal lobe epilepsy—Hyperexcitability—Whole-cell patch-clamp—Glutamate receptors—Calcium imaging.

The kainic acid (KA) model of human temporal lobe epilepsy (TLE) is associated with short-term seizure activity and specific cell loss in the hippocampus (1,2). Treatment with KA in adult rats induces several long-term network changes including a loss of CA3 pyramidal cells, dentate gyrus hilar cells, and certain CA1 inhibitory interneurons, as well as a sprouting of excitatory fibers (1,2). The partial cell loss and resulting excitation/inhibition imbalance has been proposed to render CA1 pyramidal neurons hyperexcitable (1–8). The deficit in inhibitory function in the KA and pilocarpine models of TLE is, however, only partial (9–12). After intracerebroventricular (i.c.v.) injection of KA in the adult rat, glutamic acid decarboxylase (GAD)-positive interneurons located in *stratum oriens/aleveus* (O/A) of the CA1 region are selectively lost, whereas other GAD-positive cells located in *strata radiatum and lacunosum-moleculare* (R/LM) are unaffected (7). A similar selective loss of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)ergic somatostatin (SS)-containing interneurons

in O/A has been observed after i.c.v. injections of KA and intraperitoneal (i.p.) administration of pilocarpine in adult rats (8). Interestingly, Nissl stain studies have shown that, although pyramidal cells of the immature brain are less vulnerable to seizure-induced cell death than are those of the mature brain (13), the selective vulnerability of O/A interneurons is present in young animals (14). However, the neurochemical identity of the selectively vulnerable cell types in young animals and the mechanisms involved in the selective vulnerability of O/A interneurons remain to be determined.

As a glutamate-receptor agonist, KA acts in a concentration-dependent manner via activation of ionotropic  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxasole propionic acid (AMPA) and KA subtypes of glutamate receptors. It augments the excitability of hippocampal principal neurons by increased membrane conductance and depolarization as well as depression of inhibitory transmission (15,16). The development of selective pharmacologic agents for AMPA receptors (AMPA) and KA receptors (KAR) has uncovered complex actions of KA on interneurons and pyramidal cells (17–19). A KAR-mediated component of excitatory postsynaptic currents (EPSCs) has been reported in neurons of

Accepted February 6, 2005.

the hippocampus and other brain structures (19,20). Moreover, KAR-mediated components were recently identified in spontaneous, miniature, and evoked EPSCs in CA1 interneurons. Interestingly, pure KAR-mediated EPSCs were exclusively observed in CA1 interneurons of *stratum oriens* (21). Consistent with these KAR actions, submicromolar concentrations of KA induce a direct and selective postsynaptic excitation of CA1 interneurons, which in turn results in an increase in spontaneous inhibition in pyramidal neurons (22,23). In addition, KARs presynaptically modulate transmitter release. Activation of presynaptic KARs modulates release bidirectionally at GABA synapses of pyramidal neurons: weak activation with low concentration enhances release, whereas strong activation leads to inhibition of release (24–27). Submicromolar KA also enhances spontaneous and evoked release of GABA on CA1 interneurons via a presynaptic mechanism (28). A similar bidirectional regulation of glutamate release by kainate autoreceptors also has been described (29–35). However, in contrast to the effects of submicromolar doses, higher concentrations (in the micromolar range) of KA appear necessary for excitotoxicity. Applications of 5  $\mu$ M KA are required for cell-death induction of parvalbumin (PV)-positive interneurons in the CA3 and CA1 region of hippocampal slice cultures (36). Similarly, applications of 5–10  $\mu$ M KA are necessary to elicit dendrotoxicity of hippocampal interneurons (37).

The aim of the present study was to clarify the cellular mechanisms underlying the selective vulnerability of O/A interneurons in the KA model of TLE. First, by using immunohistochemical methods, we examined the neurochemical identity of the subgroups of O/A interneurons selectively vulnerable to a systemic (i.p.) injection of KA in both adult (P30) and young (P20) rats. Second, although indirect seizure-induced network effects may be suggested to be responsible for the selective vulnerability of interneurons because different pharmacologic treatments (e.g., KA and pilocarpine) can induce similar interneuron loss (7,38), the findings that short-term applications of a micromolar concentration of KA are excitotoxic for interneurons in hippocampal slice cultures (36,37) suggest that direct KA effects also may be involved in the selective vulnerability of interneurons. Furthermore, it has been shown that these effects may develop rapidly (37,39). Thus we compared, by using whole-cell recording (23) and calcium imaging techniques, the short-term effects of micro- and submicromolar concentrations of KA (36,37) on interneurons located in O/A (KA-vulnerable population) and in R/LM (KA-resistant population). Our results show for the first time that as early as P20, an age at which no damage of pyramidal cells is seen, GAD-, PV-, and SS-positive interneurons located in O/A are selectively lost after i.p. KA injection. Our results also indicate that short-term KA applications generate similar

postsynaptic membrane responses and intracellular calcium increases in interneurons of both O/A and R/LM regions. Our data suggest that the selective vulnerability of O/A interneurons to KA excitotoxicity may not be due to cell-specific short-term effects of AMPAR/KAR activation, but rather to other glutamate receptor-mediated excitotoxic processes. Some of these results have been presented in abstract form (40).

## METHODS AND MATERIALS

### Kainic acid treatment and immunohistochemistry

Male Sprague–Dawley rats (Charles River Laboratories, St-Constant, QC, Canada) were given two intraperitoneal (i.p.) doses of KA (Tocris Cookson, Ellisville, MO, U.S.A./Diagnostic Chemicals Limited, Charlotteville, P.E.I., Canada) diluted in saline (0.9% NaCl; pH 7.4) at 1-h intervals at postnatal days 20 or 30 (P20, 6.0 mg/kg,  $n = 5$ ; P30, 6.75 mg/kg,  $n = 5$ ). The first injection did not induce seizures, but after the second injection, prolonged status epilepticus (>4 h) was induced with limited mortality (<5%). Age-matched controls (P20,  $n = 3$ ; P30,  $n = 3$ ) received an equivalent volume of saline solution (0.9% NaCl, i.p.). All experiments were performed in accordance with protocols and guidelines of the Canadian Animal Care Committee (1993) and the National Institutes of Health (NIH; *NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*), and approved by the Université de Montréal institutional animal ethics committee.

Forty-five days after KA injection, rats were anesthetized (xylazine, 10 mg/kg i.p., Rompun; Bayer Inc., Pointe-Claire, QC, Canada; ketamine, 90 mg/kg i.p., Ketaset; Wyeth-Ayerst Pharmaceuticals, Saint-Laurent, QC, Canada) and perfused transcardially with 0.1 M phosphate buffered saline (PBS) followed by 4% paraformaldehyde in 0.1 M PBS at room temperature (pH 7.4). Brains were removed, postfixed in the same fixative for 24 h, cryoprotected with 30% sucrose in PBS for 24 h, and then placed in OCT embedding medium (Tissue-Tek; Sakura, Torrance, CA, U.S.A.) to be frozen at  $-70^{\circ}\text{C}$ . Coronal serial sections of 10  $\mu$ m were cut through the dorsal hippocampus with a cryotome and collected free-floating in 0.1 M PBS. All sections were incubated in 3% normal donkey serum (NDS) and 2% bovine serum albumin (BSA) in 0.1 M PBS. A 1/5 series of sections were then incubated in rabbit anti-GAD polyclonal antibody (Chemicon International Inc., Temecula, CA, U.S.A.) diluted (1:1,000) in 1% NDS and 0.2% BSA in PBS, rinsed in PBS, and incubated in secondary antibody Cy3-conjugated donkey anti-rabbit immunoglobulin G (IgG) (H+L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, U.S.A.) diluted in 1% NDS and 2% BSA in PBS. Another 1/5 series of sections were incubated in rabbit anti-PV polyclonal antibody (1:2,000; Chemicon International Inc.) or mouse anti-SS monoclonal antibody (1:1,000; Chemicon

International Inc.) in 1% NDS, 0.2% BSA, and 0.1% Triton X-100 in PBS. These sections were rinsed in PBS and incubated in secondary antibodies Cy3-conjugated donkey anti-rabbit IgG (H+L) and Cy2-conjugated donkey anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) in 1% NDS, 2% BSA in PBS. All the sections were then rinsed in PBS and mounted on slides with 1% glycerol and examined under a fluorescence microscope. Interneurons in O/A were counted on sections confined to the septal area where the lateral and medial blades of the dentate gyrus were of equal length and sections 500  $\mu\text{m}$  posterior to that point. The number of interneurons was estimated by using the fractionator method (14,41,42). In this method, the total number of cells was counted, and the estimation of the number was made by multiplying the number of cells counted in one section by the number of sections used.

#### Slice preparation and electrophysiology

Transverse hippocampal slices were prepared as previously described (43). In brief, naïve male Sprague-Dawley rats aged P30 to P40 were anesthetized with halothane (MTC Pharmaceuticals, Cambridge, ON, Canada) and rapidly decapitated. The brain was extracted from the skull and immediately immersed in cold (4°C) and oxygenated (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) artificial cerebrospinal fluid (aCSF) containing in mM: 124 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 MgSO<sub>4</sub>, 10 D-glucose (pH 7.3–7.4; 300–310 mOsm). Slices (300  $\mu\text{m}$ ) were obtained from the right hemisphere by using a vibratome (Campden Instruments Ltd., Loughborough, U.K.; or Leica Microsystems Inc., Buffalo, NY, U.S.A.) and were placed in aCSF at room temperature. Slices were allowed to recover  $\geq 1$  h before being transferred individually and maintained in a recording chamber (2–3 ml/min). For patch-clamp recordings, interneurons were visualized by using an upright microscope (Olympus America Inc., Melville, NY, U.S.A.) equipped with DIC and IR video camera (Cohu, San Diego, CA, U.S.A.). Whole-cell current-clamp recordings were made by using borosilicate patch pipettes (1 mm OD; A-M Systems, Carlsborg, WA, U.S.A.) of 4–5 M $\Omega$  resistance when filled with an intracellular solution containing (in mM): 140 K-gluconate, 10 HEPES, 1 MgCl<sub>2</sub>, 8 NaCl, 10 phosphocreatine, 0.4 GTP, 2 ATP, 0.15% biocytin, 0.5 EGTA (pH 7.2–7.3 adjusted with KOH, 290 mOsm). Signals were acquired by using an Axopatch 200B amplifier (low-pass filtering at 1 KHz). Data acquisition (2-KHz sampling rate) and analysis were performed by using a Digidata 1200 analog–digital converter (Axon Instruments, Foster City, CA, U.S.A.) and pClamp7 software (Axon Instruments). Membrane potentials and cell-input resistance variations were continuously monitored via a hyperpolarizing current injection protocol (0.1  $\mu\text{A}$ , 0.2 Hz, 100 ms), and cells with unstable responses were discarded from analysis. When indi-

cated, Na<sup>+</sup> channels were blocked by tetrodotoxin (TTX), 1  $\mu\text{M}$  (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.), AMPARs were blocked by the noncompetitive antagonist GYK152466, 30  $\mu\text{M}$  (Sigma), and non-N-methyl-D-aspartic acid receptors (non-NMDARs) were antagonized by 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX), 20  $\mu\text{M}$  (Sigma).

#### Calcium imaging

For simultaneous Ca<sup>2+</sup> imaging and electrophysiological recordings, 140 mM K-methylsulfate was used as main electrolyte in the intracellular solution, and the antioxidant Trolox (40  $\mu\text{M}$ ) (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) was included in the aCSF. The intracellular solution contained the calcium indicator Oregon Green Bapta-1 (50  $\mu\text{M}$ ) (Molecular Probes, Eugene, OR, U.S.A.) without EGTA and was allowed to diffuse for a minimum of 20 min before starting imaging experiments. Fluorescence images were obtained by using a xenon arc lamp (Sutter Instrument Co., Novato, CA, U.S.A.), 488-nm excitation and 520-nm emission filters, a cooled CCD camera (Sensicam; Cooke Corp, Auburn Hills, MI, U.S.A.), and analyzed with Axon Imaging Workbench 2.1 software (Axon Instruments). The fluorescence intensity ( $F_{\text{post}}$ ) was averaged over the region of interest in the soma. Changes in fluorescence were calculated relative to the averaged baseline fluorescence ( $F_{\text{rest}}$ ) and expressed as:

$$\% \Delta F/F = (F_{\text{post}} - F_{\text{rest}})/(F_{\text{rest}} - F_{\text{back}}) \times 100$$

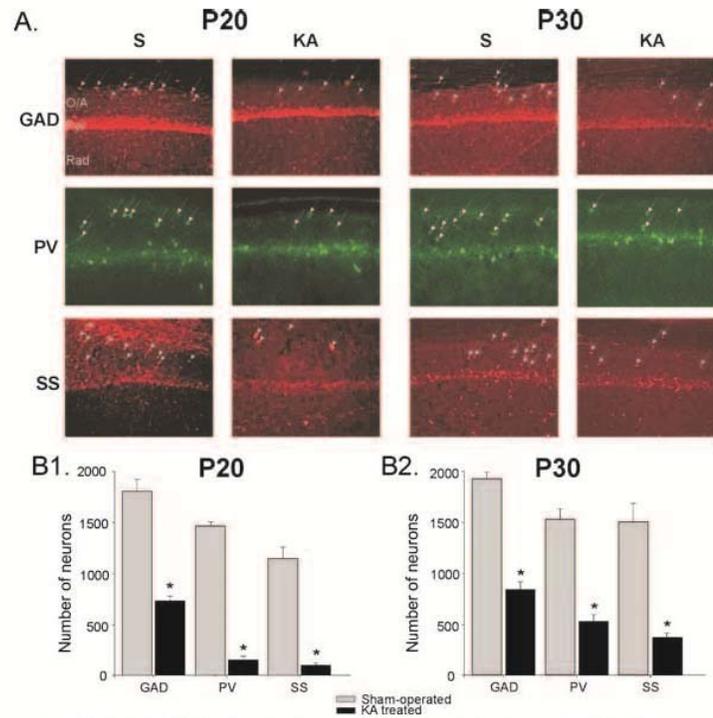
where  $F_{\text{back}}$  is the background fluorescence measured outside the cell. Cells were depolarized by 10 to 15 mV by using current injections to generate calcium responses and monitor cell responsiveness at the beginning and end of experiments.

#### Histology for biocytin staining

After electrophysiologic and imaging experiments, slices containing biocytin-filled cells were fixed in 4% paraformaldehyde overnight (4°C), rinsed in PB (0.2 M), and placed in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.3% in PB, 0.1 M). After several rinses in PBS and PBS-Triton (Triton 10%, dimethyl sulfoxide), slices were incubated in avidin-biotin complex (Vectastain ABC kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA, U.S.A.). The reaction product was visualized by using a DAB-nickel solution (Tris, nickel sulfate, imidazole, DAB 1%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.3%). Slices were mounted in DPX mounting medium (Electron Microscopy Sciences, Ft. Washington, PA, U.S.A.) and observed by using a light microscope to confirm anatomically the interneuron recordings.

#### Statistical analysis

Data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Differences between groups were assessed by using Student's *t* test, Mann-Whitney rank sum test, or one-way analysis of variance (ANOVA), as appropriate,



**FIG. 1.** Interneuron loss after kainate (KA) treatment. **A:** Immunofluorescence photomicrographs of the hippocampal CA1 region from saline- (S) and KA-treated (KA) rats, showing *oriens/alveus* (O/A), *pyramidale* (Pyr), and *radiatum* (Rad) layers. Immunolabeling shows a loss of glutamic-acid decarboxylase- (GAD), parvalbumin- (PV), and somatostatin- (SS) positive neurons in O/A for rats treated with KA at postnatal ages P20 and P30. **B:** Summary histograms for all animals treated at ages P20 (**B1**) and P30 (**B2**) ( $n = 3$  for saline-treated;  $n = 5$  for KA-treated, except for P30 GAD labeling,  $n = 4$ ), indicating a significant decrease in GAD-, PV-, and SS-positive O/A cells in KA-treated rats in both age groups.

with the significance level set at  $p < 0.05$ , by using SPSS software (SPSS Inc., Chicago, IL, U.S.A.).

## RESULTS

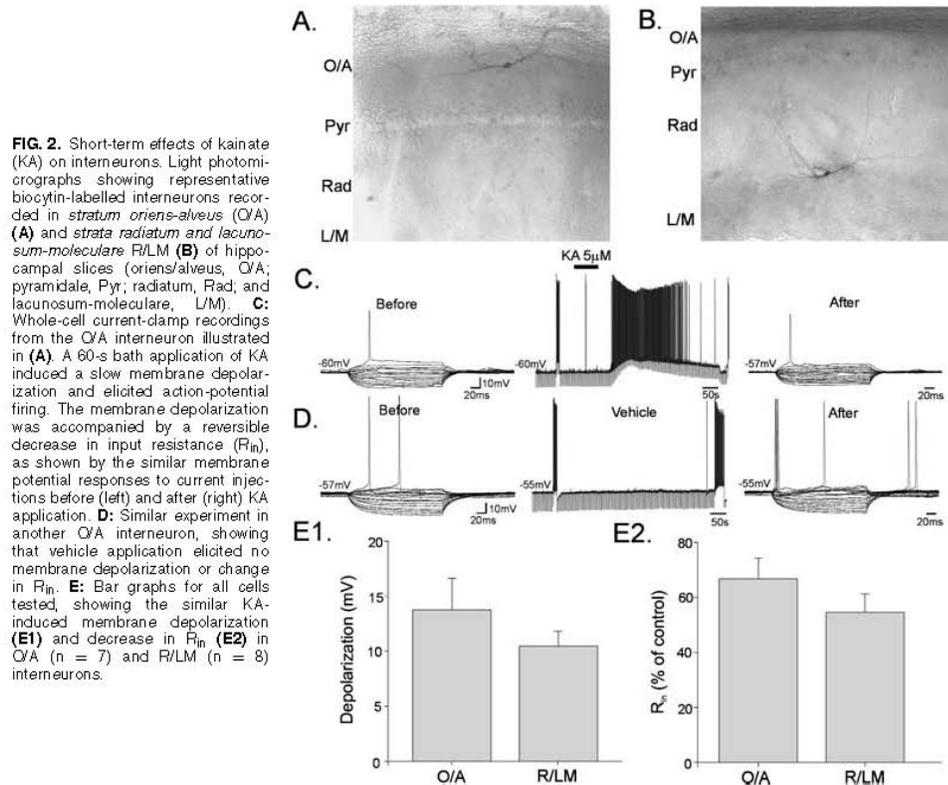
### Selective vulnerability of interneurons

After KA injections at ages P20 and P30, all animals experienced seizures characterized by wet-dog shakes and clonic and generalized rearing and falling convulsions (data not shown). To examine the specific pattern of cell loss in the hippocampal CA1 region associated with KA-induced seizures, we quantified the O/A interneurons immunopositive for GAD, PV, and SS in KA-treated and sham-operated animals (Fig. 1A). In P20 KA-treated rats, the number of GAD-positive cells in O/A was decreased by 59.2% ( $n = 5$ ). The number of PV-positive cells was reduced by 89.7% ( $n = 5$ ), and the number of SS-positive cells was diminished by 91.4% ( $n = 5$ ) (Fig. 1B1). In P30 KA-treated rats, the number of GAD-positive O/A

cells decreased by 56.1% ( $n = 4$ ), the number of PV-positive cells by 65.0% ( $n = 5$ ), and the mean number of SS-positive O/A cells by 74.9% ( $n = 5$ ) (Fig. 1B2). These results indicate that GAD-, PV-, and SS-positive O/A cells in CA1 are selectively vulnerable to KA in contrast to the absence of significant cell loss in *radiatum* and *lacunosum-moleculare* layers (14). Furthermore, this interneuron vulnerability was present in young animals, at an age (P20) when CA3 pyramidal cell loss is absent (14).

### Short-term effects of KA on O/A and R/LM interneurons

To examine whether the selective vulnerability of O/A interneurons to KA treatment was due to differential short-term effects of KA on these cells, we characterized the effects of bath application of KA ( $5 \mu\text{M}$ , 1 min) on interneurons located in the superior half of *stratum oriens*, near or in the *alveus* (KA-vulnerable O/A interneurons)

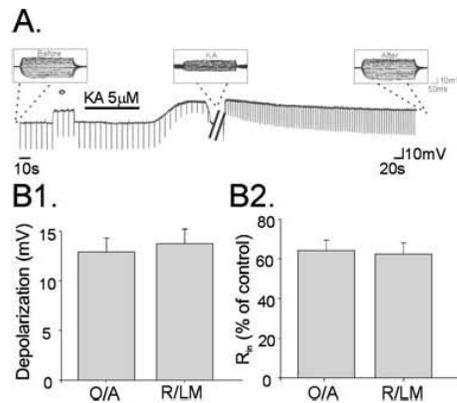


(Fig. 2A), versus interneurons located at the border of *radiatum* and *lacunosum-moleculare* layers (KA-resistant R/LM interneurons) (Fig. 2B) by using whole-cell recordings. Because the pattern of loss of O/A interneurons was similar at P20 and P30, we examined electrophysiologic responses in animals aged P30–P40. Both types of interneurons responded to KA with membrane depolarization and increased cell firing (Fig. 2C). KA induced a reversible mean depolarization of  $13.9 \pm 2.8$  mV in O/A cells [ $n = 7$ ; resting membrane potential (RMP),  $-56.7 \pm 2.2$  mV] and  $10.5 \pm 1.3$  mV in R/LM cells ( $n = 8$ ; RMP,  $-52.4 \pm 1.3$  mV) (Fig. 2E1). The depolarization was accompanied by a mean reduction in cell input resistance ( $R_{in}$ ) to  $62.4 \pm 10.8\%$  of control at the peak KA effect in O/A cells and to  $54.7 \pm 6.7\%$  of control in R/LM cells (Fig. 2E2). These KA effects were not statistically different in both cell types. Control vehicle applications elicited no responses (mean membrane potential,  $-0.11 \pm 0.48$  mV in O/A and  $0.73 \pm 0.54$  mV in R/LM) (Fig. 2D). These findings suggest that KA induces a similar depo-

larization and input resistance decrease in O/A and R/LM interneurons.

#### Direct effects and AMPAR/KAR contributions

Bath applications of KA can induce both direct and indirect effects on interneurons. To examine the possible differential direct effects of KA on interneurons, KA was bath-applied in the presence of  $1 \mu\text{M}$  TTX. In this condition, KA induced a depolarization of  $12.9 \pm 1.4$  mV in O/A interneurons ( $n = 13$ ; RMP,  $-53.5 \pm 2.0$  mV) and a depolarization of  $13.8 \pm 1.5$  mV in R/LM cells ( $n = 8$ ; RMP,  $-53.8 \pm 3.0$  mV) (Fig. 3B1). At the peak KA effect, the  $R_{in}$  was reduced to  $64.3 \pm 5.2\%$  of control in O/A cells and  $62.5 \pm 5.4\%$  of control in R/LM cells (Fig. 3B2). Membrane potential and  $R_{in}$  values returned to control levels after washout of KA (Fig. 3A, insets). The KA-induced depolarizations and  $R_{in}$  changes were not statistically different in O/A and R/LM interneurons. Furthermore, KA-induced depolarizations and  $R_{in}$  changes in TTX were not



**FIG. 3.** Direct effects of kainate (KA) on interneurons. **A:** Whole-cell current-clamp recording from a *stratum oriens-alveus* (O/A) interneuron in the presence of TTX ( $1 \mu\text{M}$ ) showing the reversible membrane depolarization and decrease in input resistance ( $R_{in}$ ) induced by KA. Decrease in  $R_{in}$  can be seen comparing voltage responses to 100-pA hyperpolarizing current pulses delivered before KA (manual depolarization of 10 mV indicated by open symbols) versus at the peak of the depolarization, or in the insets showing membrane responses to current injection at similar  $V_m$  ( $-53 \text{ mV}$ ) before, during, and after (15 min) KA application. **B:** Bar graphs of depolarization (**B1**) and  $R_{in}$  reduction (**B2**) induced by KA in O/A ( $n = 13$ ) and *strata radiatum* and *lacunosum-moleculare* (R/LM;  $n = 8$ ) interneurons, showing the similar effects in both cell groups.

significantly different from those observed in the absence of TTX (Fig. 2).

We also verified that two prolonged (10-min) bath applications of KA ( $1 \mu\text{M}$ ) separated by 1 h, which may mimic our *in vivo* KA injections used in the first part of the study, elicited similar membrane responses in both populations of interneurons. In these experiments (in TTX), the first KA application elicited a similar depolarization in O/A ( $14.4 \pm 1.5 \text{ mV}$ ;  $n = 5$ ) and R/LM ( $15.8 \pm 2.5 \text{ mV}$ ;  $n = 6$ ) cells. The second application also elicited a similar depolarization in O/A ( $14.6 \pm 1.7 \text{ mV}$ ) and R/LM ( $19.6 \pm 2.9 \text{ mV}$ ) cells (Fig. 4A). We also tested the effect of repeated applications of 200 nM KA, a lower concentration that activates selectively KARs. A first KA application elicited a significantly smaller depolarization in O/A interneurons ( $5.0 \pm 1.5 \text{ mV}$ ;  $n = 11$ ) than in R/LM cells ( $10.2 \pm 1.9 \text{ mV}$ ;  $n = 9$ ). However, five of 11 O/A cells did not appear to respond to low-concentration KA (response,  $\leq 2 \text{ mV}$ ), whereas all nine R/LM cells responded. Moreover, in responsive cells, the effects of 200 nM KA were not different between O/A and R/LM cells (Fig. 4B). Therefore these results suggest that supra- and submicromolar concentrations of KA elicit similar responses in O/A and R/LM cells.

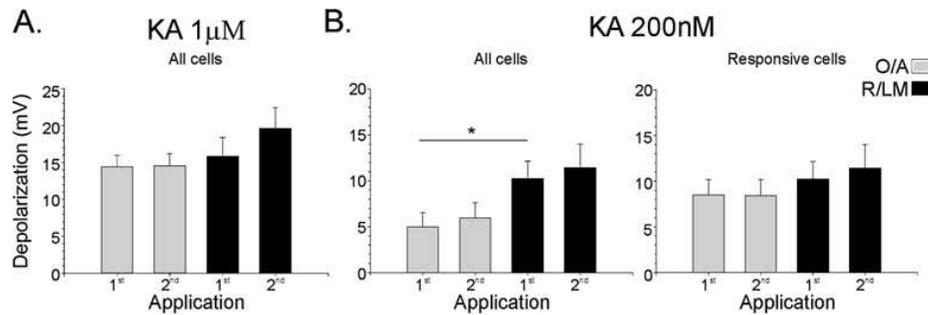
To evaluate further the contribution of AMPA/KAR receptors, we examined the actions of the AMPAR/KAR antagonist CNQX and the selective AMPAR antagonist GYKI52466 on KA-induced depolarizations (Figs. 5 and 6A and B). CNQX antagonized KA-induced depolarization by  $57.4 \pm 8.8\%$  in O/A interneurons ( $p = 0.002$ ;  $n = 7$ ) and by  $43.8 \pm 7.4\%$  in R/LM cells ( $p = 0.006$ ;  $n = 6$ ) (Fig. 5C and D). The block by CNQX was reversible and was not significantly different in O/A and R/LM cells. Next, we assessed the implication of AMPAR in KA responses, using the noncompetitive AMPAR antagonist GYKI52466 ( $30 \mu\text{M}$ ) on both cell types (Fig. 6A and B). In GYKI, KA-induced depolarizations were reversibly diminished by  $33.2 \pm 7.5\%$  in O/A interneurons ( $p = 0.018$ ;  $n = 7$ ) and by  $46.7 \pm 10.2\%$  in R/LM cells ( $p = 0.023$ ;  $n = 5$ ) (Fig. 6C and D), indicating a significant contribution of AMPAR in KA responses. These effects of GYKI were not significantly different in both cell types ( $p = 0.300$ ). These results suggest a similar implication of non-NMDA receptors in the direct short-term effects of KA in O/A and R/LM interneurons.

#### KA-induced $\text{Ca}^{2+}$ responses in interneurons

Because the postsynaptic membrane conductance changes induced by KA were similar in O/A and R/LM interneurons, we examined postsynaptic  $\text{Ca}^{2+}$  responses elicited by KA in these cells by using whole-cell recordings and the fluorescent  $\text{Ca}^{2+}$  indicator Oregon Green Bapta-1. Bath application of KA ( $5 \mu\text{M}$ ) produced an elevation of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels of  $42.7 \pm 11.9\% \Delta F/F$  in O/A cells ( $n = 15$ ; Fig. 7A and B) and an increase of  $28.0 \pm 5.0\% \Delta F/F$  in R/LM cells ( $n = 10$ ; Fig. 7B). The peak  $\text{Ca}^{2+}$  responses were not significantly different between O/A and R/LM cells. Furthermore, the latency to peak of  $\text{Ca}^{2+}$  responses and membrane depolarizations were not significantly different (O/A cells:  $190.8 \pm 21.9 \text{ s}$  for  $\text{Ca}^{2+}$  responses and  $157.6 \pm 20.4 \text{ s}$  for depolarizations; R/LM cells:  $285.5 \pm 42.0 \text{ s}$  for  $\text{Ca}^{2+}$  responses and  $211.5 \pm 35.2 \text{ s}$  for depolarizations). Vehicle application resulted in only modest  $\text{Ca}^{2+}$  increases (O/A cells:  $7.2 \pm 1.9\% \Delta F/F$ ;  $n = 8$ ; R/LM cells:  $8.4 \pm 2.3\% \Delta F/F$ ,  $n = 10$ ; Fig. 7B) associated with spontaneous  $\text{Ca}^{2+}$  elevations (see, for example, Fig. 8C). These results suggest that KA induces intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  elevations of similar magnitude in O/A and R/LM cells.

#### Direct $\text{Ca}^{2+}$ responses and AMPAR/KAR contributions

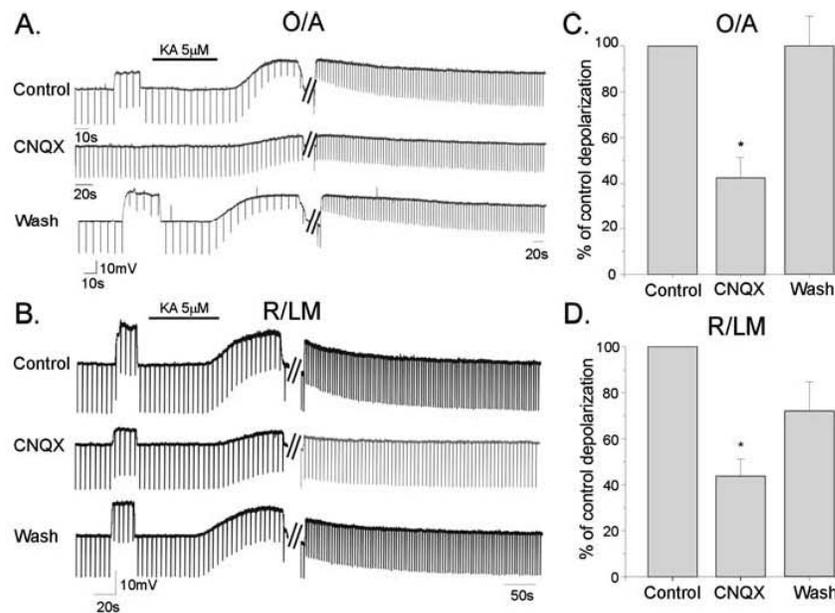
To assess potential cell-specific differences in  $\text{Ca}^{2+}$  responses associated with direct postsynaptic actions of KA, responses were examined in the presence of TTX.  $\text{Ca}^{2+}$  responses induced by  $5 \mu\text{M}$  KA in TTX were not significantly different between both cell types:  $16.7 \pm 3.7\% \Delta F/F$  for O/A interneurons in TTX ( $n = 4$ ), and  $17.6 \pm 1.9\% \Delta F/F$  for R/LM cells in TTX ( $n = 6$ ) (Fig. 8A and B). Furthermore, these KA-induced  $\text{Ca}^{2+}$  responses were



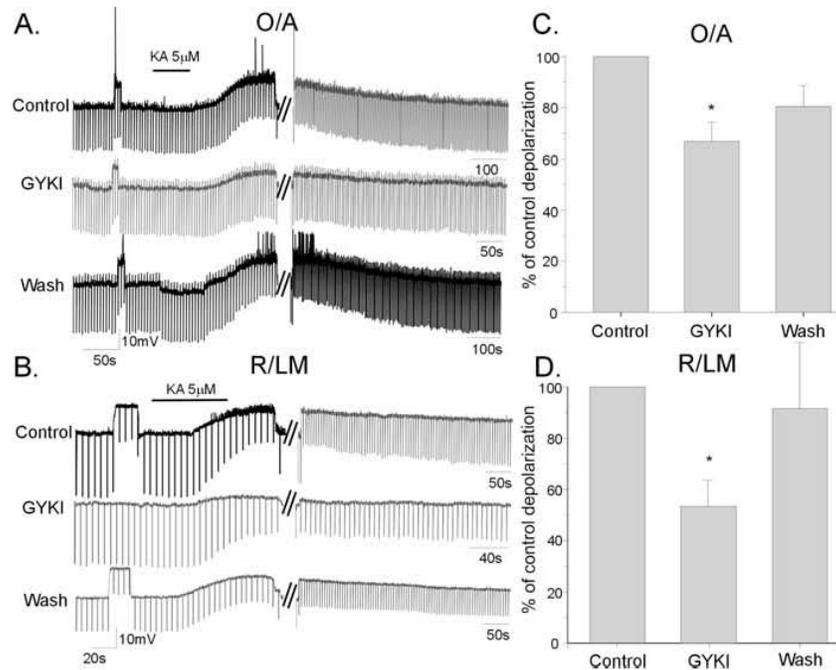
**FIG. 4.** Effects of repeated, prolonged applications of kainate (KA). Bar graphs of membrane depolarizations elicited in *stratum oriens-aleveus* (O/A) and *strata radiatum and lacunosum-moleculare* (R/LM) cells by two 10-min applications (at 1-h intervals) of 1  $\mu$ M (**A**) and 200 nM (**B**) KA. With a concentration of 1  $\mu$ M, the depolarizations were similar in O/A ( $n = 5$ ) and R/LM ( $n = 6$ ) cells (**A**). With the lower concentration (200 nM), depolarization tended to be larger in R/LM cells, and this difference was significant for the first application ( $n = 11$  O/A cells and  $n = 9$  R/LM cells) (**B**, left). However, when only the responsive cells were considered, no significant difference was found in depolarization elicited in O/A ( $n = 6$ ) and R/LM cells ( $n = 9$ ) between cells (**B**, right) (\*significant difference between O/A and R/LM).

not significantly different from those obtained in the absence of TTX. These data suggest that the  $Ca^{2+}$  increases induced by the direct postsynaptic action of micromolar concentrations of KA are similar in both cell types.

We also examined the  $Ca^{2+}$  responses elicited by submicromolar KA concentrations. In cells that responded to 200 nM KA by depolarization, somatic  $Ca^{2+}$  responses were small or undetectable ( $1.1 \pm 10.3\% \Delta F/F$ ,  $n = 6$



**FIG. 5.** Effects of non-N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) antagonists on kainate (KA)-induced membrane depolarizations. **A**, **B**: Whole-cell current-clamp recordings from *stratum oriens-aleveus* O/A (**A**) and *strata radiatum and lacunosum-moleculare* R/LM (**B**) interneurons showing that the non-NMDAR antagonist CNQX (20  $\mu$ M) reduced the direct effects of KA (in 1  $\mu$ M TTX). **C**, **D**: Bar graphs for all O/A ( $n = 7$ ) and R/LM ( $n = 6$ ) interneurons illustrating the similar antagonism by 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) of KA-induced depolarizations in both cell types (\*significantly different from control).



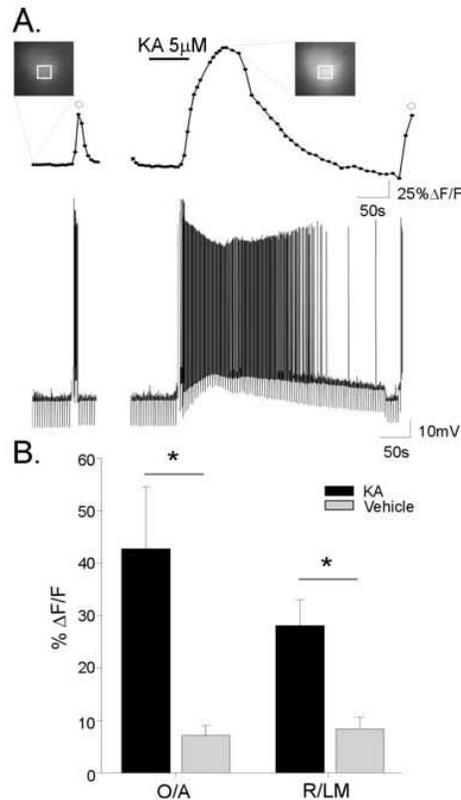
**FIG. 6.** Effects of the  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA) receptors (AMPA) antagonist GYKI52466 on kainate (KA)-induced depolarizations. **A, B:** Whole-cell current-clamp recordings from *stratum oriens-alveus* O/A (**A**) and *strata radiatum and lacunosum-moleculare* R/LM (**B**) interneurons showing that the AMPAR antagonist GYKI52466 (30  $\mu$ M) reduced the direct effects of KA (in 1  $\mu$ M TTX). **C, D:** Bar graphs for all O/A ( $n = 7$ ) and R/LM ( $n = 5$ ) interneurons, illustrating the similar antagonism of KA-induced responses by the AMPAR antagonist in R/LM and O/A interneurons (\*significantly different from control).

in O/A;  $12.7 \pm 7.6\%$   $\Delta F/F$ ,  $n = 9$  in R/LM), and were not significantly different from spontaneous  $Ca^{2+}$  changes recorded during vehicle applications ( $3.4 \pm 12.1\%$   $\Delta F/F$ ,  $n = 4$  in O/A;  $3.5 \pm 9.6\%$   $\Delta F/F$ ,  $n = 4$  in R/LM). These results suggest that submicromolar concentrations of KA do not elicit detectable somatic  $Ca^{2+}$  responses in O/A and R/LM interneurons.

We next examined whether  $Ca^{2+}$  responses induced by the direct postsynaptic action of 5  $\mu$ M KA resulted from the activation of AMPAR/KAR, as observed for membrane conductance changes. In the presence of TTX and of the AMPAR/KAR antagonists GYKI52466 and CNQX,  $Ca^{2+}$  responses were significantly reduced by 73.1% in O/A interneurons ( $n = 5$ ;  $p = 0.024$ ) and by 41.4% in R/LM interneurons ( $n = 5$ ;  $p = 0.049$ ) (Fig. 8C and D). These effects were not significantly different between the two cell types. Therefore AMPAR/KAR contribute to the KA-induced  $Ca^{2+}$  increases similarly in both O/A and R/LM interneurons.

## DISCUSSION

The aims of the present study were (a) to determine the neurochemical subtypes of CA1 interneurons that are vulnerable in the i.p. KA model of TLE in juvenile (P20) and young adult (P30) rats, and (b) to compare the actions of KA on the "vulnerable" and "resistant" populations of interneurons (O/A and R/LM, respectively) to examine whether short-term effects of KA may underlie their selective vulnerability. Our results showed that GAD-, PV-, and SS-immunopositive cells in O/A are selectively lost in the CA1 hippocampus of KA-treated rats, even at early stages (P20) in the absence of pyramidal cell loss (14). Moreover, short-term KA applications (either single 1-min or two prolonged 10-min) in hippocampal slices produce a similar membrane depolarization and conductance increase in O/A and R/LM interneurons. This depolarization was mediated by an activation of postsynaptic AMPAR/KAR in both cell types. These membrane effects



**FIG. 7.** Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  responses induced by kainate (KA). **A:** Simultaneous fluorescence (top) and membrane-potential (bottom) changes induced by KA in a *stratum oriens-aleveus* (O/A) interneuron loaded with the calcium indicator Oregon Green Bapta-1 ( $50 \mu\text{M}$ ). Fluorescence images (see insets) were acquired at a frequency of 0.2 Hz. KA evoked a large  $\text{Ca}^{2+}$  increase (measured in the region of interest indicated by the box), which was in association with membrane depolarization, cell firing, and input resistance decrease. **B:** Bar graphs of  $\text{Ca}^{2+}$  responses elicited by KA and vehicle applications in O/A (KA  $n = 15$ ; vehicle  $n = 8$ ) and R/LM (KA  $n = 10$ ; vehicle  $n = 10$ ) interneurons. KA responses were significantly different from vehicle application but were similar in O/A and *strata radiatum and lacunosum-moleculare* (R/LM) cells.

also were associated with similar postsynaptic  $\text{Ca}^{2+}$  elevations in O/A and R/LM interneurons. Our results suggest that the selective vulnerability of O/A interneurons to KA may not be due to the membrane conductance change or to  $\text{Ca}^{2+}$  elevations induced in the short term by KA, but likely to other glutamate receptor mechanisms. It remains to be determined whether these other mechanisms involve  $\text{Na}^+$  influx-driven dendrite beading, an excitotoxic phenomenon also induced by KA (37). Our evidence that di-

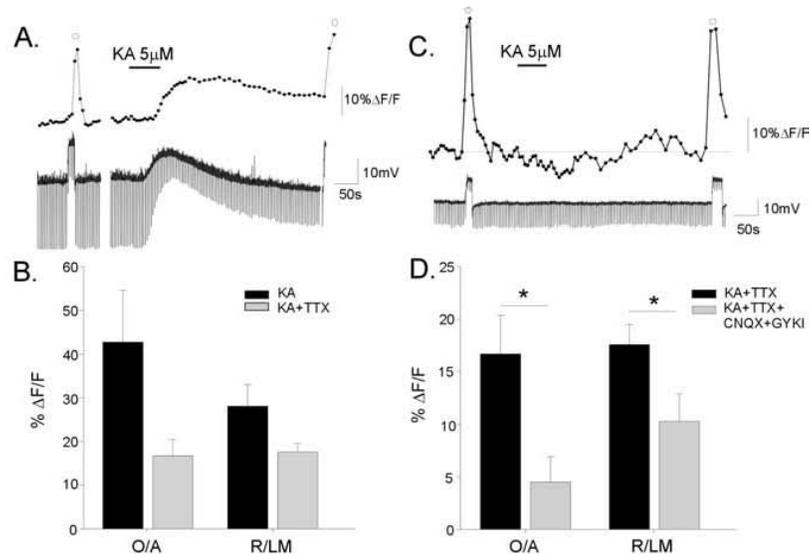
rect short-term effects of KA may not be responsible for the selective vulnerability of O/A interneurons also is consistent with observations of a similar selective vulnerability of GAD-, PV-, and SS-positive O/A interneurons after seizures induced by pilocarpine, a pharmacologic agent with a different mechanism of action (38).

#### Loss of specific interneurons

The O/A cell loss observed in the present study after i.p. KA injections confirmed a previous report using Nissl-stained cell counts in P20 and P30 rats (14). Our results also are consistent with the reported loss of GAD-positive O/A cells after i.c.v. KA injection in mature rats (7). Moreover, our results indicate that it is the PV- and SS-positive O/A interneurons that are selectively vulnerable to KA, and this, both in juvenile (P20) and young adult (P30) rats. We found a proportionately more important loss of PV- and SS-positive cells than GAD-positive interneurons after KA. Because GAD-positive interneurons include other subtypes of interneurons that are not immunopositive for PV and SS [for review, see (44)], these other subtypes may be less vulnerable than PV- and SS-positive cells to KA treatment. The specific loss of PV- and SS-positive cells also is consistent with the cell loss observed after pilocarpine-induced seizures (38) and hippocampal status epilepticus in rats (45). The loss of PV- and SS-positive O/A interneurons was greater at P20 than at P30. This finding is in contrast with the loss of CA3 pyramidal cells, which was present at P30 but not at P20 (13). Our data suggest that a hippocampal deficit involving solely PV- and SS-positive O/A interneurons and not pyramidal cells may be present after i.p. KA treatment in young (P20) animals. The contribution of intrinsic and network properties responsible for this selective vulnerability of O/A cells versus pyramidal cells remains to be determined.

#### Short-term electrophysiologic effects of KA on interneurons

Our data revealed similar membrane depolarizations and input resistance decreases evoked by  $5 \mu\text{M}$  KA in O/A and R/LM cells. KA effects were not different in the presence of TTX, suggesting that they were mainly postsynaptic. Depolarizing KA responses were similarly reduced in both types of interneurons by the competitive antagonist CNQX, indicating an implication of AMPAR/KAR. Because KA can activate KAR and AMPAR at micromolar concentrations (46), the selective AMPAR antagonist GYKI52466 was used to dissociate both components. CNQX blocked KA responses by  $\sim 60\%$ , and GYKI by  $\sim 40\%$ , suggesting that short-term responses to KA may be attributable in large part to AMPAR activation in O/A and R/LM cells. Moreover, submicromolar concentrations of KA, which activates more selectively KARs, elicited similar membrane depolarizations in O/A and R/LM cells that responded to such application, suggesting that the



**FIG. 8.** Direct effects of kainate (KA) and contributions of  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptors (AMPA) and KA receptors AMPAR/KAR. **A:** Simultaneous fluorescence (top) and membrane-potential (bottom) changes induced by KA in a *stratum oriens-aleveus* (O/A) interneuron in the presence of tetrodotoxin (TTX;  $1 \mu\text{M}$ ). KA induced a postsynaptic  $\text{Ca}^{2+}$  increase in association with the membrane depolarization and input resistance decrease. **B:** Bar graphs for all cells of KA-induced  $\text{Ca}^{2+}$  responses in the absence and presence of TTX. In the presence of TTX, KA-induced  $\text{Ca}^{2+}$  increases were not statistically different in both cell types (OA:  $n = 4$ ; LM:  $n = 6$ ).  $\text{Ca}^{2+}$  responses induced by KA in TTX were also not significantly different from those in the absence of TTX (OA:  $n = 15$ ; LM:  $n = 10$ ). **C:** Simultaneous fluorescence (top) and membrane-potential (bottom) changes from an O/A interneuron in the presence of the AMPAR/KAR antagonists 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX,  $20 \mu\text{M}$ ) and GYKI52466 ( $30 \mu\text{M}$ ), showing a block of the  $\text{Ca}^{2+}$  increase and depolarization by the antagonists. **D:** Bar graphs for all cells, illustrating the significant reduction of  $\text{Ca}^{2+}$  responses by the AMPAR/KAR antagonists in both O/A ( $n = 5$ ) and *strata radiatum* and *lacunosum-moleculare* (R/LM;  $n = 5$ ) interneurons.

selective vulnerability of O/A cells may not occur through a selective KAR activation in these cells. Our results are concordant with those of Cossart et al. (22), reporting similar responses in OA and R/LM interneurons to submicromolar concentrations of KA. We found, however, that O/A interneurons showed some heterogeneity in their sensitivity to low KA concentration. These results are different from those of Cossart et al. (22), who found that mostly all O/A cells responded to submicromolar KA concentration. The reason for this difference is unclear but could be due to statistical variability, cell-selection bias, or to other methodologic differences (for example, difference in KA concentration:  $250 \text{ nM}$  vs.  $200 \text{ nM}$  in the present study).

#### Short-term KA-induced $\text{Ca}^{2+}$ responses in interneurons

Glutamate excitotoxicity has been proposed to involve a complex molecular cascade initially triggered by an intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  increase [for review, see (47)]. We thus tested whether a differential vulnerability to KA may arise from different intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  responses elicited in both populations of interneurons. Our evidence that  $\text{Ca}^{2+}$  elevations induced by micromolar concentration of KA were

similar in O/A and R/LM cells, and that submicromolar concentration of KA did not elicit detectable  $\text{Ca}^{2+}$  responses in either cell type, suggests that the selective vulnerability of O/A cells may not arise from specific KA-induced  $\text{Ca}^{2+}$  increases in these cells. Although KA exerted similar membrane-conductance changes and intracellular calcium increases in O/A and R/LM cells, it is possible that these calcium responses triggered different intracellular mechanisms downstream from the  $\text{Ca}^{2+}$  elevations. We cannot exclude the possibility, also, that intracellular diffusion of exogenous  $\text{Ca}^{2+}$  chelators may change the endogenous  $\text{Ca}^{2+}$  buffering capacities of cells, leaving undetected possible interneuronal differences in calcium handling, which may be important for cell death. It should be noted as well that the  $\text{Ca}^{2+}$  measurements in our study were made in the somatic region, and these may differ from dendritically located  $\text{Ca}^{2+}$  responses. Clearly, however, the differential vulnerability is not due to differential somatic  $\text{Ca}^{2+}$  responses per se. Interneurons in O/A tended to respond with larger and more variable  $\text{Ca}^{2+}$  increases in the absence of TTX, but appeared to respond with less variability in the presence of TTX, suggesting that the large response variability may reflect the presence

of heterogeneous network-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  increases in different types of O/A interneurons (48,49).

Aside from direct activation of AMPAR/KAR, KA may exert cell-type-specific excitotoxic effects indirectly. Interestingly, distinct somatic  $\text{Ca}^{2+}$  responses mediated by metabotropic glutamate receptors (mGluRs) have been reported specifically in O/A interneurons in response to local applications of glutamate (43). These  $\text{Ca}^{2+}$  responses are mediated by group I/II mGluRs and involve  $\text{Ca}^{2+}$  influx via voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels and release from ryanodine-sensitive intracellular stores (50). These mGluR actions are specific to O/A interneurons and absent from R/LM cells. More recently, AIDA, a group I mGluR antagonist, has been shown to prevent CA1 O/A interneuron loss in the i.p. KA model (14). Hence, because our results indicate that the direct short-term effects of KA are similar in O/A and R/LM interneurons, the selective vulnerability of O/A interneurons may involve the activation of specific mGluR-mediated mechanisms in these cells.

Although short-term effects of KA were not significantly different in O/A and R/LM interneurons, our study does not exclude the possibility of differential long-term effects of KA in these cells. Prolonged cell-type-specific changes, such as reduction of excitatory postsynaptic currents (EPSCs) after i.c.v. KA treatment (51), an increase in KAR density after status epilepticus (17) as well as the formation of aberrant synapses (6,52,53) have been reported.

How relevant are the in vitro data to the in vivo conditions? The hippocampal KA concentration necessary to induce seizures and cell death in vivo is, as yet, unknown. Although epileptiform activity in slices can be obtained by submicromolar concentrations of KA (16,54), short-term applications of micromolar concentrations of KA are excitotoxic to interneurons in hippocampal slice cultures (36,37). Which KA concentration (submicromolar or micromolar) in slices reflects the in vivo conditions remains to be determined, but the broad spectrum of concentrations tested in our study (200 nM and 1–5  $\mu\text{M}$ ) indicates that short-term effects elicited by these KA concentrations were not different in O/A and R/LM interneurons. These short-term effects are thus unlikely to be responsible for the interneuron selective vulnerability.

#### Functional consequences

In normal hippocampus, pyramidal neurons make recurrent excitatory contacts onto O/A interneurons, producing feedback inhibition (55–57). After KA treatment, a large population of O/A cells are lost, whereas interneurons in R/LM cells are partially deafferented, resulting in reduced inhibitory drive to pyramidal cells (8,51). Because some O/A interneuron axons project selectively to *stratum lacunosum-moleculare*, where afferents of the temporammonic (TA) pathway form synapses with distal dendrites of pyramidal cells (58), a functional conse-

quence of O/A cell loss on the CA1 network may be a disinhibition of the TA pathway. Pyramidal cell axonal sprouting and new synapse formation also occur in the CA1 region (6), analogous to the sprouting of mossy fibers in the dentate gyrus (59). Thus after KA treatment, CA1 pyramidal cells also may increase their feedback excitation of other pyramidal cells (6) and of surviving interneurons (57), contributing to network hypersynchrony. In contrast, in younger rats exposed to KA, no pyramidal cell loss occurs (14), but a selective lesion of certain interneurons. Thus the spontaneous recurrent seizures (14) may arise largely from changes involving inhibitory interneurons, although axonal sprouting may still contribute (60).

**Acknowledgment:** We thank Isabel Jutras for technical assistance. N.S. was supported by a studentship from the Savoy Foundation and the Fonds de la recherche en santé du Québec. This research was supported by grants from the Canadian Institute of Health Research (J.-C.L.), the Fonds de la recherche en santé du Québec (J.-C.L.; L.C.), the Fonds pour la formation de chercheurs et l'Aide à la Recherche (J.-C.L.), and a Canada Research Chair in Cellular and Molecular Neurophysiology (J.-C.L.).

#### REFERENCES

- Nadler JV. Minireview: kainic acid as a tool for the study of temporal lobe epilepsy. *Life Sci* 1981;29:2031–42.
- Ben-Ari Y. Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 1985;14:375–403.
- Franck JE, Schwartzkroin PA. Do kainate-lesioned hippocampi become epileptogenic? *Brain Res* 1985;329:309–13.
- Best N, Mitchell J, Baimbridge KG, et al. Changes in parvalbumin-immunoreactive neurons in the rat hippocampus following a kainic acid lesion. *Neurosci Lett* 1993;155:1–6.
- Williams S, Vachon P, Lacaille JC. Monosynaptic GABA-mediated inhibitory postsynaptic potentials in CA1 pyramidal cells of hyperexcitable hippocampal slices from kainic acid-treated rats. *Neuroscience* 1993;52:541–54.
- Perez Y, Morin F, Beaulieu C, et al. Axonal sprouting of CA1 pyramidal cells in hyperexcitable hippocampal slices of kainate-treated rats. *Eur J Neurosci* 1996;8:736–48.
- Morin F, Beaulieu C, Lacaille JC. Selective loss of GABA neurons in area CA1 of the rat hippocampus after intraventricular kainate. *Epilepsy Res* 1998;32:363–9.
- Cossart R, Dinocourt C, Hirsch JC, et al. Dendritic but not somatic GABAergic inhibition is decreased in experimental epilepsy. *Nat Neurosci* 2001;4:52–62.
- Franck JE, Kunkel DD, Baskin DG, et al. Inhibition in kainate-lesioned hyperexcitable hippocampi: physiologic, autoradiographic, and immunocytochemical observations. *J Neurosci* 1988;8:1991–2002.
- Houser CR, Esclapez M. Vulnerability and plasticity of the GABA system in the pilocarpine model of spontaneous recurrent seizures. *Epilepsy Res* 1996;26:207–18.
- Esclapez M, Hirsch JC, Khazipov R, et al. Operative GABAergic inhibition in hippocampal CA1 pyramidal neurons in experimental epilepsy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:12151–6.
- Esclapez M, Houser CR. Up-regulation of GAD65 and GAD67 in remaining hippocampal GABA neurons in a model of temporal lobe epilepsy. *J Comp Neurol* 1999;412:488–505.
- Holmes GL, Ben-Ari Y. The neurobiology and consequences of epilepsy in the developing brain. *Pediatr Res* 2001;49:320–5.
- Renaud J, Emond M, Meilleur S, et al. A class I metabotropic glutamate receptor antagonist limits kainate-induced hippocampal dysfunction. *Epilepsia* 2002;43:1306–17.

15. Fisher RS, Alger BE. Electrophysiological mechanisms of kainic acid-induced epileptiform activity in the rat hippocampal slice. *J Neurosci* 1984;4:1312–23.
16. Ben-Ari Y, Gho M. Long-lasting modification of the synaptic properties of rat CA3 hippocampal neurons induced by kainic acid. *J Physiol* 1988;404:365–84.
17. Ben-Ari Y, Cossart R. Kainate, a double agent that generates seizures: two decades of progress. *Trends Neurosci* 2000;23:580–7.
18. Kullmann DM. Presynaptic kainate receptors in the hippocampus: slowly emerging from obscurity. *Neuron* 2001;32:561–4.
19. Lerma J, Paternain AV, Rodriguez-Moreno A, et al. Molecular physiology of kainate receptors. *Physiol Rev* 2001;81:971–98.
20. Frerking M, Nicoll RA. Synaptic kainate receptors. *Curr Opin Neurobiol* 2000;10:342–51.
21. Cossart R, Epsztein J, Tyzio R, et al. Quantal release of glutamate generates pure kainate and mixed AMPA/kainate EPSCs in hippocampal neurons. *Neuron* 2002;35:147–59.
22. Cossart R, Esclapez M, Hirsch JC, et al. GluR5 kainate receptor activation in interneurons increases tonic inhibition of pyramidal cells. *Nat Neurosci* 1998;1:470–8.
23. Frerking M, Malenka RC, Nicoll RA. Synaptic activation of kainate receptors on hippocampal interneurons. *Nat Neurosci* 1998;1:479–86.
24. Rodriguez-Moreno A, Herreras O, et al. Kainate receptors presynaptically downregulate GABAergic inhibition in the rat hippocampus. *Neuron* 1997;19:893–901.
25. Rodriguez-Moreno A, Lopez-Garcia JC, Lerma J. Two populations of kainate receptors with separate signaling mechanisms in hippocampal interneurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:1293–8.
26. Frerking M, Petersen CC, Nicoll RA. Mechanisms underlying kainate receptor-mediated disinhibition in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:12917–22.
27. Mülle C, Sailer A, Swanson GT, et al. Subunit composition of kainate receptors in hippocampal interneurons. *Neuron* 2000;28:475–84.
28. Cossart R, Tyzio R, Dinocourt C, et al. Presynaptic kainate receptors that enhance the release of GABA on CA1 hippocampal interneurons. *Neuron* 2001;29:497–508.
29. Chittajallu R, Vignes M, Dev KK, et al. Regulation of glutamate release by presynaptic kainate receptors in the hippocampus. *Nature* 1996;379:78–81.
30. Kamiya H, Ozawa S. Kainate receptor-mediated presynaptic inhibition at the mouse hippocampal mossy fibre synapse. *J Physiol* 2000;523:653–65.
31. Schmitz D, Frerking M, Nicoll RA. Synaptic activation of presynaptic kainate receptors on hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron* 2000;27:327–38.
32. Frerking M, Schmitz D, Zhou Q, et al. Kainate receptors depress excitatory synaptic transmission at CA3–>CA1 synapses in the hippocampus via a direct presynaptic action. *J Neurosci* 2001;21:2958–66.
33. Schmitz D, Mellor J, Frerking M, et al. Presynaptic kainate receptors at hippocampal mossy fiber synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:11003–8.
34. Schmitz D, Mellor J, Nicoll RA. Presynaptic kainate receptor mediation of frequency facilitation at hippocampal mossy fiber synapses. *Science* 2001;291:1972–6.
35. Schmitz D, Schuchmann S, Fisahn A, et al. Axo-axonal coupling: a novel mechanism for ultrafast neuronal communication. *Neuron* 2001;31:831–40.
36. Best N, Sundstrom LE, Mitchell J, et al. Pre-exposure to subtoxic levels prevents kainic acid lesions in organotypic hippocampal slice cultures: effects of kainic acid on parvalbumin-immunoreactive neurons and expression of heat shock protein 72 following the induction of tolerance. *Eur J Neurosci* 1996;8:1209–19.
37. Oliva AA Jr, Lam TT, Swann JW. Distally directed dendrotoxicity induced by kainic acid in hippocampal interneurons of green fluorescent protein-expressing transgenic mice. *J Neurosci* 2002;22:8052–62.
38. Dinocourt C, Petanjek Z, Freund TF, et al. Loss of interneurons innervating pyramidal cell dendrites and axon initial segments in the CA1 region of the hippocampus following pilocarpine-induced seizures. *J Comp Neurol* 2003;459:407–25.
39. Poirier JL, Capek R, De Koninck Y. Differential progression of dark neuron and Fluoro-Jade labelling in the rat hippocampus following pilocarpine-induced status epilepticus. *Neuroscience* 2000;97:59–68.
40. Sanon N, Ermond M, Lacaille JC, et al. Selective vulnerability of CA1 oriens/alveus interneurons to kainic acid-induced seizures. *Epilepsia* 2002;43:236.
41. West MJ, Slomiánka L, Gundersen HJ. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec* 1991;231:482–97.
42. Howard C, Reed M. Unbiased stereology. In: Goldby P. *Three-dimensional measurement in microscopy*. Oxford: BIOS Scientific, 1998:246.
43. Carmant L, Woodhall G, Ouardouz M, et al. Interneuron-specific Ca<sup>2+</sup> responses linked to metabotropic and ionotropic glutamate receptors in rat hippocampal slices. *Eur J Neurosci* 1997;9:1625–35.
44. Freund TF, Buzsáki G. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 1996;6:347–470.
45. Sloviter RS, Zappone CA, Harvey BD, et al. “Dormant basket cell” hypothesis revisited: relative vulnerabilities of dentate gyrus mossy cells and inhibitory interneurons after hippocampal status epilepticus in the rat. *J Comp Neurol* 2003;459:44–76.
46. Castillo PE, Malenka RC, Nicoll RA. Kainate receptors mediate a slow postsynaptic current in hippocampal CA3 neurons. *Nature* 1997;388:182–6.
47. Choi DW. Calcium and excitotoxic neuronal injury. *Ann N Y Acad Sci* 1994;747:162–71.
48. McBain CJ, DiChiara TJ, Kauer JA. Activation of metabotropic glutamate receptors differentially affects two classes of hippocampal interneurons and potentiates excitatory synaptic transmission. *J Neurosci* 1994;14:4433–45.
49. Sik A, Penttonen M, Ylinen A, et al. Hippocampal CA1 interneurons: an in vivo intracellular labeling study. *J Neurosci* 1995;15:6651–65.
50. Woodhall G, Gee CE, Robitaille R, et al. Membrane potential and intracellular Ca<sup>2+</sup> oscillations activated by mGluRs in hippocampal stratum oriens/alveus interneurons. *J Neurophysiol* 1999;81:371–82.
51. Morin F, Beaulieu C, Lacaille JC. Cell-specific alterations in synaptic properties of hippocampal CA1 interneurons after kainate treatment. *J Neurophysiol* 1998;80:2836–47.
52. Nadler JV, Penry BW, Gentry C, et al. Degeneration of hippocampal CA3 pyramidal cells induced by intraventricular kainic acid. *J Comp Neurol* 1980;192:333–59.
53. Cronin J, Dudek FE. Chronic seizures and collateral sprouting of dentate mossy fibers after kainic acid treatment in rats. *Brain Res* 1988;474:181–4.
54. Westbrook GL, Lothman EW. Cellular and synaptic basis of kainic acid-induced hippocampal epileptiform activity. *Brain Res* 1983;273:97–109.
55. Maccafieri G, McBain CJ. Passive propagation of LTD to stratum oriens-alveus inhibitory neurons modulates the temporospatial input to the hippocampal CA1 region. *Neuron* 1995;15:137–45.
56. Lacaille JC, Mueller AL, Kunkel DD, et al. Local circuit interactions between oriens/alveus interneurons and CA1 pyramidal cells in hippocampal slices: electrophysiology and morphology. *J Neurosci* 1987;7:1979–93.
57. Blasco-Ibanez JM, Freund TF. Synaptic input of horizontal interneurons in stratum oriens of the hippocampal CA1 subfield: structural basis of feed-back activation. *Eur J Neurosci* 1995;7:2170–80.
58. Colbert CM, Levy WB. Electrophysiological and pharmacological characterization of perforant path synapses in CA1: mediation by glutamate receptors. *J Neurophysiol* 1992;68:1–8.
59. Ben-Ari Y. Cell death and synaptic reorganizations produced by seizures. *Epilepsia* 2001;42(suppl 3):5–7.
60. Tandon P, Yang Y, Stafstrom CE, et al. Downregulation of kainate receptors in the hippocampus following repeated seizures in immature rats. *Brain Res Dev Brain Res* 2002;136:145–50.

## **Chapitre III**

### **Interneuron sub-type specific activation of mGluR1/5 during epileptiform activity in hippocampus**

Sanon N, Pelletier J-G, Carmant L, Lacaille J-C

*Epilepsia* 51 (8): 1607-1618, 2010

FULL-LENGTH ORIGINAL RESEARCH

## Interneuron subtype specific activation of mGluR1/5 during epileptiform activity in hippocampus

\*†Nathalie T. Sanon, \*Joe Guillaume Pelletier, †Lionel Carmant, and \*Jean-Claude Lacaille

\*Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Central, Département de Physiologie, Université de Montréal, Québec, Canada; and †Département de Pédiatrie, division Neurologie, Centre de recherche de l'Hôpital Sainte-Justine, Université de Montréal, Québec, Canada

### SUMMARY

**Purpose:** Specific inhibitory interneurons in area CA1 of the hippocampus, notably those located in *stratum oriens-aleveus* (O/A-INs), are selectively vulnerable in patients and animal models of temporal lobe epilepsy (TLE). The excitotoxic mechanisms underlying the selective vulnerability of interneurons have not been identified but could involve group I metabotropic glutamate receptor subtypes (mGluR1/5), which have generally proconvulsive actions and activate prominent cationic currents and calcium responses specifically in O/A-INs.

**Methods:** In this study, we examine the role of mGluR1/5 in interneurons during epileptiform activity using whole-cell recordings from CA1 O/A-INs and selective antagonists of mGluR1 $\alpha$  (LY367385) and mGluR5 (MPEP) in a disinhibited rat hippocampal slice model of epileptiform activity.

**Results:** Our data indicate more prominent epileptiform burst discharges and paroxysmal depolarizations (PDs) in

O/A-INs than in interneurons located at the border of *strata radiatum* and *lacunosum/moleculare* (R/LM-INs). In addition, mGluR1 and mGluR5 significantly contributed to epileptiform responses in O/A-INs but not in R/LM-INs. Epileptiform burst discharges in O/A-INs were partly dependent on mGluR5. PDs and associated postsynaptic currents were dependent on both mGluR1 $\alpha$  and mGluR5. These receptors contributed differently to postsynaptic currents underlying PDs, with mGluR5 contributing to the fast and slow components and mGluR1 $\alpha$  to the slow component.

**Discussion:** These findings support interneuron subtype-specific activation and differential contributions of mGluR1 $\alpha$  and mGluR5 to epileptiform activity in O/A-INs, which could be important for their selective vulnerability in TLE.

**KEY WORDS:** Temporal lobe epilepsy, Hyperexcitability, Whole-cell patch-clamp, Metabotropic glutamate receptors, Inhibitory interneurons.

In human temporal lobe epilepsy (TLE) selective hippocampal cell loss has been well described (Dam, 1980; Babb et al., 1984). In animal models, injections of kainic acid (KA) or pilocarpine lead to analogous patterns of hippocampal cell loss, associated with limbic network hyperexcitability and recurrent seizures (Nadler, 1981; Ben Ari, 1985; Franck & Schwartzkroin, 1985; Williams et al., 1993; Perez et al., 1996; Morin et al., 1998). Immunocytochemical studies have established that, in CA1 region, glutamic acid decarboxylase (GAD)-positive interneurons are preferentially vulnerable (Houser & Esclapez, 1996; Morin et al., 1998; Cossart et al., 2001), specifically those interneuron subtypes that are immunopositive for parvalbumin and

somatostatin (Best et al., 1993; Esclapez & Houser, 1995; Dinocourt et al., 2003; Sanon et al., 2005), located in *strata oriens* and *aleveus* (O/A-INs) (Morin et al., 1998; Houser & Esclapez, 1996). Other CA1 GAD-positive cells are preserved (Franck et al., 1988; Morin et al., 1998), including interneurons located at the border of *strata radiatum* and *lacunosum-moleculare* (R/LM-INs). Thus far, little is known of the excitotoxic mechanisms underlying this interneuron subtype selective vulnerability, but since KA and pilocarpine both induce similar seizures and cell losses, despite acting through different receptors (Cossart et al., 1998), glutamate-related excitotoxic mechanisms are likely implicated (Meldrum, 1993; Cossart et al., 1998; Sanon et al., 2005). Moreover, direct effects of KA are unlikely to be involved, since membrane and calcium responses evoked by KA in O/A-INs and R/LM-INs are similar (Sanon et al., 2005).

Metabotropic glutamate receptors (mGluRs) are a class of glutamate receptors that could be involved in the selective interneuron vulnerability. Activation of group II and III

mGluRs, negatively coupled to adenylate cyclase, generally produce anticonvulsant effects (Attwell et al., 1998; but see Ngomba et al., 2005). In contrast, activation of group I mGluRs (mGluR1/5), generally linked to phospholipase C (PLC), inositol 1,3,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>), and diacylglycerol (DAG) pathways, have proconvulsant effects (Camon et al., 1998; Chapman et al., 2000; but see Baskys et al., 2005). In hippocampus, mGluR1/5 have been specifically implicated in epileptogenesis. KA-induced hippocampal dysfunction and CA1 interneuron loss in rats were prevented by in vivo administration of an mGluR1/5 antagonist (Renaud et al., 2002). In vitro, mGluR1/5 agonists induce ictal-like discharges and a long-lasting enhancement of epileptiform synaptic responses in CA3 pyramidal cells (Merlin & Wong, 1997). In area CA1 of the hippocampus, mGluR1 is highly expressed in interneurons (Ferraguti et al., 1998), whereas mGluR5 is present in both interneurons and pyramidal cells (Shigemoto et al., 1997). Moreover, mGluR1/5 are linked to prominent responses specifically in O/A-INs. The large oscillatory inward currents (McBain et al., 1994) are coupled to large oscillatory intracellular Ca<sup>2+</sup> rises (Woodhall et al., 1999) and are dependent on mGluR1/5 (van Hooft et al., 2000). Recently, distinct mGluR1/5 Ca<sup>2+</sup> signaling mechanisms have been identified in O/A-INs (Topolnik et al., 2006): mGluR1 $\alpha$  induces a rapid Ca<sup>2+</sup> entry through transient receptor potential (TRP) channels and additional release from intracellular stores via a Src/extracellular signal-regulated kinase (ERK)-dependent cascade, whereas mGluR5 elicits a slower Ca<sup>2+</sup> release from intracellular stores (Topolnik et al., 2006). Synaptic activation has been linked to activation of mGluR1-mediated slow excitatory postsynaptic currents (EPSCs) (Huang et al., 2004) and induction of long-term potentiation (Topolnik et al., 2006; Perez et al., 2001) in O/A-INs. However, seizure activity leading to selective interneuron cell loss likely recruits additional mechanisms, and the role of mGluR1/5 in interneurons during epileptiform synaptic activity has not been previously addressed.

Therefore, the aim of this study was to examine the implication of mGluR1/5 in synaptically evoked epileptiform activity in CA1 interneurons using selective antagonists for mGluR1 $\alpha$  (LY367385; LY) and mGluR5 [2-methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine; MPEP]. Our findings reveal interneuron subtype-specific activation of mGluR1/5 and distinct implications of mGluR1 $\alpha$  and mGluR5 in epileptiform activity in O/A-INs.

## METHODS AND MATERIALS

### Slice preparation and electrophysiology

Research protocols using animals were approved and conducted according to the Université de Montréal Animal Care Guidelines. Transverse hippocampal slices were prepared as described previously by Sanon et al., 2005. Briefly, male Sprague-Dawley rats (20–30 days old) were

anesthetized with halothane (MTC Pharmaceuticals, Cambridge, ON, Canada) and decapitated. The brain was extracted and immersed in cold (4°C) and oxygenated (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing (in mM): 250 sucrose, 2 KCl, 0.5 CaCl<sub>2</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 7 MgSO<sub>4</sub>, and 10 D-glucose (pH 7.3–7.4; 300–310 mOsm). Hippocampal slices (300  $\mu$ m) were cut using a Vibratome (Leica Microsystems Inc., Buffalo, NY, U.S.A.) and placed in ACSF containing (in mM): 124 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 MgSO<sub>4</sub>, and 10 D-glucose (pH 7.3–7.4; 300–310 mOsm) at room temperature. A surgical cut was made at the CA3–CA1 junction to isolate CA3 and CA1 regions and prevent antidromically evoked effects in CA3 to propagate to CA1 area. Slices were allowed to recover  $\geq$ 1 h before individual slices were transferred in a recording chamber and maintained submerged in ACSF (2–3 ml/min at 30°C). Interneurons were identified with their cell body located in *stratum oriens* near the *alveus* (O/A-INs) (Perez et al., 2001; Topolnik et al., 2006) or in *stratum radiatum* near the *lacunosum-moleculare* border (R/LM-INs) (Woodhall et al., 1999) using an upright microscope (Olympus America Inc., Melville, NY, U.S.A.) equipped with differential interference contrast (DIC) and infrared (IR) video camera (Cohu, San Diego, CA, U.S.A.). Whole-cell recordings were made using borosilicate patch pipettes (1 mm OD; A-M Systems, Carlsborg, WA, U.S.A.) of 4–7 M $\Omega$  resistance when filled with an intracellular solution containing (in mM): 140 K-gluconate, 10 HEPES, 1 MgCl<sub>2</sub>, 8 NaCl, 10 phosphocreatine, 0.4 GTP, 2 ATP, 0.15% biocytin, and 0.5 EGTA (pH 7.2–7.3 adjusted with KOH, 290 mOsm). In some experiments *N*-(2,6-dimethyl-phenylcarbamoylmethyl) triethylammonium bromide (QX-314, 1  $\mu$ M) (Sigma, St-Louis, MO, U.S.A.) was added to the intracellular solution. Signals were acquired using an Axopatch 200B amplifier (low-pass filtering at 1 kHz). Data acquisition (2 kHz sampling rate) and analysis were performed using a Digidata 1200 analog-digital converter (Axon Instruments, Foster City, CA, U.S.A.) and pClamp software (versions 7 and 9; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, U.S.A.). In current clamp experiments, membrane potential and cell input resistance were regularly monitored, and cells with unstable responses were discarded. Series resistance was routinely monitored, and recordings with >20% changes were discarded. The series resistance was compensated to 70% and the liquid junction potential was not corrected.

### Pharmacology

To investigate interneuron epileptiform discharges, we adapted to CA1 interneurons the disinhibited slice model used by Lee et al. (2002) to uncover activation of mGluR1/5 during epileptiform synaptic responses in hippocampal CA3 pyramidal cells. Epileptiform discharges were evoked by electrical stimulation (5 pulses, 100 Hz, 50 ms, 0.2–0.5 mA) with a concentric bipolar electrode placed in the

same layer as the recorded cell, in the presence of bicuculline methiodide (10  $\mu\text{M}$ ) and 4-aminopyridine (100  $\mu\text{M}$ ) (BIC+4-AP) (Sigma) (Brückner et al., 1999; Lee et al., 2002). It should be noted that *N*-methyl derivatives of bicuculline have been reported to block the  $\text{K}^+$  current underlying the low threshold spike burst afterhyperpolarization in reticularis neurons of the thalamus (Debarbieux et al., 1998). During current-clamp recordings, basal membrane potential was maintained at  $-65$  mV. In voltage-clamp experiments, basal holding membrane potential was  $-60$  mV, except for experiments with applications of individual mGluR1/5 antagonists for which holding membrane potential was  $-40$  mV.

For recordings of paroxysmal depolarizations and post-synaptic currents, the intracellular solution contained the lidocaine derivative *N*-(2,6-dimethylphenylcarbamoyl-methyl) triethylammonium bromide (QX-314, 2 mM) obtained from Alomone Labs (Jerusalem, Israel), 6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX, 20  $\mu\text{M}$ ), 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione (DNQX, 25  $\mu\text{M}$ ), and 2-amino-5-phosphonopentanoic acid (AP5, 50  $\mu\text{M}$ ) were acquired from Sigma. Alpha-amino-4-carboxy-2-methylbenzeneacetic acid (LY367385, 100  $\mu\text{M}$ ) and 2-methyl-6-(phenylethynyl)pyridine (MPEP, 25  $\mu\text{M}$ ) were purchased from Tocris (Ellisville, MO, U.S.A.).

### Histology

After electrophysiological experiments, slices containing biocytin-filled cells were fixed in 4% paraformaldehyde overnight (4°C), rinsed in PB (0.2 M), and placed in  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0.3% in PB 0.1 M). Following several rinses in PBS and PBS-Triton (Triton 10%, dimethyl sulfoxide), slices were incubated in avidin-biotin complex (Vectastain ABC kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA, U.S.A.). The reaction product was visualized using a DAB-nickel solution (Tris, nickel sulfate, imidazole, DAB 1%,  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.3%). Slices were mounted in DPX mounting medium (Electron Microscopy Sciences, Ft Washington, PA, U.S.A.) and observed using a light microscope. Morphologic characterization of the recorded cells was used to verify that the cells included in the study were interneurons and not pyramidal cells. O/A-INs and R/LM-INs recorded in the present study may comprise a heterogeneous mixture of different cell types (Somogyi & Klausberger, 2005), and we did not recover a sufficient number of cells with extensive filling of dendritic and axonal arborizations to distinguish among these cell types. Therefore, our definitions of O/A-IN and R/LM-IN in the present study represent the most frequently recorded interneuron cell types in those layers.

### Statistical analysis

Data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) unless specified otherwise. Differences between groups were assessed using Student's *t*-tests for planned

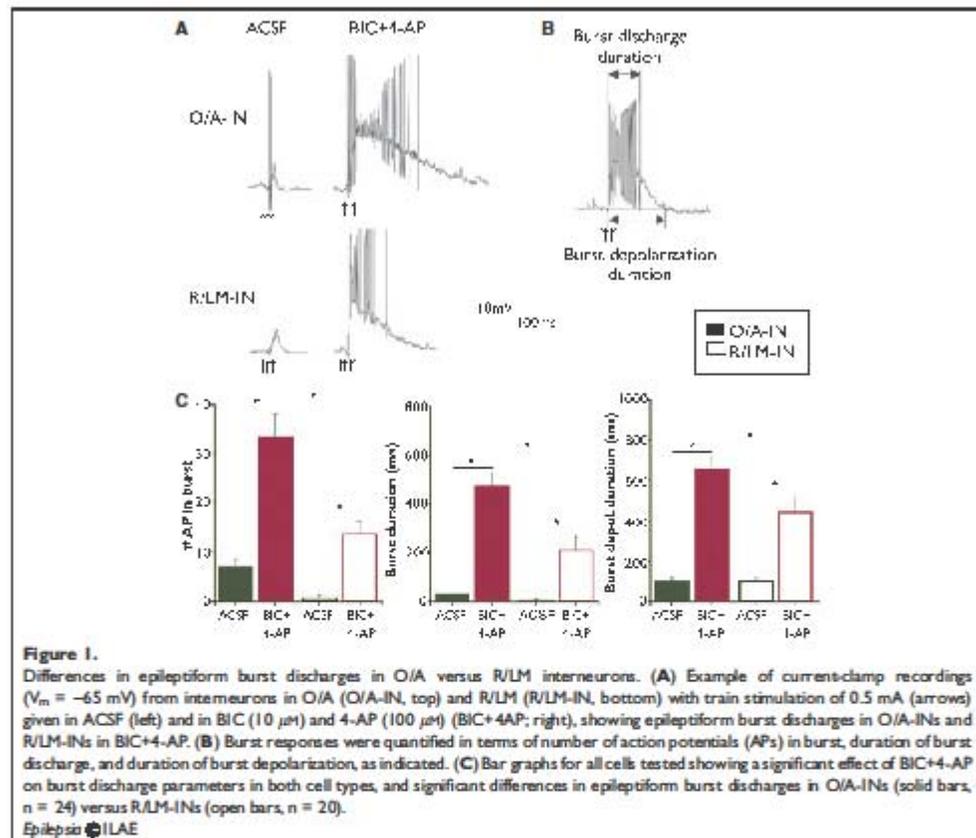
comparisons (Sinclair, 1988). Paired *t*-tests or repeated measure analyses of variance (ANOVAs) were performed for comparisons in pharmacological experiments with two or more treatments, respectively, in the same cells, and unpaired *t*-tests for comparisons of O/A versus R/LM cell groups, with significance level set at  $p < 0.05$ , using SPSS software (SPSS Inc., Chicago, IL, U.S.A.) and Prism 4 (Graph Pad Inc., San Diego, CA, U.S.A.).

## RESULTS

### Cell-type-specific epileptiform burst responses in O/A-INs

Combined application of BIC and 4AP has been shown to produce prolonged ictal-like discharges in brain slices (Brückner et al., 1999; Lee et al., 2002). We first examined if epileptiform burst discharges evoked by electrical stimulation in BIC+4-AP were different in interneurons of O/A-IN versus R/LM-IN, using current-clamp recordings. In control conditions (normal ACSF), stimulation intensity was adjusted to elicit a maximal response. Then, a brief train of stimuli in *stratum oriens* (5 pulses, 100 Hz, 0.5 mA) evoked a synaptic response in O/A-INs (Fig. 1A top) consisting of a short burst of  $7.2 \pm 1.4$  action potentials (APs) with a burst discharge duration of  $29.8 \pm 4.1$  ms and associated with an underlying depolarization of  $103.8 \pm 8.4$  ms in duration ( $n = 24$  O/A-INs; Fig. 1B,C). After addition of BIC+4AP, the same cells responded to stimulation with an epileptiform discharge composed of a burst of  $33.5 \pm 4.6$  APs, lasting  $478.3 \pm 53.1$  ms and associated with a burst depolarization of  $656.8 \pm 57.9$  ms in duration. In R/LM-INs, similar stimulation at the border of *strata radiatum* and *lacunosum-moleculare* in control conditions evoked synaptic responses (Fig. 1A bottom) that were usually subthreshold ( $0.9 \pm 0.4$  APs) and associated with a burst discharge duration of  $5.4 \pm 2.5$  ms (when present) and an underlying burst depolarization of  $103.6 \pm 13.5$  ms in duration ( $n = 20$ , R/LM-INs). In the same R/LM-INs, stimulation in BIC+4AP elicited an epileptiform burst discharge consisting of  $13.6 \pm 2.6$  APs with a burst discharge duration lasting  $204.1 \pm 47.2$  ms and a burst depolarization of  $438.7 \pm 65.6$  ms in duration (Fig. 1C). Epileptiform burst discharges elicited in BIC+4-AP were significantly different in the two subtypes of interneurons, with a greater number of APs in bursts, and longer duration burst discharges and burst depolarizations in O/A-INs than R/LM-INs (Fig. 1C). These results indicate interneuron subtype-specific differences in epileptiform activity elicited in disinhibited slices (BIC+4-AP), with epileptiform activity being of greater magnitude in O/A-INs.

To rule out the possibility that differences in responses were due to the different stimulation sites, we performed cross-stimulation protocols. In BIC+4AP, stimulation at the border of *strata radiatum* and *lacunosum-moleculare* evoked epileptiform burst discharges in O/A-INs with

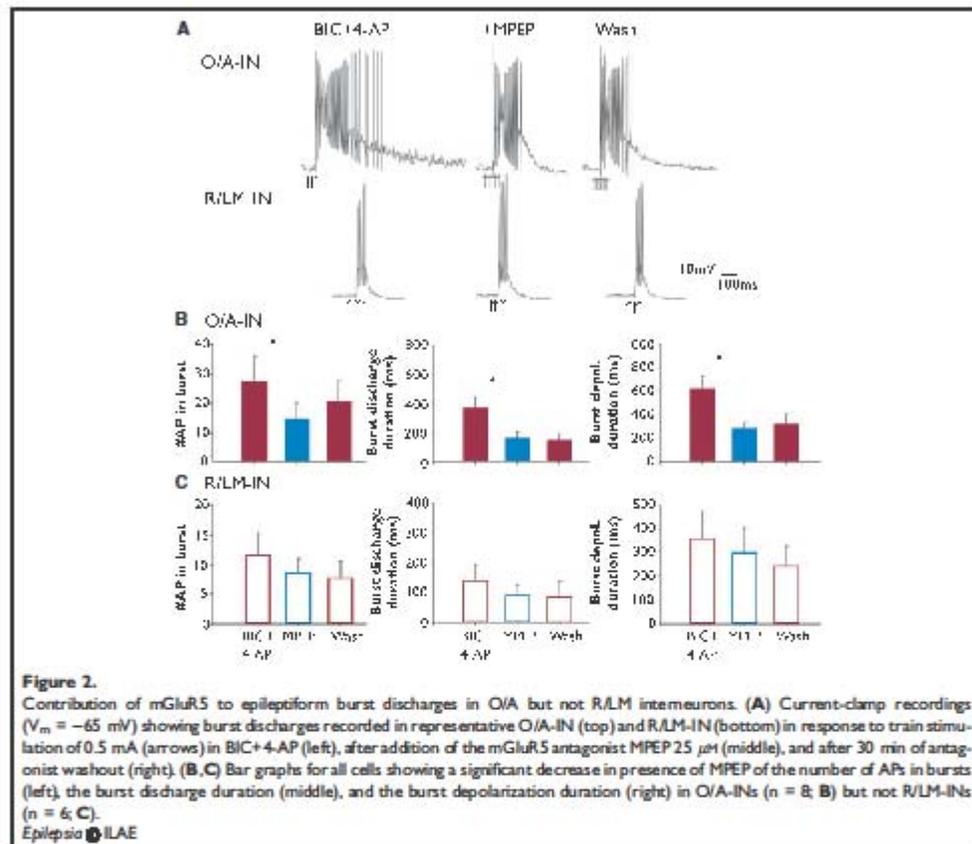


underlying burst depolarization duration of  $351.1 \pm 103.9$  ms ( $n = 5$ ; Fig. S1A). Conversely, stimulation in *stratum oriens* elicited epileptiform burst discharges in R/LM-INs with a burst depolarization duration of  $229.0 \pm 99.4$  ms ( $n = 5$ ; Fig. S1B). These responses were significantly larger in O/A-INs than in R/LM-INs (Fig. S1C), suggesting that the more pronounced epileptiform burst discharges in O/A-INs were independent of the stimulation site.

#### mGluR5 contribution to epileptiform burst discharges in O/A-INs but not R/LM-INs

To evaluate the role of mGluR5 in synaptically evoked epileptiform burst responses, we examined the effect of the selective mGluR5 antagonist MPEP (Salt et al., 1999) on burst discharges evoked in BIC+4-AP. Burst discharges were recorded first in the presence of BIC+4-AP and again in the same cells following 15–20 min application of the

antagonist MPEP. In the presence of BIC+4AP and MPEP, we found that burst discharges in O/A-INs were significantly decreased in comparison to BIC+4AP alone (Fig. 2A). The number of APs in the burst was significantly diminished to  $54.3 \pm 18.1\%$  of control responses, the burst discharge duration decreased to  $45.0 \pm 10.5\%$  of control responses, and the burst depolarization duration diminished to  $46.6 \pm 5.8\%$  of control responses ( $n = 8$  O/A-INs) (Fig. 2B). In contrast, in R/LM-INs, in the presence of BIC+4AP and MPEP, burst discharges were not significantly different than in BIC+4AP (number of APs  $74.7 \pm 19.7\%$  of control responses, burst discharge duration  $65.1 \pm 24.7\%$  of control responses, and burst depolarization duration  $83.4 \pm 28.2\%$  of control responses;  $n = 6$  R/LM-INs) (Fig. 2C). These findings suggest that mGluR5 is activated and plays a significant role in epileptiform burst discharges, specifically in O/A-INs but not in R/LM-INs.



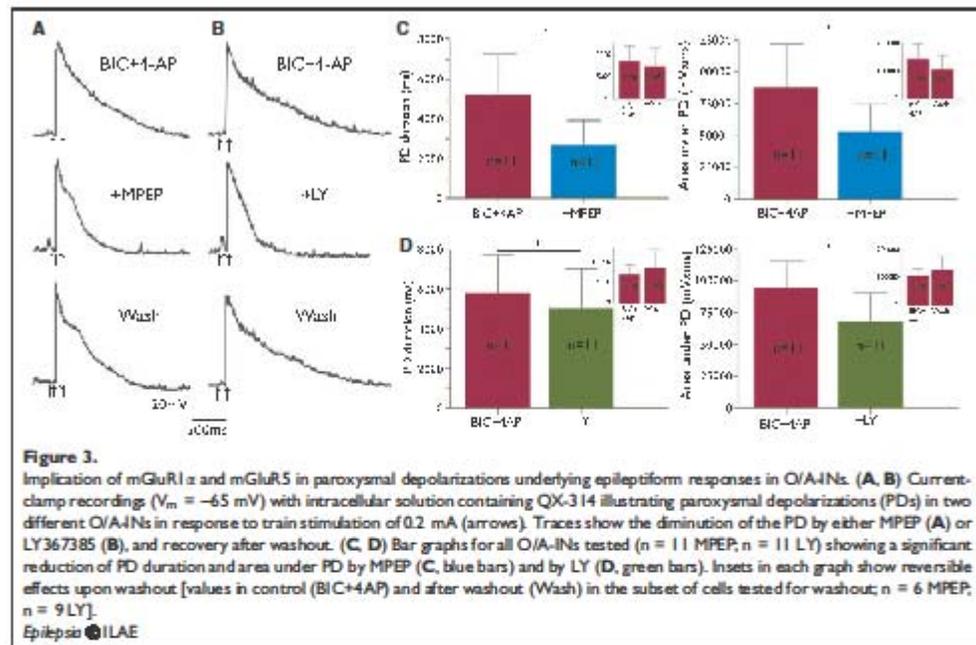
#### No contribution of mGluR1 $\alpha$ to epileptiform burst discharges in O/A-INs or R/LM-INs

To assess the role of mGluR1 $\alpha$  in epileptiform burst discharges, we examined the effect of the selective mGluR1 $\alpha$  antagonist LY367385 (LY) (Clark et al., 1997) on responses evoked in BIC+4-AP (Fig. S2A). Epileptiform burst discharges in O/A-INs were not significantly affected in LY relative to BIC+4-AP (number of APs  $90.8 \pm 25.1\%$  of control responses, burst discharge duration  $76.6 \pm 19.1\%$  of control responses, and burst depolarization duration  $82.6 \pm 16.9\%$  of control responses;  $n = 7$ , Fig. S2B). Similarly, epileptiform burst discharges in R/LM-INs were not significantly altered in LY (number of APs  $83.6 \pm 31.4\%$  of control responses, burst discharge duration  $51.3 \pm 18.3\%$  of control responses, and burst depolarization duration  $72.1 \pm 7.3\%$  of control responses;  $n = 7$ , Fig. S2C). These results suggest that mGluR1 $\alpha$  does not contribute

significantly to epileptiform burst discharges in either type of interneurons.

#### Significant contribution of mGluR1 $\alpha$ and mGluR5 to paroxysmal depolarizations evoked in O/A-IN but not R/LM-IN

Epileptiform burst discharges are composed of synaptic depolarizing responses and AP firing. To examine the contributions of mGluR1 $\alpha$  and mGluR5 to synaptic responses independent of AP firing, we used QX-314 intracellularly to block voltage-dependent  $\text{Na}^+$  channels and AP firing. In experiments with intracellular solution containing QX-314, the stimulation was adjusted to the minimal intensity to elicit a maximal response (0.2 mA), and responses did not display fast  $\text{Na}^+$ -mediated action potentials, although often showed  $\text{Ca}^{2+}$ -mediated spikes. The duration of synaptic depolarizing responses evoked in O/A-INs in BIC+4-AP



**Figure 3.**

Implication of mGluR1 $\alpha$  and mGluR5 in paroxysmal depolarizations underlying epileptiform responses in O/A-INs. (A, B) Current-clamp recordings ( $V_m = -65$  mV) with intracellular solution containing QX-314 illustrating paroxysmal depolarizations (PDs) in two different O/A-INs in response to train stimulation of 0.2 mA (arrows). Traces show the diminution of the PD by either MPEP (A) or LY367385 (B), and recovery after washout. (C, D) Bar graphs for all O/A-INs tested ( $n = 11$  MPEP;  $n = 11$  LY) showing a significant reduction of PD duration and area under PD by MPEP (C, blue bars) and by LY (D, green bars). Insets in each graph show reversible effects upon washout [values in control (BIC+4AP) and after washout (Wash) in the subset of cells tested for washout;  $n = 6$  MPEP;  $n = 9$  LY].

Epilepsia © ILAE

was significantly greater in experiments with QX-314 ( $5.18 \pm 2.08$  s,  $n = 11$ ) (Fig. 3C) than in those without ( $656.8 \pm 57.9$  ms,  $n = 24$ ) (Fig. 1C). By analogy to the paroxysmal depolarizing shift typical of epileptiform responses, we refer to the synaptic responses recorded in BIC+4AP and QX-314 as paroxysmal depolarizations (PDs).

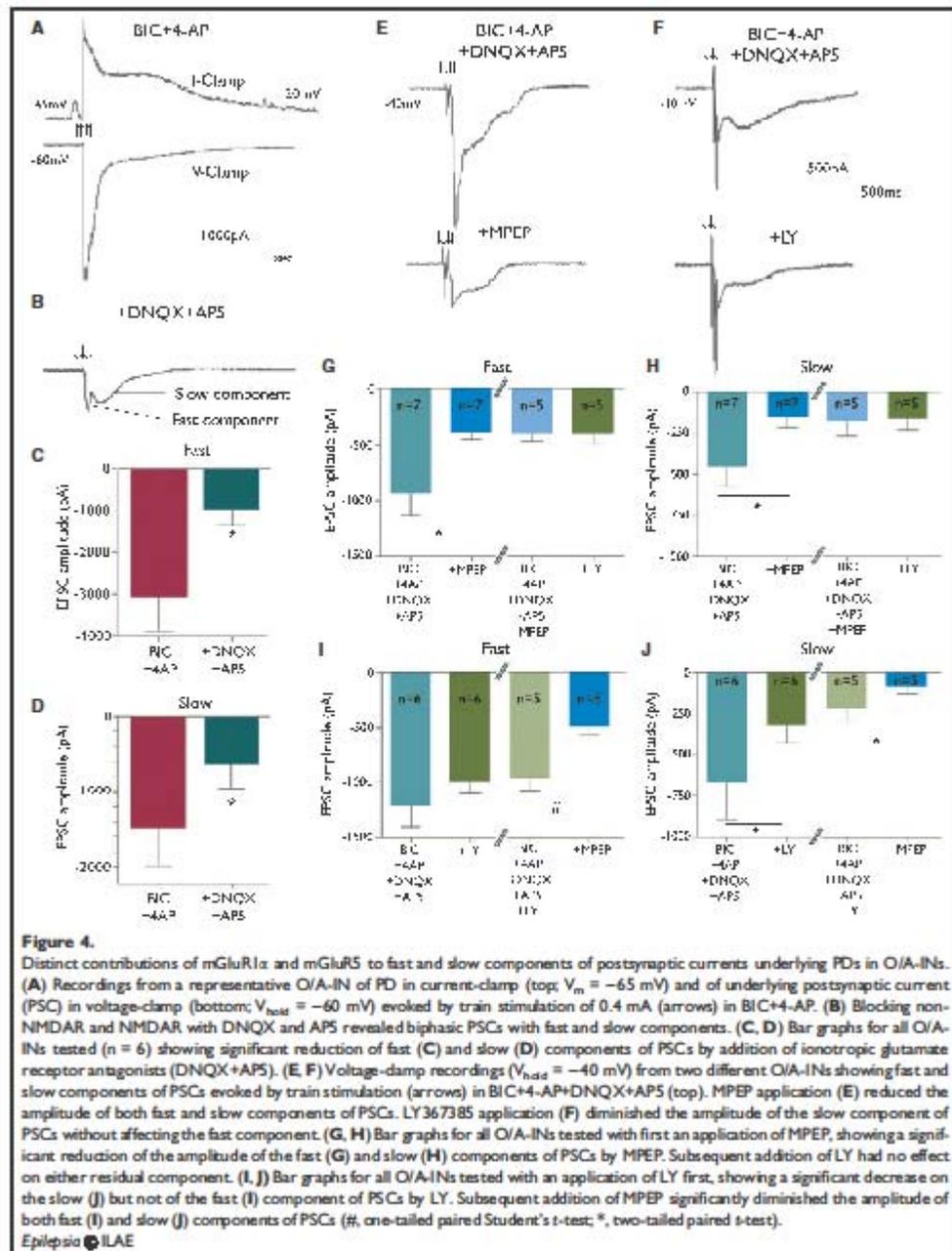
We next examined the contributions of mGluR1 $\alpha$  and mGluR5 to PDs. In the presence of the mGluR5 antagonist MPEP, PDs were significantly reduced in O/A-INs. In MPEP, PD duration was significantly diminished to  $52.1 \pm 23.2\%$  of control responses, and PD area under the curve was significantly diminished to  $59.6 \pm 25.2\%$  of control responses ( $n = 11$ ) (Fig. 3A,C). Similarly, PDs in O/A-INs were significantly reduced by the mGluR1 $\alpha$  antagonist LY367385. In LY, PD duration was significantly decreased to  $86.8 \pm 34.2\%$  of control responses and PD area under the curve was significantly decreased to  $72.8 \pm 23.3\%$  of control responses ( $n = 11$ ) (Fig. 3B,D). The effects of the antagonists were reversible, and PDs returned to control levels after a 15-min wash period (Fig. 3C,D insets for cells with wash). Therefore, our findings indicate that both mGluR1 $\alpha$  and mGluR5 contribute to the PDs evoked in O/A-INs in disinhibited slices.

In contrast to responses in O/A-INs, PDs in R/LM-INs were not significantly reduced by the combined application

of mGluR1 $\alpha$  and mGluR5 antagonists. In MPEP+LY, PD duration was  $119.8 \pm 10.2\%$  of control responses and area under PD was  $79.8 \pm 12.3\%$  of control responses ( $n = 8$ ) (Fig. S3). Overall, these findings indicate that mGluR1 $\alpha$  and mGluR5 receptor subtypes contribute significantly to synaptically evoked PDs in O/A-INs but not in R/LM-INs.

#### Contribution of mGluR1/5 to distinct components of PSCs underlying PDs in O/A-INs

Having determined that mGluR1 $\alpha$  and mGluR5 contribute to synaptically evoked PDs in O/A-INs, we next examined their role in postsynaptic currents underlying PDs. In voltage-clamp mode ( $V_{\text{hold}} = -60$  mV), stimulation in BIC+4-AP evoked large inward postsynaptic currents (PSCs) corresponding to the large depolarization observed in current-clamp mode in the same cell (Fig. 4A;  $n = 6$ ). The duration of evoked PSCs was similar to that of PDs (Fig. 4A). The large PSC was dependent in part on ionotropic *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) and non-NMDA receptors, since it was reduced by the addition of DNQX and AP5, yielding a residual biphasic PSC with fast and slow components (Fig. 4B). In DNQX and AP5, the amplitude of fast PSCs diminished to  $30.7 \pm 12.7\%$  of control responses (Fig. 4C;  $n = 6$ ), whereas the amplitude of slow PSCs, measured between 200 and 400 ms after stimulation, diminished to  $41.9 \pm 22.8\%$  of control responses (Fig. 4D).



These results suggest that both ionotropic (non-NMDA and NMDA) and metabotropic (mGluR1 $\alpha$  and mGluR5) glutamate receptors contribute to postsynaptic currents underlying PDs.

To examine how mGluR1 $\alpha$  and mGluR5 contribute to different components of PSCs underlying PDs in O/A-INs, we tested the effects of separate applications of MPEP or LY on the biphasic, fast and slow, components of PSCs evoked in BIC+4-AP+DNQX+AP5 ( $V_{\text{hold}} = -40$  mV; Fig. 4E–J). The amplitude of the fast component of PSCs was significantly reduced to  $41.5 \pm 7.2\%$  of control responses in MPEP ( $n = 7$ ) (Fig. 4G), but was not significantly decreased in LY ( $82.1 \pm 8.3\%$  of control responses) ( $n = 6$ ) (Fig. 4I). Further application of MPEP to cells that previously received LY, significantly reduced the amplitude of the fast component of PSCs relative to LY alone ( $51.4 \pm 7.6\%$  of control responses;  $n = 5$ ; Fig. 4I;  $p < 0.05$  one-tailed Student's *t*-test). However, further application of LY to cells that previously received MPEP, did not affect significantly the amplitude of the fast component of PSCs relative to MPEP alone ( $94.3 \pm 12.7\%$  of control responses;  $n = 5$ ; Fig. 4G). These results imply that mGluR5 contributes to the fast component of PSCs underlying PDs, whereas mGluR1 $\alpha$  does not.

In contrast, the amplitude of the slow component of PSCs was significantly decreased in MPEP to  $33.9 \pm 13.9\%$  of control responses ( $n = 7$ ) (Fig. 4H), and in LY to  $48.0 \pm 17.0\%$  of control responses ( $n = 6$ ) (Fig. 4J). Further application of MPEP to cells that previously received LY, significantly reduced the amplitude of the slow component of PSCs relative to LY alone ( $36.7 \pm 21.8\%$  of control responses;  $n = 5$ ;  $p < 0.05$ ) (Fig. 4J). However, further application of LY to cells that previously received MPEP, did not affect significantly the amplitude of the slow component of PSCs relative to MPEP alone ( $95.4 \pm 27.9\%$  of control responses;  $n = 5$ ; Fig. 4H). These results indicate that both mGluR1 $\alpha$  and mGluR5 contribute to the slow component of PSCs. Therefore, our pharmacological data suggest that mGluR1 $\alpha$  and mGluR5 play different roles in postsynaptic currents underlying PDs, with mGluR5 contributing to both fast and slow components of PSCs and mGluR1 $\alpha$  to slow components.

#### No mGluR1 $\alpha$ and mGluR5 contribution to PSCs underlying PDs in R/LM-INs

Although we observed no evidence of mGluR1/5 implication in PDs in R/LM-INs, we used more sensitive voltage-clamp recordings of PSCs to further evaluate mGluR1/5 contributions to synaptic currents underlying PDs in these cells. In BIC+4AP, stimulation evoked PDs in current-clamp and PSCs in voltage-clamp ( $V_m = -60$  mV) of much smaller magnitude than in O/A-INs (Fig. S4A; note difference in calibration with Fig. 4). The addition of DNQX+AP5 significantly diminished the PSC amplitude in all cells tested (Fig. S4D,  $n = 5$ ). However, further addition

of both MPEP and LY had no effect on the amplitude of PSCs relative to BIC+4-AP+DNQX+AP5 (Fig. S4C). Therefore, these results further indicate a lack of mGluR1/5 implication in synaptically evoked epileptiform activity in R/LM-INs.

## DISCUSSION

In this study we identified an interneuron subtype-specific role of mGluR1 $\alpha$  and mGluR5 during synaptically evoked epileptiform activity in disinhibited rat hippocampal slices. Our findings reveal more prominent burst discharges and paroxysmal depolarizations in O/A-INs than in R/LM-INs in our experimental conditions. Moreover, mGluR1 $\alpha$  and mGluR5 contributed significantly to epileptiform responses in O/A-INs but not in R/LM-INs. Epileptiform burst discharges in O/A-INs were partly dependent on mGluR5, whereas paroxysmal depolarizations and underlying postsynaptic currents were dependent on both mGluR1 $\alpha$  and mGluR5. Furthermore, we found that these receptors were involved in different components of the postsynaptic currents underlying PDs in O/A-INs, with mGluR5 contributing to both slow and fast components and mGluR1 $\alpha$  to the slow component. These findings uncover a cell type-specific epileptiform activity with differential mGluR1 $\alpha$  and mGluR5 involvement in CA1 interneurons. This may be critical for the selective vulnerability of O/A-INs in animal models of temporal lobe epilepsy (Houser & Esclapez, 1996; Morin et al., 1998; Cossart et al., 2001).

#### Heterogeneous implications of mGluR1 $\alpha$ and mGluR5 in epileptiform activity in O/A-INs

Our findings suggest that both mGluR1 $\alpha$  and mGluR5 are synaptically activated during epileptiform activity in O/A-INs but have distinct contributions. Our observation of an activation of mGluR1 $\alpha$  during epileptiform synaptic activity in CA1 O/A-INs is consistent with previous findings in nonepileptiform conditions in these cells. A single pulse of electrical stimulation was found to elicit fast EPSCs mediated by ionotropic glutamate receptors at these synapses, but a short train of stimuli (10 pulses) at high frequency (HFS; 100 Hz) recruited in addition a slower EPSC mediated by mGluR1 $\alpha$  (Huang et al., 2004). Interestingly, the slow mGluR1 $\alpha$  EPSC was facilitated by postsynaptic depolarization. These specific conditions for activation of mGluR1 $\alpha$  postsynaptic responses underlie the hebbian properties of mGluR1 $\alpha$ -dependent long-term potentiation (LTP) at O/A-IN synapses. At these synapses, LTP is induced by theta burst stimulation (TBS) paired with postsynaptic depolarization, and its induction is blocked by the selective antagonist LY367385 (Perez et al., 2001) and in mGluR1 knock-out mice (Lapointe et al., 2004).

Our findings indicate that stronger stimulation conditions, such as during epileptiform activity, are necessary for

synaptic activation of mGluR5 in CA1 O/A-INs. Indeed, we recently observed that mGluR5-mediated postsynaptic slow  $Ca^{2+}$  responses (Topolnik et al., 2006) are elicited by more sustained (1 s) HFS of afferents (Topolnik et al., 2009). Moreover, such synaptic recruitment of mGluR5 during epileptiform activity has been described in other hippocampal cells such as in CA3 pyramidal cells (Lee et al., 2002) and CA3 interneurons (Mori & Gerber, 2002). Therefore, the synaptic activation of mGluR1 $\alpha$  and mGluR5 appears dependent on different stimulation conditions in O/A-INs, and this may contribute to the heterogeneous roles of these mGluR subtypes in epileptiform activity.

The observed differential roles of mGluR1 $\alpha$  and mGluR5 during epileptiform activity are consistent with their reported heterogeneous postsynaptic mechanisms. Apart from a different role in slow EPSCs (Huang et al., 2004), these receptor subtypes are also linked to distinct intracellular  $Ca^{2+}$  signaling mechanisms in O/A-INs. DHPG-induced activation of mGluR1 $\alpha$  is coupled to a Src/ERK-dependent  $Ca^{2+}$  entry through nonselective cation transient receptor potential (TRP) channels as well as  $Ca^{2+}$  release from intracellular stores, whereas DHPG-induced mGluR5 activation leads to  $Ca^{2+}$  release from intracellular stores (Topolnik et al., 2006). Distinct mGluR1 and mGluR5 postsynaptic mechanisms have also been reported in other hippocampal cell types. In CA1 pyramidal cells, mGluR1 $\alpha$  is involved in DHPG-induced rises in intracellular  $Ca^{2+}$  levels and direct depolarizations, whereas mGluR5 is implicated in DHPG-induced suppression of  $Ca^{2+}$ -activated potassium currents and potentiation of NMDA currents (Mannaioni et al., 2001). In cultured striatal neurons, DHPG-induced selective mGluR5, and not mGluR1 $\alpha$ -, dependent activation of ERK1/2 has been described via a Homer1b/c  $Ca^{2+}$ -independent signaling pathway (Mao et al., 2005), indicating that mGluR1/5 ERK-mediated signaling mechanisms also differ across cell types. Distinct contributions of mGluR1 $\alpha$  and mGluR5 in a given cell type may also involve differential coupling to G proteins, since in recombinant Chinese hamster ovary cell-lines expressing these receptors, mGluR1 and mGluR5 utilize different G proteins to cause ERK activation (Abe et al., 1992; Thandi et al., 2002).

The findings of distinct mGluR1 $\alpha$  and mGluR5 mechanisms in O/A-INs are in contrast to the reported similar overlapping effects of these mechanisms in other cells. Notably in CA3 pyramidal cells, both mGluR1 $\alpha$  and mGluR5 have overlapping roles and contribute to synaptically evoked depolarizing epileptiform discharges via a PLC $\beta$ 1-independent signaling pathway (Lee et al., 2002). Furthermore, mGluR1 $\alpha$  and mGluR5 contribute to normal synaptic responses in CA3 interneurons of organotypic slices. Antagonism of both mGluR1 $\alpha$  and mGluR5 was required to block the direct slow EPSCs in interneurons and the disynaptic slow IPSCs in CA3 pyramidal cells (Mori & Gerber, 2002). These last findings are partially in accord with our findings that both mGluR1 $\alpha$  and mGluR5 contrib-

ute to synaptically evoked epileptiform responses in interneurons. However, they are in contrast with the differential mGluR1 $\alpha$  and mGluR5 contributions found in our study: mGluR5 contributing to both fast and slow components and mGluR1 $\alpha$  contributing to the slow component of the synaptic currents underlying PDs. This differential mGluR1 $\alpha$  and mGluR5 involvement in PSCs in O/A-INs suggests the presence of different mechanisms linked to mGluR1 $\alpha$  and mGluR5 in interneurons in CA1 and CA3 regions.

In our current clamp experiments and using LY367385, we did not find evidence of mGluR1 $\alpha$  activation when monitoring epileptiform burst discharges in O/A-INs. This is in contrast to the mGluR1 $\alpha$  contributions that we found when monitoring epileptiform paroxysmal depolarizations in current clamp or their underlying PSCs in voltage-clamp experiments. These findings suggest that synaptic burst discharges in current clamp are not a good indicator of mGluR1 $\alpha$  activation in O/A-INs and that this receptor does not contribute to the bursting response per se. This point could be tested in current-clamp experiments by comparing responses of O/A-INs to injection of waveforms previously recorded during epileptiform responses in other O/A-INs in the absence and presence of an mGluR1 antagonist. The apparent inconsistency of mGluR1 not contributing to epileptiform burst discharges but contributing to PDs and postsynaptic currents may be due to the differential actions of mGluR1 $\alpha$  and mGluR5 in the underlying PDs and postsynaptic currents. Indeed, our data clearly indicate that mGluR5, but not mGluR1 $\alpha$ , contributes to the fast component of the postsynaptic currents. Moreover, although both receptors contribute to PDs and the slow component of postsynaptic currents, there was a tendency for the mGluR5 antagonist to produce larger inhibition than the mGluR1 $\alpha$  antagonist. These results indicate that mGluR5 has different and more marked effects during epileptiform responses than mGluR1 $\alpha$ , which are consistent with the significant effect on burst discharges. Interestingly, however, mGluR1 $\alpha$  was found to contribute to burst discharges in CA3 pyramidal cells (Lee et al., 2002), perhaps due to activation of cell type-specific mGluR1/5 mechanisms in CA3 pyramidal cells relative to CA1 O/A-INs. Taken together, our findings indicate the presence of activity-dependent synaptic activation of heterogeneous mGluR1 $\alpha$  and mGluR5 mechanisms in hippocampal interneurons.

#### Cell type-specific mGluR1/5 activation during epileptiform activity in O/A-INs versus R/LM-INs

Our results clearly indicate that mGluR1/5 activation during epileptiform activity is specific to certain interneuron subtypes in O/A and not in R/LM. The cell type difference in mGluR1/5 activation is in accord with the mGluR1 $\alpha$  expression pattern and responses reported in interneurons under normal conditions. Previous studies have shown that mGluR1 $\alpha$  mRNA (Shigemoto et al.,

1992) and protein (Ferraguti et al., 2004) levels are highly expressed in O/A-INs compared to R/LM-INs. Furthermore, activation of mGluR1/5 has been reported to activate nonselective cationic inward currents dependent on intracellular  $Ca^{2+}$  rise ( $I_{CAN}$ ) specifically in O/A-INs (Woodhall et al., 1999; McBain et al., 1994; van Hoof et al., 2000) and not in R/LM-INs (Woodhall et al., 1999). These findings are consistent with our observed effects of mGluR1 $\alpha$  antagonists on epileptiform responses, specifically in O/A-INs and not R/LM-INs. In contrast, mGluR5 expression has been shown to be more widely distributed throughout the hippocampus (Shigemoto et al., 1997), but our findings suggest no implication of mGluR5 in epileptiform responses in R/LM-INs. This suggests that mGluR5, although present in these interneurons, may not be activated even during epileptiform activity. A possible explanation may be related to the extrasynaptic location of mGluR5 (Lujan et al., 1996). The glutamate level at synapses is finely tuned to prevent the extrasynaptic spill-over of glutamate. Therefore, synaptically released glutamate at R/LM synapses may not activate mGluR5, which is preferentially located at extrasynaptic sites. Indeed astrocytic clearance of transmitter by glutamate transporters was shown to be critical in regulating mGluR1 $\alpha$  synaptic activation in CA1 O/A-INs (Huang et al., 2004). To our knowledge the potential role of glutamate transporters in regulating mGluR activation has not been examined at R/LM-IN synapses, but different mechanisms may be present that could explain the limited activation of extrasynaptic mGluR5 in these cells.

Another possible factor in the cell type-specific mGluR1/5 activation may be the local synaptic circuits involved. In our paradigm, local stimulation in stratum oriens is expected to activate CA3 Schaffer collaterals/commissural fibers, CA1 local collaterals, as well as CA1 pyramidal cells directly, whereas stimulation near the stratum radiatum and lacunosum-moleculare border is expected to activate CA3 Schaffer collaterals/commissural fibers, temporo-ammonic fibers, and CA1 pyramidal cells directly. CA1 O/A-INs receive primarily feedback excitatory inputs from recurrent fibers of CA1 pyramidal cells, and feed-forward excitatory inputs through Schaffer collaterals/commissural fibers (Schwartzkroin & Mathers, 1978; Knowles & Schwartzkroin, 1981; Buzsaki & Eidelberg, 1982; Lacaille et al., 1987; Freund & Buzsaki, 1996). CA1 R/LM-INs receive mostly feed-forward excitatory inputs from Schaffer collaterals/commissural fibers and temporo-ammonic projections (Lacaille & Schwartzkroin, 1988; Maccaferri & McBain, 1995; Ang et al., 2005). Therefore, local CA1 stimulation in disinhibited slices is likely to result in preferential activation of feed-back excitatory pathways to CA1 interneurons during epileptiform activity (Freund & Buzsaki, 1996). Hence interneuron subtype specific activation of mGluR1/5 during epileptiform activity may be due to afferent-specific activation

of these receptors in feed-back excitatory pathways to CA1 interneurons. Interestingly in CA3 interneurons, such interneuron subtype-specific activation of mGluR1 $\alpha$  and mGluR5 during EPSCs is not present, since interneuron cell types in both stratum oriens and radiatum receive local feed-back excitatory inputs from CA3 pyramidal cells (Mori & Gerber, 2002).

### Functional implications

Is the cell type specific activation of mGluR1/5 in epileptiform activity related to the cell type selective vulnerability of interneurons in TLE? Some evidence supports this suggestion. First, administration of the selective group I mGluR antagonist 1-aminoadipic acid (AIDA) was found to have a protective effect on hippocampal function and specific O/A interneuron loss in the KA model of TLE (Renaud et al., 2002), suggesting that mGluR1/5 activation during seizures contributes to selective interneuron cell death. Second, the present findings uncover, in our experimental conditions, cell type-specific prominent epileptiform discharges involving activation of mGluR1/5 specifically in O/A-INs, which have been shown to be selectively vulnerable in the KA model of TLE and not in R/LM-INs, which are KA resistant (Morin et al., 1998; Houser & Esclapez, 1996; Renaud et al., 2002). Given the important role of intracellular  $Ca^{2+}$  elevations in neuronal excitotoxicity (Choi, 1994), these results suggest that during hippocampal seizures, cell type-specific activation of mGluR1 $\alpha$  and mGluR5 will trigger intracellular  $Ca^{2+}$  rises via TRP channels and release from ryanodine-sensitive intracellular stores (Topolnik et al., 2006), specifically in O/A-INs, and this may lead ultimately to excitotoxic cell death selectively in these interneurons. Such an mGluR1/5 role in the selective vulnerability of hippocampal interneurons would be consistent also with the finding that long-term aberrations in hippocampal CA1 synaptic plasticity in the pentylentetrazole model of TLE, are prevented by simultaneous *in vivo* pretreatment with mGluR1 $\alpha$  and mGluR5 antagonists (Nagaraja et al., 2005).

### ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by the Canadian Institutes of Health Research (MT-10848; J.-C.L.), Fonds de la recherche en santé du Québec (Groupe de recherche sur le système nerveux central; J.-C.L. and L.C.), and the Canada Research Chair Program (J.-C.L.; Canada Research Chair in Cellular and Molecular Neurophysiology). NTS was supported by a studentship and JGP by a fellowship of the Fonds de la recherche en santé du Québec.

### DISCLOSURES

We confirm that we have read the Journal's position on issues involved in ethical publication and affirm that this report is consistent with those guidelines. None of the authors has any conflict of interest to disclose.

## REFERENCES

- Abe T, Sugihara H, Nawa H, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S. (1992) Molecular characterization of a novel metabotropic glutamate receptor mGluR5 coupled to inositol phosphate/Ca<sup>2+</sup> signal transduction. *J Biol Chem* 267:13361–13368.
- Ang CW, Carlson GC, Coulter DA. (2005) Hippocampal CA1 circuitry dynamically gates direct cortical inputs preferentially at theta frequencies. *J Neurosci* 25:9567–9580.
- Attwell PJ, Koumentaki A, Abdul-Ghani AS, Croucher MJ, Bradford HF. (1998) Specific group II metabotropic glutamate receptor activation inhibits the development of kindled epilepsy in rats. *Brain Res* 787:286–291.
- Babb TL, Brown WJ, Pretorius J, Davenport C, Lieb JP, Crandall PH. (1984) Temporal lobe volumetric cell densities in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 25:729–740.
- Baskys A, Bayazitov I, Fang L, Blaabjerg M, Poulsen FR, Zimmer J. (2005) Group I metabotropic glutamate receptors reduce excitotoxic injury and may facilitate neurogenesis. *Neuropharmacology* 49(suppl 1):146–156.
- Ben Ari Y. (1985) Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 14:375–403.
- Best N, Mitchell J, Baimbridge KG, Wheal HV. (1993) Changes in parvalbumin-immunoreactive neurons in the rat hippocampus following a kainic acid lesion. *Neurosci Lett* 155:1–6.
- Brückner C, Stenamp K, Meierkord H, Heinemann U. (1999) Epileptiform discharges induced by combined application of bicuculline and 4-aminopyridine are resistant to standard anticonvulsants in slices of rats. *Neurosci Lett* 268:163–165.
- Buzsáki G, Eidelberg E. (1982) Direct afferent excitation and long-term potentiation of hippocampal interneurons. *J Neurophysiol* 48:597–607.
- Camon L, Vives P, de Vera N, Martinez E. (1998) Seizures and neuronal damage induced in the rat by activation of group I metabotropic glutamate receptors with their selective agonist 3,5-dihydroxyphenylglycine. *J Neurosci Res* 51:339–348.
- Chapman AG, Nanan K, Williams M, Meldrum BS. (2000) Anticonvulsant activity of two metabotropic glutamate group I antagonists selective for the mGlu5 receptor: 2-methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine (MPEP), and (E)-6-methyl-2-styryl-pyridine (SIB 1893). *Neuropharmacology* 39:1567–1574.
- Choi DW. (1994) Calcium and excitotoxic neuronal injury. *Ann NY Acad Sci* 747:162–171.
- Clark BP, Baker SR, Goldsworthy J, Harris JR, Kingston AE. (1997) (+)-2-Methyl-4-carboxyphenylglycine (LY 367385) selectively antagonizes metabotropic glutamate mGluR1 receptors. *Bioorg Med Chem Lett* 7:2777–2780.
- Cossart R, Esclapez M, Hirsch JC, Bernard C, Ben Ari Y. (1998) GluR5 kainate receptor activation in interneurons increases tonic inhibition of pyramidal cells. *Nat Neurosci* 1:470–478.
- Cossart R, Dinocourt C, Hirsch JC, Merchán-Pérez A, De Felipe J, Ben Ari Y, Esclapez M, Bernard C. (2001) Dendritic but not somatic GABAergic inhibition is decreased in experimental epilepsy. *Nat Neurosci* 4:52–62.
- Dam AM. (1980) Epilepsy and neuron loss in the hippocampus. *Epilepsia* 21:617–629.
- Debarbieux F, Brunton J, Charpak S. (1998) Effect of bicuculline on thalamic activity: a direct blockade of IAHP in reticularis neurons. *J Neurophysiol* 79:2911–2918.
- Dinocourt C, Petanjek Z, Freund TF, Ben Ari Y, Esclapez M. (2003) Loss of interneurons innervating pyramidal cell dendrites and axon initial segments in the CA1 region of the hippocampus following pilocarpine-induced seizures. *J Comp Neurol* 459:407–425.
- Esclapez M, Houser CR. (1995) Somatostatin neurons are a subpopulation of GABA neurons in the rat dentate gyrus: evidence from colocalization of pre-prosomatostatin and glutamate decarboxylase messenger RNAs. *Neuroscience* 64:339–355.
- Ferraguti F, Conquet F, Corti C, Grandes P, Kuhn R, Knöpfel T. (1998) Immunohistochemical localization of the mGluR1beta metabotropic glutamate receptor in the adult rodent forebrain: evidence for a differential distribution of mGluR1 splice variants. *J Comp Neurol* 400:391–407.
- Ferraguti F, Cobden P, Pollard M, Cope D, Shigemoto R, Watanabe M, Somogyi P. (2004) Immunolocalization of metabotropic glutamate receptor 1alpha (mGluR1alpha) in distinct classes of interneuron in the CA1 region of the rat hippocampus. *Hippocampus* 14:193–215.
- Franck JE, Schwartzkroin PA. (1985) Do kainate-lesioned hippocampi become epileptogenic? *Brain Res* 329:309–313.
- Franck JE, Kunkel DD, Baskin DG, Schwartzkroin PA. (1988) Inhibition in kainate-lesioned hyperexcitable hippocampi: physiologic, autoradiographic, and immunocytochemical observations. *J Neurosci* 8:1991–2002.
- Freund TF, Buzsáki G. (1996) Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6:347–470.
- Houser CR, Esclapez M. (1996) Vulnerability and plasticity of the GABA system in the pilocarpine model of spontaneous recurrent seizures. *Epilepsia* 37:207–218.
- Huang YH, Sinha SR, Tanaka K, Rothstein JD, Bergles DE. (2004) Astrocyte glutamate transporters regulate metabotropic glutamate receptor-mediated excitation of hippocampal interneurons. *J Neurosci* 24:4551–4559.
- Knowles WD, Schwartzkroin PA. (1981) Local circuit synaptic interactions in hippocampal brain slices. *J Neurosci* 1:318–322.
- Lacaille JC, Mueller AL, Kunkel DD, Schwartzkroin PA. (1987) Local circuit interactions between oriens/alveus interneurons and CA1 pyramidal cells in hippocampal slices: electrophysiology and morphology. *J Neurosci* 7:1979–1993.
- Lacaille JC, Schwartzkroin PA. (1988) Stratum lacunosum-moleculare interneurons of hippocampal CA1 region. II. Intracellular and intradendritic recordings of local circuit synaptic interactions. *J Neurosci* 8:1411–1424.
- Lapointe V, Morin F, Ratte S, Croce A, Conquet F, Lacaille JC. (2004) Synapse-specific mGluR1-dependent long-term potentiation in interneurons regulates mouse hippocampal inhibition. *J Physiol* 555:125–135.
- Lee AC, Wong RK, Chuang SC, Shin HS, Bianchi R. (2002) Role of synaptic metabotropic glutamate receptors in epileptiform discharges in hippocampal slices. *J Neurophysiol* 88:1625–1633.
- Lujan R, Nusser Z, Roberts JD, Shigemoto R, Somogyi P. (1996) Perisynaptic location of metabotropic glutamate receptors mGluR1 and mGluR5 on dendrites and dendritic spines in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 8:1488–1500.
- Maccaferri G, McBain CJ. (1995) Passive propagation of LTD to stratum oriens-alveus inhibitory neurons modulates the temporospatial input to the hippocampal CA1 region. *Neuron* 15:137–145.
- Mannaioni G, Marino MJ, Valenti O, Traynelis SF, Conn PJ. (2001) Metabotropic glutamate receptors 1 and 5 differentially regulate CA1 pyramidal cell function. *J Neurosci* 21:5925–5934.
- Mao L, Yang L, Tang Q, Samdani S, Zhang G, Wang JQ. (2005) The scaffold protein Homer1b/c links metabotropic glutamate receptor 5 to extracellular signal-regulated protein kinase cascades in neurons. *J Neurosci* 25:2741–2752.
- McBain CJ, DiChiara TJ, Kauer JA. (1994) Activation of metabotropic glutamate receptors differentially affects two classes of hippocampal interneurons and potentiates excitatory synaptic transmission. *J Neurosci* 14:4433–4445.
- Meldrum BS. (1993) Excitotoxicity and selective neuronal loss in epilepsy. *Brain Pathol* 3:405–412.
- Merlin LR, Wong RK. (1997) Role of group I metabotropic glutamate receptors in the patterning of epileptiform activities in vitro. *J Neurophysiol* 78:539–544.
- Mori M, Gerber U. (2002) Slow feedback inhibition in the CA3 area of the rat hippocampus by synergistic synaptic activation of mGluR1 and mGluR5. *J Physiol* 544:793–799.
- Morin F, Beaulieu C, Lacaille JC. (1998) Selective loss of GABA neurons in area CA1 of the rat hippocampus after intraventricular kainate. *Epilepsia* 39:363–369.
- Nacler JV. (1981) Minireview. Kainic acid as a tool for the study of temporal lobe epilepsy. *Life Sci* 29:2031–2042.
- Nagaraja RY, Becker A, Reymann KG, Balschun D. (2005) Repeated administration of group I mGluR antagonists prevents seizure-induced long-term aberrations in hippocampal synaptic plasticity. *Neuropharmacology* 49(suppl 1):179–187.
- Ngomba RT, Biagioni F, Casciato S, Willems-van Bree E, Battaglia G, Bruno V, Nicoletti F, Van Luijckelaar EL. (2005) The preferential mGluR2/3 receptor antagonist, LY341495, reduces the frequency of

- spike-wave discharges in the WAG/Rij rat model of absence epilepsy. *Neuropharmacology* 49(suppl 1):89–103.
- Perez Y, Morin F, Beaulieu C, Lacaille JC. (1996) Axonal sprouting of CA1 pyramidal cells in hyperexcitable hippocampal slices of kainate-treated rats. *Eur J Neurosci* 8:736–748.
- Perez Y, Morin F, Lacaille JC. (2001) A hebbian form of long-term potentiation dependent on mGluR1a in hippocampal inhibitory interneurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9401–9406.
- Renaud J, Emond M, Meilleur S, Psarropoulou C, Carmant L. (2002) AIDA, a class I metabotropic glutamate-receptor antagonist limits kainate-induced hippocampal dysfunction. *Epilepsia* 43:1306–1317.
- Sall TE, Binns KE, Turner JP, Gasparini F, Kulin R. (1999) Antagonism of the mGlu5 agonist 2-chloro-5-hydroxyphenylglycine by the novel selective mGlu5 antagonist 6-methyl-2-(phenylethynyl)-pyridine (MPEP) in the thalamus. *Br J Pharmacol* 127:1057–1059.
- Sanan N, Carmant L, Emond M, Congar P, Lacaille JC. (2005) Short-term effects of kainic acid on CA1 hippocampal interneurons differentially vulnerable to excitotoxicity. *Epilepsia* 46:837–848.
- Schwartzkroin PA, Mathers LH. (1978) Physiological and morphological identification of a nonpyramidal hippocampal cell type. *Brain Res* 157:1–10.
- Shigemoto R, Nakanishi S, Mizuno N. (1992) Distribution of the mRNA for a metabotropic glutamate receptor (mGluR1) in the central nervous system: an in situ hybridization study in adult and developing rat. *J Comp Neurol* 322:121–135.
- Shigemoto R, Kinoshita A, Wada E, Nomura S, Ohishi H, Takada M, Flor PJ, Neki A, Abe T, Nakanishi S, Mizuno N. (1997) Differential presynaptic localization of metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat hippocampus. *J Neurosci* 17:7503–7522.
- Sinclair JD. (1988) Multiple t-tests are appropriate in science. *Trends Pharmacol Sci* 9:12–13.
- Somogyi P, Klausberger T. (2005) Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. *J Physiol* 562:9–26.
- Thandi S, Blank JL, Challiss RA. (2002) Group I metabotropic glutamate receptors, mGlu1a and mGlu5a, couple to extracellular signal-regulated kinase (ERK) activation via distinct, but overlapping, signalling pathways. *J Neurochem* 83:1139–1153.
- Topolnik L, Azzi M, Morin F, Kougioumoutzakis A, Lacaille JC. (2006) mGluR1/5 subtype-specific calcium signalling and induction of long-term potentiation in rat hippocampal oriens/alveus interneurons. *J Physiol* 575:115–131.
- Topolnik L, Chamberland S, Pelletier J, Ran I, Lacaille JC. (2009) Activity-dependent compartmentalized regulation dendritic Ca<sup>2+</sup> signalling in hippocampal interneurons. *J Neurosci* 29:4658–4663.
- van Hoof JA, Giuffrida R, Blatow M, Monyer H. (2000) Differential expression of group I metabotropic glutamate receptors in functionally distinct hippocampal interneurons. *J Neurosci* 20:3544–3551.
- Williams S, Vachon P, Lacaille JC. (1993) Monosynaptic GABA-mediated inhibitory postsynaptic potentials in CA1 pyramidal cells of hyperexcitable hippocampal slices from kainic acid-treated rats. *Neuroscience* 52:541–554.
- Woodhall G, Gee CE, Robitaille R, Lacaille JC. (1999) Membrane potential and intracellular Ca<sup>2+</sup> oscillations activated by mGluRs in hippocampal stratum oriens/alveus interneurons. *J Neurophysiol* 81:371–382.

## SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

**Figure 1.** Difference in epileptiform burst discharge is independent of stimulation site.

**Figure 2.** No contribution of mGluR1 $\alpha$  to epileptiform burst discharges in either interneuron type.

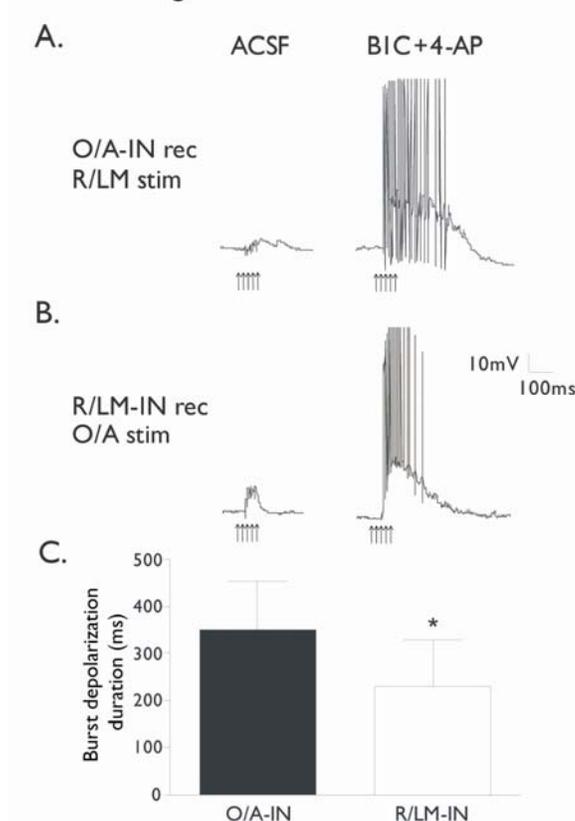
**Figure 3.** No contribution of mGluR1 $\alpha$  and mGluR5 to PDs in R/LM-INs.

**Figure 4.** No contribution of mGluR1 $\alpha$  and mGluR5 to PSCs in R/LM-INs.

Please note: Wiley-Blackwell is not responsible for the content or functionality of any supporting information supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

## Additional Information

Additional Figure 1

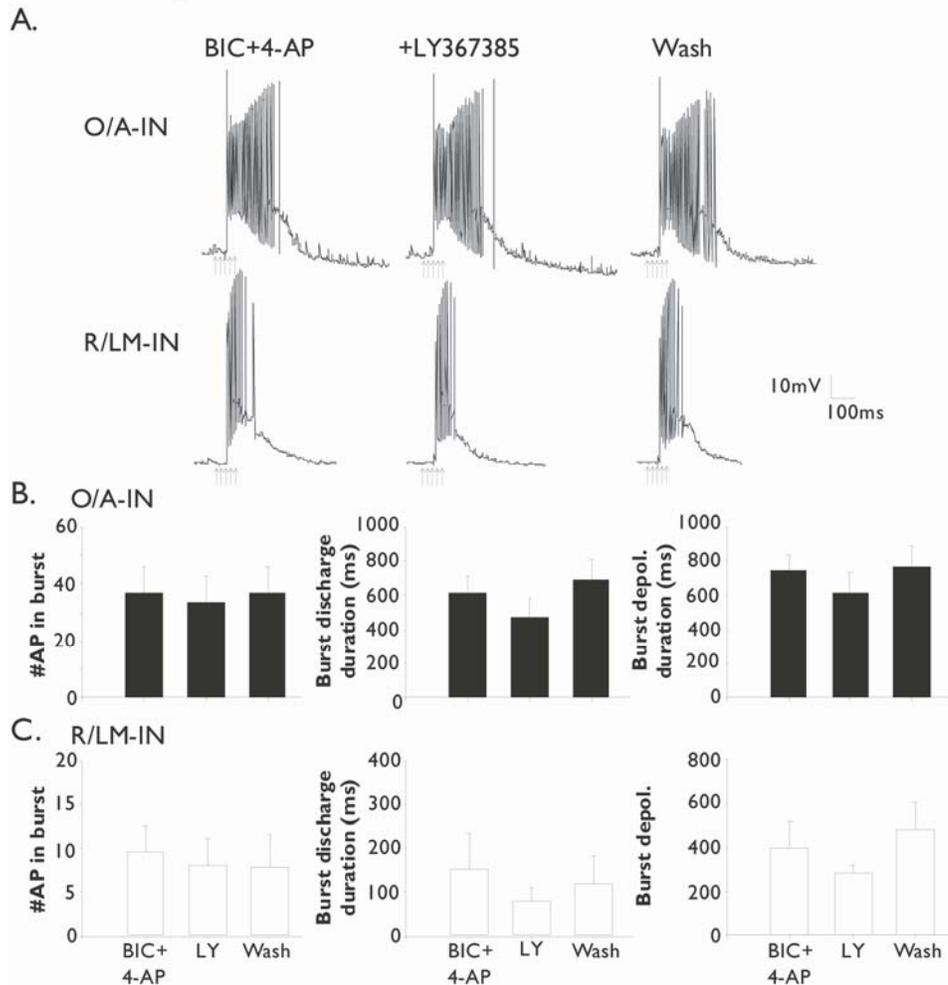


### Additional Information - Figure 1: Difference in epileptiform burst discharge is independent of stimulation site.

A: Current-clamp recordings ( $V_m = -65\text{mV}$ ) from an O/A-IN showing an epileptiform burst discharge evoked by train stimulation of 0.5mA at the border of *stratum radiatum* and *lacunosum-moleculare* (arrows) in BIC+4-AP (right) and the response in control ACSF (left). B: Current-clamp recordings from an R/LM-IN illustrating a burst discharge evoked by stimulation in *stratum oriens* in BIC+4-AP (right) and the response in ACSF (left). C: Bar graph for all cells tested (n=5 O/A-INs, n=5 R/LM-INs) showing

significantly shorter burst depolarization duration in R/LM than in O/A cells (mean  $\pm$  standard deviation; one-tailed t-test).

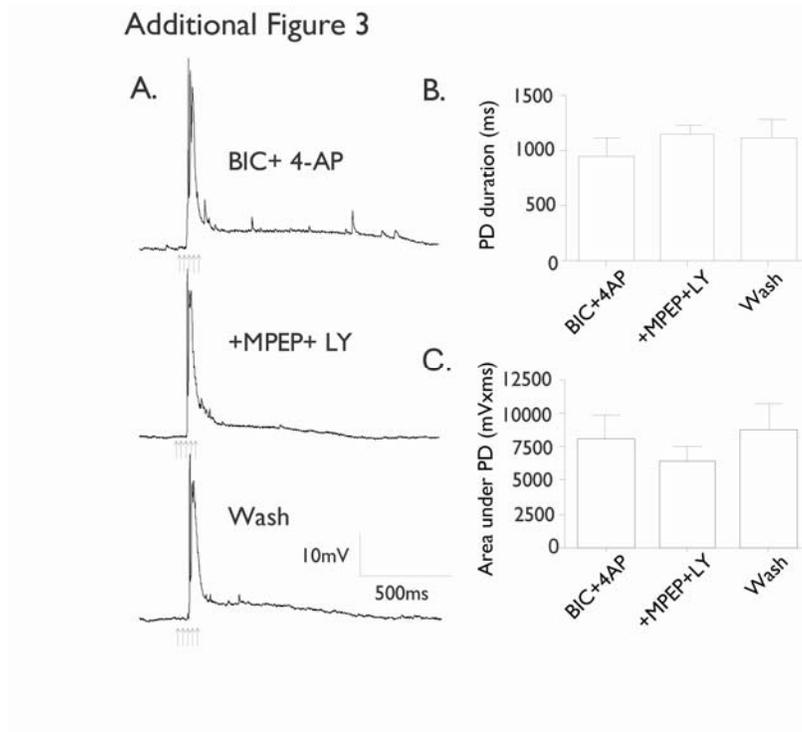
## Additional Figure 2



**Additional Information - Figure 2: No contribution of mGluR1 $\alpha$  to epileptiform burst discharges in either interneuron type.**

A: Current-clamp recordings ( $V_m = -65\text{mV}$ ) showing burst discharges recorded in representative O/A-IN (top) and R/LM-IN (bottom) in response to train stimulation of 0.5mA (arrows) in BIC+4-AP (left), after addition of the mGluR1 $\alpha$  antagonist LY367385 100 $\mu\text{M}$  (middle) and after 30 minutes of antagonist washout (right). B,C: Summary bar graphs showing no significant effect of LY367385 on the number of APs in bursts (left),

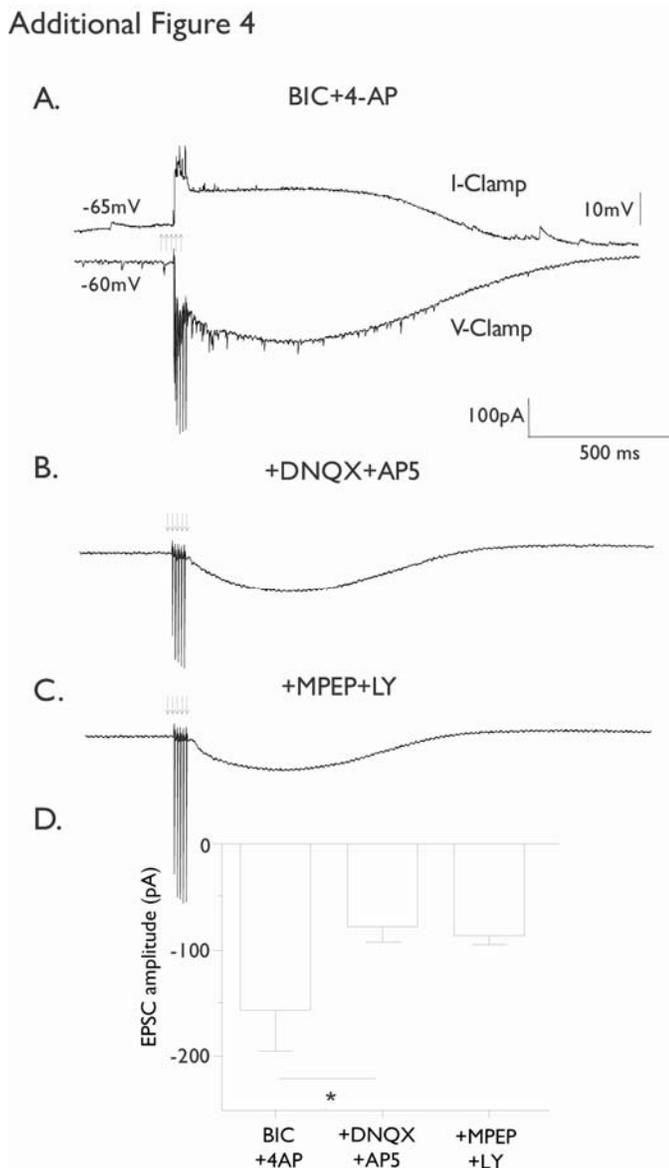
the burst discharge duration (middle) or the burst depolarization duration (right) in O/A-INs (n=7; B) and R/LM-INs (n=7; C).



### Additional Information - Figure 3: No contribution of mGluR1 $\alpha$ and 5 to PDs in R/LM-INs.

A: Current-clamp recordings ( $V_m = -65\text{mV}$ ) with intracellular solution containing QX-314, showing PDs evoked by train stimulation of 0.2mA (arrows) in a representative R/LM-IN. PDs recorded in BIC+4-AP (top) were unaffected by joint application of MPEP and LY367385 (middle). B,C: Bar graphs for all R/LM-INs tested (n=8) showing no significant effect of application of both antagonists on PD duration (B) and area under PD (C). Note different scaling for PD duration and area under PD (compared to Fig 3), indicating that PDs in R/LM-INs were smaller than in O/A-INs.

Additional Figure 4



### Additional Information - Figure 4: No contribution of mGluR1 $\alpha$ and 5 to PSCs in R/LM-INs.

A: Recordings from a representative R/LM-IN of PD in current-clamp (top; V<sub>m</sub> = -65mV) and underlying PSCs in voltage-clamp (bottom; V<sub>hold</sub> = -60 mV) evoked by train

stimulation of 0.4mA (arrows) in BIC+4-AP. B: Blocking non-NMDAR and NMDAR with DNQX and AP5 revealed a monophasic PSC. C: Additional application of MPEP and LY367385 had no effect on PSCs. D: Bar graph for all R/LM-INs tested showing significant PSC reduction by non-NMDA and NMDA receptor antagonists (DNQX+AP5; n=5), but no further reduction by addition of mGluR1/5 antagonists (MPEP+LY; n=5), indicating no mGluR1 $\alpha$  and 5 contributions to PSCs underlying PDs in R/LM-INs.

## **Chapitre IV**

### **Discussion générale**

Les travaux de cette thèse ont permis d'identifier, selon leurs propriétés neurochimiques, les interneurons vulnérables dans le modèle KA. De plus, les résultats suggèrent que la vulnérabilité sélective des interneurons O/A dans le modèle KA n'est probablement pas causée par un effet direct et à court-terme du KA. Finalement les travaux ont permis de mettre en évidence *in vitro* une activité épileptiforme dépendante des mGluR1/5 spécifiquement dans les interneurons O/A, ainsi qu'une implication différentielle des mGluR1 et mGluR5 dans cette activité épileptiforme. Globalement, les résultats suggèrent que la vulnérabilité sélective des interneurons serait due à l'effet spécifique qu'exerce l'activation des mGluR1/5 sur les interneurons O/A pendant l'activité épileptiforme induite par le KA.

#### **4.1 Perte sélective d'interneurones dans le modèle KA**

Dans le but d'examiner la perte cellulaire associée au modèle KA nous avons procédé à l'identification neurochimique des cellules GAD-, PV- et SS-positives par marquage immunohistochimique. La quantification des cellules chez les rats KA et naïfs a révélé une perte de neurones GAD-, PV- et SS-positifs de la région CA1 suite au KA, avec une perte plus importante des neurones PV- et SS-positifs (Sanon N et al. 2005). La GAD étant présente dans tous les interneurons inhibiteurs contenant le GABA, il n'est pas inattendu qu'une moindre proportion de cellules GAD soit affecté par rapport aux cellules PV- et SS-positives étant donné que les neurones GAD-positifs englobent tous les types

d'interneurones (Freund TF et Buzsaki G 1996). La perte de neurones que nous avons observée est en accord avec celle observée dans un autre modèle expérimental du TLE utilisant la pilocarpine, et produisant sensiblement le même *status epilepticus* chez l'animal *in vivo*. Les interneurones vulnérables dans le modèle pilocarpine sont 1) les interneurones PV-positifs, correspondant principalement aux cellules à panier, faisant des connexions péri-somatiques, et axo-axoniques; ainsi que 2) les interneurones SS-positifs (O-LM) faisant des connexions sur les dendrites distales des cellules pyramidales. Ce phénomène de perte d'interneurones est rapide, étant présent 72 heures post-injection (Dinocourt C et al. 2003).

Il est important de noter que la diminution de marquage PV+, SS+ ou GAD+ observée dans le modèle KA ne représente pas nécessairement une perte cellulaire puisqu'il a déjà été montré dans les cellules à panier du DG que la diminution du marquage de la PV peut être due à une diminution de l'expression de cette protéine et non pas à une diminution du nombre de cellules (Sloviter RS et al. 2003). Par contre, il a aussi été montré en combinant l'hybridation *in situ* à un marquage de Nissl que la diminution du marquage de l'ARNm de la GAD dans le DG suite au *status* était bien due à une perte d'interneurones inhibiteurs (Obenaus A et al. 1993). Ainsi, la perte de neurones GAD+ dans la région O/A, et la perte sélective de cellules du O/A, mais non des cellules du R/LM, tel que montré avec des marquages de Nissl dans le modèle KA (Morin F et al. 1998b), nous permet de conclure que la diminution significative des marquages GAD+, PV+ et SS+ dans la région

O/A dans le modèle KA représente une véritable perte d'interneurones et non une diminution de l'expression de ces molécules.

Étant donné que les interneurones diffèrent en termes de leur composition neurochimique, on peut questionner l'importance de ces molécules spécifiquement exprimées dans certains types d'interneurones dans la vulnérabilité sélective. L'enzyme de synthèse du GABA, la GAD, est spécifique aux interneurones inhibiteurs, mais est exprimée dans tous les interneurones. Donc, la GAD n'est probablement pas impliquée dans la vulnérabilité sélective. Le neuropeptide SS est exprimé dans les interneurones sélectivement vulnérables au KA, notamment dans les interneurones démontrant de la dendrotoxicité (Oliva AA, Jr. et al. 2002). Cependant, il a été suggéré que la SS a un effet inhibiteur dans le réseau neuronal du CA1 (Binaschi A et al. 2003) et donc, les interneurones SS+ aideraient plutôt à contrôler l'activité épileptiforme. Par ailleurs, une étude sur des souris déficientes en parvalbumine, calretinine et calbindine a révélé que ces chélateurs calciques ne modulaient pas le niveau général d'excitabilité de l'hippocampe dans le modèle KA (Bouilleret V et al. 2000). Ce résultat est surprenant puisque l'on aurait pu s'attendre à ce que la présence des protéines liant le calcium favorise le tamponnage du calcium durant l'activité épileptiforme, ce qui devrait diminuer l'excitotoxicité. Il semble donc qu'il n'y a pas de lien causatif entre l'expression de SS ou PV et la vulnérabilité sélective.

Le cerveau immature est plus propice suite à une insulte telle l'hypoxie (Jensen FE et al. 1991) ou une injection de KA (Albala BJ et al. 1984; Nitecka L et al. 1984; Stafstrom CE et al. 1993) au développement des convulsions. Il est cependant moins vulnérable à la perte neuronale qui est observée dans le cerveau mature suite à ces convulsions (Liu Z et al. 1996; Holmes GL et Ben-Ari Y 2001). En effet, suite au *status epilepticus*, l'hippocampe subit beaucoup plus de dommages chez l'animal âgé que chez l'animal immature ou jeune (Stafstrom CE et al. 1993). Ceci se traduit par des pertes de fonctions cognitives dépendantes de l'hippocampe, telle la mémoire spatiale (Renaud J et al. 2002; Sayin U et al. 2004). Par contre, nos données suggèrent à l'inverse une perte de neurones PV+ et SS+ plus importante à P20 qu'à P30. De plus, cette perte de neurones à P20 survient à un âge auquel il n'y a pas de perte des cellules pyramidales du CA3 (Holmes GL et Ben-Ari Y 2001), indiquant une vulnérabilité plus précoce des interneurones O/A PV+ et SS+ que celle des cellules pyramidales du CA3.

## **4.2 Activité induite par le KA: effets électrophysiologiques**

Afin d'aborder les mécanismes à la base de la vulnérabilité sélective des interneurones O/A dans le modèle KA, nous avons examiné dans un premier temps les différences entre les réponses électrophysiologiques induites directement par l'application de KA chez les O/A-IN et R/LM-IN. Contrairement aux études post-injection de KA *in*

*vivo* causant un *status epilepticus* initial et engendrant des crises récurrentes chez le rat, notre première étude portait plutôt sur les effets aigus du KA sur les interneurons dans des tranches d'hippocampe *in vitro* issues de rats naïfs.

Des résultats d'études précédentes utilisant les tranches d'hippocampe en culture ont montré que l'application aiguë de KA (5 $\mu$ M) produisait la mort d'interneurones PV+ du CA3 et du CA1 (Best N et al. 1996), ainsi que la dendrotoxicité dans les interneurons du CA1 (Al-Noori S et Swann JW 2000) et dans les interneurons SS+ du CA1 et du CA3 (Oliva AA, Jr. et al. 2002), suggérant que le KA peut avoir un effet rapide sélectivement sur les O/A-INS. De plus, d'autres ont montré que de brèves applications de KA en tranche sont suffisantes pour générer une activité de type inter-ictale causant une potentialisation à long terme des réponses synaptiques (Ben Ari Y 1985; Ben-Ari Y et Represa A 1990), ce qui suggère un effet rapide et durable du KA sur la plasticité synaptique, sans l'implication de crises chroniques et récurrentes obtenues *in vivo*. Par contre nos données *in vitro* montrent que les effets aigus du KA sont similaires chez les interneurons O/A, vulnérables, et les interneurons R/LM, résistants dans le modèle KA, suggérant que les effets aigus du KA ne sont pas directement responsables de la vulnérabilité sélective des OA-INS.

Des effets de modulation de la transmission synaptique dus à la présence des KAR sur les terminaisons pré-synaptiques ont été rapportés aux synapses excitatrices des cellules pyramidales (Rodriguez-Moreno A et al. 1997; Rodriguez-Moreno A et al. 2000; Frerking

M et al. 1999; Mulle C et al. 2000; Schmitz D et al. 2001), ainsi qu'aux synapses inhibitrices des cellules pyramidales (Rodriguez-Moreno A 2003) et des interneurons (Cossart R et al. 2001). Par contre nos résultats montrent des effets similaires du KA avec et sans TTX, indiquant peu de contribution des actions pré-synaptiques dans nos conditions.

À des concentrations micromolaires, tel qu'utilisé majoritairement dans notre étude, le KA ne se lie pas uniquement aux KAR mais aussi aux AMPAR (Castillo PE et al. 1997). L'ajout de l'antagoniste AMPA/KA lors de l'application de KA nous a permis de montrer une implication des récepteurs AMPA/KA. Cette composante était principalement due aux AMPAR tel que montrée par l'application de l'antagoniste sélectif des AMPAR et équivalente dans les deux types d'interneurones O/A-INs et R/LM-INs. Notre observation que l'activation des AMPAR ne semble pas responsable de la vulnérabilité sélective des interneurons est en contraste avec une étude montrant une excitotoxicité par le KA à très forte concentration (500µM) via les AMPAR  $Ca^{2+}$ -perméables dans les astrocytes et oligodendrocytes de la colonne dorsale de la moelle épinière (Li S et Stys PK 2000).

Bien que nos résultats suggèrent que les composantes AMPA/KA soient équivalentes chez les interneurons OA-IN et RLM-IN, il aurait été intéressant d'évaluer une contribution différentielle des KAR à l'effet direct du KA. En effet certains résultats indiquent une action du glutamate endogène via les KAR composés des sous-unités iGluR5 et iGluR6 dans les cellules pyramidales (Smolders I et al. 2002; Mulle C et al. 1998) et

interneurones (Khalilov I et al. 2002). Par contre, au moment où les travaux de la thèse ont été effectués, les antagonistes des KARs disponibles étaient peu sélectifs (O'Neill MJ et al. 1998).

### **4.3 Activité induite par le KA: effets sur le calcium intracellulaire**

L'absence de différence au niveau des effets électrophysiologiques du KA entre les interneurones O/A-IN et R/LM-IN, indique que des mécanismes en aval de la dépolarisation pourraient différer entre les deux types d'interneurones. Une possibilité pourrait être l'élévation de calcium intracellulaire à partir des stocks intracellulaires ou par les canaux  $Ca^{2+}$  qui est un élément critique dans les multiples cascades intracellulaires impliquées dans l'excitotoxicité (Choi DW 1994). Mais dans certains cas le  $Ca^{2+}$  peut s'avérer être neuro-protecteur par le fait qu'une élévation précoce protégerait contre des élévations subséquentes de calcium intracellulaire (Friedman LK 2006). Par contre selon nos données, il n'y a pas eu de différence entre les élévations calciques dans les deux types d'interneurones. Nos résultats suggèrent que s'il y a activation de mécanismes différents, ils sont en aval des élévations  $Ca^{2+}$  donc, possiblement au niveau de l'activation de cascades intracellulaires dans les deux types d'interneurones.

Les effets aigus similaires du KA entre les interneurones vulnérables et résistants pourraient signifier qu'il y a nécessité de développer une activité épileptiforme ou des crises

récurrentes pour induire un effet excitotoxique menant vers la perte cellulaire (Wasterlain CG 1997). Par contre, il a été suggéré que le *status epilepticus* initial est suffisant pour engendrer la perte cellulaire et que l'apparition et la fréquence des crises récurrentes n'influent pas sur la perte (Gorter JA et al. 2003), suggérant un effet aigu plutôt que chronique.

Il est important de souligner certaines limites dans notre interprétation des résultats en imagerie  $\text{Ca}^{2+}$ . Premièrement, puisque la technique du patch-clamp en configuration cellule-entière a été utilisée, il se pourrait que la dialyse intracellulaire affecte les protéines endogènes liant le  $\text{Ca}^{2+}$ , rendant uniformes les élévations de  $\text{Ca}^{2+}$  induites par le KA. Ceci pourrait être résolu en utilisant un indicateur  $\text{Ca}^{2+}$  perméable aux membranes (Carmant L et al. 1997). De plus, nos conclusions sont basées sur des observations d'élévation de  $\text{Ca}^{2+}$  au niveau du soma. Puisque des micro-domaines de  $\text{Ca}^{2+}$  sont associés à divers récepteurs glutamatergiques au niveau des dendrites des interneurones (Topolnik L et al. 2006), une analyse plus détaillée à ce niveau pourrait révéler des mécanismes  $\text{Ca}^{2+}$  spécifiques à certains types d'interneurones.

## **4.4 Implication différente des mGluR1 et mGluR5 dans l'activité épileptiforme des O/A-INS**

Au cours de notre étude décrite au chapitre III, nous avons employé un protocole de stimulation des afférences des O/A-INS afin d'activer les mGluRI de manière synaptique et évaluer leur rôle dans un contexte d'activation plus "physiologique" que lors d'une activation pharmacologique (Lee AC et al. 2002). Nos résultats suggèrent une activation des mGluR1 $\alpha$  et mGluR5 dans les interneurons O/A au cours de la décharge paroxysmique (PD) évoquée synaptiquement en présence de BIC et de 4-AP (Sanon N et al. 2010). Nos données contrastent avec celles d'autres études rapportant uniquement une activation des mGluR1 $\alpha$  lors d'un protocole de stimulation à haute fréquence de courte durée (100Hz, 100ms) (Huang YH et al. 2004), ou un protocole de LTP induit par une stimulation en bouffées  $\theta$  couplée à une dépolarisation post-synaptique. (Perez Y et al. 2001; Lapointe V et al. 2004). Il est important de noter que la principale différence entre ces conditions et les nôtres est que nos stimulations ont lieu dans une tranche désinhibée et en présence de d'un bloqueur de canaux K<sup>+</sup>. Il est donc possible qu'une activité épileptiforme entraînant une libération plus importante de glutamate sur les interneurons soit nécessaire à l'activation supplémentaire des mGluR5, tel que rapporté dans des cellules pyramidales du CA3 (Lee AC et al. 2002; Merlin LR 2002). De plus, le type d'électrode de stimulation utilisée dans ces études diffère de la nôtre; ainsi les stimulations effectuées par

les micro-électrodes de verre favorisent une activation de fibres plus restreinte et localisée que les électrodes concentriques bipolaires comparativement plus grosses.

L'activation synaptique des mGluR5 et mGluR1 que nous avons observée concorde aussi avec leur activation lors de CPSEs évoqués dans des interneurons du CA3 en tranches pharmacologiquement désinhibées (Mori M et Gerber U 2002). Cette activation n'ayant jusqu'à récemment pas été observée dans les interneurons du CA1, nous rapportons donc une implication des mGluR5 en plus des mGluR1 dans l'activité synaptique des interneurons O/A du CA1. Nos observations concordent avec de récentes données qui montrent une activation synaptique des mGluR5 dans les dendrites des O/A-INs par une stimulation à haute fréquence de longue durée (100Hz, 1sec) (Topolnik L et al. 2009), tandis qu'une stimulation à haute fréquence mais de courte durée (100Hz, 100ms) n'active que les mGluR1 $\alpha$  (Huang YH et al. 2004). L'activation synaptique des mGluR5 dans ces interneurons dépend donc des conditions de stimulation.

Nous avons enregistré trois types de réponses épileptiformes synaptiques: les décharges en bouffée, les PD et les CPSE, induites dans les interneurons en présence de BIC+4-AP. Ces deux antagonistes appliqués ensemble permettent de désinhiber le réseau hippocampique et d'induire dans la tranche une activité de type ictale (d'une durée de l'ordre des secondes), contrairement à l'application seule de BIC qui produit une activité de type inter-ictale (de l'ordre des centaines de millisecondes) (Lee AC et al. 2002).

Nos résultats ont montré une activation mGluR5 mais aucune implication des mGluR1 $\alpha$  lors des décharges en bouffée dans les O/A-INS. Par contre, une activation mGluR1 $\alpha$  a été montrée dans les cellules pyramidales du CA3 lors de décharges en bouffée déclenchées spontanément dans une tranche désinhibée (Lee AC et al. 2002). Ceci suggère que les deux sous-types de récepteurs contribuent à la production des décharges en bouffée épileptiformes via des mécanismes différents dans les interneurons et dans les cellules pyramidales, qui pourrait impliquer notamment la phospholipase C $\beta_1$  (PLC $\beta_1$ ) (Lee AC et al. 2002).

Nos résultats montrent que les mGluR1 $\alpha$  et mGluR5 sont activés durant la PD et le courant (CPSE) qui la sous-tend. Les mGluR5 sont donc impliqués dans les décharges en bouffée, la PD et le CPSE, mais les mGluR1 ne sont impliqués que dans la PD et le CPSE. Ces observations pourraient indiquer que ces récepteurs induisent des réponses avec des cinétiques différentes. Une différence de cinétique a d'ailleurs été observée dans nos résultats qui montrent en mode voltage-imposé que les mGluR1 $\alpha$  sont impliqués dans la composante lente du CPSE bi-phasique tandis que les mGluR5 sont impliqués dans les composantes lente et rapide du CPSE. Collectivement ces données pourraient suggérer que la composante rapide du CPSE sous-tend l'activité de décharge en bouffée alors que la composante lente se reflète dans l'activité de PD. Par contre ceci demeure à être confirmé par des expériences supplémentaires.

Les mécanismes intracellulaires en aval de l'activation des mGluR1 et mGluR5 sont différents dans les O/A-INS. L'activation des mGluR1 $\alpha$  cause, par une voie Src/ERK-dépendante, l'entrée de Ca<sup>2+</sup> par des canaux TRP ainsi que la libération intracellulaire pendant l'induction de la potentialisation à long-terme (LTP) (Topolnik L et al. 2006). Par contre, l'activation des mGluR5 ne produit qu'une libération de Ca<sup>2+</sup> des stocks intracellulaires indépendamment de l'activation de Src/ERK (Topolnik L et al. 2006). Il a d'ailleurs récemment été montré que les décharges épileptiformes induites par le DHPG dans le CA3 induisent une translocation de la membrane au cytoplasme des canaux TRPC4 et 5 (Wang M et al. 2007). On peut ainsi supposer que ces isoformes pourraient aussi être impliquées lors des décharges épileptiformes associées aux mGluR1 $\alpha$  dans les O/A-INS.

Des rôles différents des mGluR1 $\alpha$  et mGluR5 ont aussi été observés dans les cellules pyramidales du CA1, notamment la suppression de la transmission synaptique excitatrice médiée par les mGluR1 $\alpha$  et la suppression du courant K<sup>+</sup> responsable de la post-hyperpolarisation médiée par les mGluR5, lors de leur activation par le DHPG en présence de MPEP et de LY367385 respectivement (Mannaioni G et al. 2001). En somme, ces résultats confirment le rôle important de l'activation synaptique des mGluR1/5 dans la régulation de l'excitabilité des cellules pyramidales et des interneurons O/A via des mécanismes distincts. Les rôles différents des mGluR1 et mGluR5 concordent bien avec leurs mécanismes distincts rapportés dans plusieurs systèmes neuronaux : le couplage à diverses protéines (Gs vs Gq) (Abe T et al. 1992); leur action via des protéines effectrices

différentes malgré le couplage à la même protéine G transductrice (ex: interactions mGluR1–canaux récepteurs IP<sub>3</sub> et mGluR5–NMDAR [Mannaioni G et al. 2001], ou mGluR5–récepteurs de l'adénosine A<sub>2A</sub>–NMDAR [Tebano MT et al. 2005]).

#### **4.5 Activité synaptique épileptiforme dépendante du sous-type d'interneurone**

Lors de nos expériences visant à comparer les rôles des mGluR1/5 dans l'activité épileptiforme des O/A-INs et R/LM-INs, nos résultats ont montré que les bloqueurs mGluR1/5 n'avaient aucun effet sur les décharges en bouffée ainsi que sur les PD induites dans les R/LM-INs. Des études en hybridation *in situ* et en immuno-histochimie ont montré une expression différentielle de l'ARNm et des protéines mGluR 1 et 5 dans les différentes populations cellulaires de l'hippocampe. Notamment dans le CA1 l'expression mGluR1 $\alpha$  est élevée dans les couches *oriens* et *alveus* mais faible dans les couches *radiatum* et *lacunosum-molecuare* (Shigemoto R et al. 1997; Ferraguti F et al. 2004). Cette distribution hétérogène est en accord avec nos données ne montrant aucun effet d'un antagoniste mGluR1 $\alpha$  sur les réponses épileptiformes dans les R/LM-INs. Par contre, l'expression des mGluR5 est très étendue dans toutes les couches du CA1 (Shigemoto R et al. 1997). Nos résultats électrophysiologiques ne concordent pas avec ce patron d'expression des mGluR5 puisque l'antagoniste mGluR5 MPEP n'a eu aucun effet sur les réponses épileptiformes dans les R/LM-INs, mais a significativement réduit ces réponses

dans les O/A-INs. Ceci suggère que, bien que présents dans les R/LM-INs, les mGluR5 ne seraient pas activés lors des décharges épileptiformes dans ces cellules.

Il est possible que les mGluR5 localisés extra-synaptiquement ne soient pas recrutés dans les R/LM-INs dû à un apport pré-synaptique différent par rapport aux O/A-INs. En effet, les O/A-INs sont activés d'une manière rétroactive (feedback) par les collatérales des axones des cellules pyramidales du CA1 (Knowles WD et Schwartzkroin PA 1981; Lacaille JC et al. 1987) et d'une manière proactive ("feed-forward") par les collatérales de Schaffer (SC) provenant du CA3 (Schwartzkroin PA et Mathers LH 1978; Buzsaki G et Eidelberg E 1982; Lacaille JC et al. 1987). Par opposition, les R/LM-INs ne sont activés que d'une manière proactive ou directe par les afférences des SC et de la voie temporo-ammonique provenant du CE (Lacaille JC et Schwartzkroin PA 1988b). Particulièrement dans un contexte de tranche désinhibée, la voie rétroactive pourrait être activée de façon marquée puisque les cellules pyramidales sont hyperexcitables, ce qui pourrait apporter une activation préférentielle des mGluR5 dans les O/A-INs. Il est intéressant de noter que contrairement à la région CA1, les RAD-INs du CA3 reçoivent des afférences rétroactives des cellules pyramidales du CA3 (Mori M et Gerber U 2002), et montrent une activation synaptique des mGluR1 et mGluR5 dans les tranches désinhibées.

Les astrocytes sont une partie intégrante de la synapse (Araque A et al. 1999) et jouent un rôle important dans la régulation de la transmission synaptique entre autres par leur effet sur l'élimination du glutamate de la fente synaptique. Il a été montré que les

transporteurs astrocytaires du glutamate sont importants dans la régulation de l'activation synaptique des mGluR1 $\alpha$  dans les interneurones O/A (Huang YH et al. 2004). Ce mécanisme n'a toutefois pas été démontré dans les R/LM-INS du CA1, mais il serait possible que la régulation astrocytaire de la clairance du glutamate soit différente aux synapses des O/A-INS et des R/LM-INS et préviendrait de façon plus efficace l'activation des mGluR5 extrasynaptique dans les R/LM-INS.

L'activation des mGluRI entraîne un courant entrant, via des canaux perméables aux cations et dépendant de l'augmentation du niveau de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire ( $I_{CAN}$ ), et ce, spécifiquement dans les interneurones O/A (McBain CJ et al. 1994; van Hooft JA et al. 2000; Woodhall G et al. 1999). Nos données présentant un CPSE entrant indépendant des récepteurs NMDA et non-NMDA mais dépendant de l'activation des mGluR1/5 semblent révéler l'activation d'un courant  $I_{CAN}$  durant l'activité épileptiforme dans les O/A-INS. En fait, il a été montré par des applications de DHPG (Topolnik L et al. 2006) et par activation synaptique tétanique (Huang YH et al. 2004) que ces courants cationiques non-sélectifs étaient bloqués par le LY367385 montrant leur activation spécifique par les mGluR1 $\alpha$ , et étaient sensibles au SKF96365, un antagoniste des canaux cationiques TRP. Dans les cellules de Purkinje du cervelet les canaux responsables du  $I_{CAN}$  sont les canaux récepteurs de potentiels transitoires de type 1 (TRPC1) qui interagissent avec les mGluR1 $\alpha$  (Kim SJ et al. 2003). L'absence de cette voie de signalisation mGluR1 $\alpha$ -dépendante dans les R/LM-

INs pourrait être responsable des réponses épileptiformes de moindre magnitude que nous avons observées dans ces interneurones.

Puisqu'il a déjà été proposé que l'excitotoxicité par le glutamate implique une cascade moléculaire initialement déclenchée par une hausse de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire (Lipton SA et Rosenberg PA 1994; Choi DW 1994), il serait possible que l'activation préférentielle de canaux TRP aux O/A-INs soit responsable de l'activation d'une cascade excitotoxique  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendante dans ces cellules. D'ailleurs, des oscillations calciques dépendantes des mGluRI/II ont été observées spécifiquement dans ces interneurones (Carmant L et al. 1997; Woodhall G et al. 1999). Ces réponses  $\text{Ca}^{2+}$  pourraient favoriser la génération de radicaux libres via l'activation de la NO synthase, l'enzyme de synthèse de l'oxyde nitrique dans les interneurones O/A (Doyle CA and Slater P 1997) et activer des enzymes telles les lipases, protéases, endonucléases et autres enzymes cataboliques menant à la mort cellulaire (De Keyser J et al. 1999). Ces mécanismes impliquant le  $\text{Ca}^{2+}$  pourraient engendrer la vulnérabilité sélective des O/A-INs par l'intermédiaire de l'activation des mGluR1 $\alpha$  durant l'activité épileptique. Ces mécanismes seraient en accord avec nos observations à l'effet que les récepteurs ionotropes du glutamate ne seraient pas responsables de la vulnérabilité sélective entre les interneurones O/A et R/LM (Sanon N et al. 2005).

Nos évidences montrant un rôle différent des récepteurs glutamatergiques dans l'activité synaptique épileptiforme dépendant du sous-type d'interneurone sont résumées de façon schématique dans la Figure D.

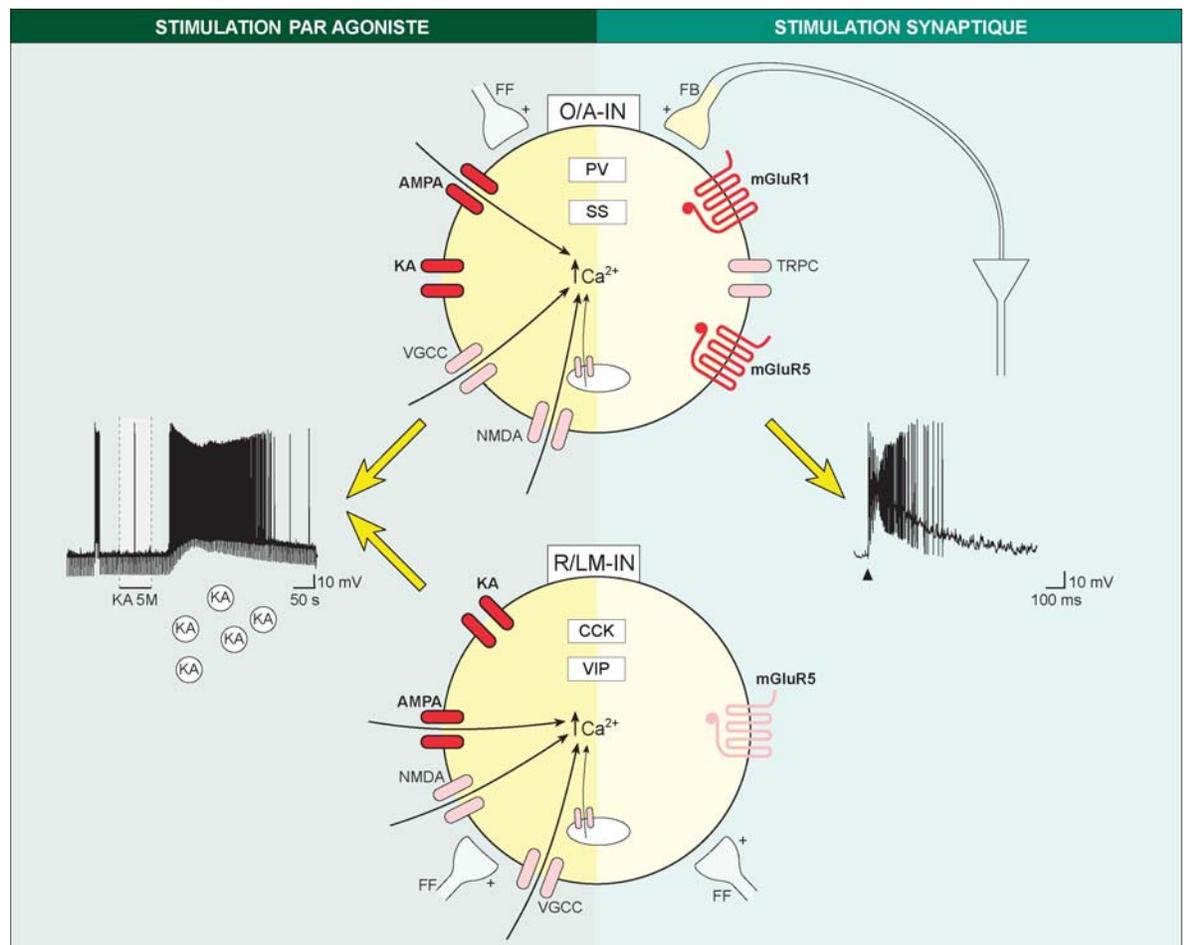


Figure D: Schéma récapitulatif du rôle des récepteurs glutamatergiques dans l'activité épileptiforme des interneurones inhibiteurs de l'hippocampe.

Du côté gauche, l'agoniste glutamatergique KA induit des réponses électrophysiologiques et calciques similaires dans les O/A-INS et les R/LM-INS via les AMPAR, KAR, NMDAR et VGCC. À l'inverse, du côté droit, l'activation synaptique en tranche désinhibée induit des réponses différentes dans les O/A-INS et les R/LM-INS via l'implication des mGluR1/5. En rouge et en caractère gras, les éléments qui ont été mesurés. En rose et en caractère mince sont les éléments rapportés dans la littérature. Il est à noter que pour simplification, tout est représenté dans le corps cellulaire ce qui ne prend pas en considération la localisation dendritique des récepteurs étudiés.

## **4.6 Changements dans les courants synaptiques spécifiques aux O/A-INS dans le modèle KA**

Les études formant le corps de cette thèse ont été effectuées dans des tranches issues de rats sains sur lesquelles l'activité a été induite soit par application d'un agoniste glutamatergique, dans le cas de la première étude, soit par activation synaptique dans une tranche désinhibée, dans le cas de la seconde. Dans ces deux études les effets analysés étaient à court-terme.

Qu'en est-il des modifications à long-terme qui peuvent survenir dans un tissu épileptique chronique comme chez le rat traité au KA? Parmi les changements affectant directement la région CA1, il y a d'une part la perte importante de cellules pyramidales du CA3 (Nadler JV et al. 1980; Morin F et al. 1998b) qui constitue une modification à long-

terme diminuant l'hyperexcitabilité du réseau neuronal. D'autre part il y a des modifications à long-terme augmentant l'hyperexcitabilité du réseau neuronal en agissant sur l'excitation, tels le développement de nouvelles fibres axonales des collatérales de Schaffer (Nadler JV et al. 1980) et de nouveaux axones récurrents des cellules pyramidales du CA1 (Perez Y et al. 1996; Esclapez M et Houser CR 1999). Finalement, il y a des modifications à long-terme augmentant l'hyperexcitabilité du réseau neuronal en agissant sur l'inhibition, telles la perte des interneurons inhibiteurs de l'oriens du CA1 (Morin F et al. 1998b) et la déafférentation des interneurons inhibiteurs du RAD du CA1 (Morin F et al. 1998a).

L'étude présentée en annexe I (Perez Y et al. 2006) fait état de changements à long terme qui ont lieu au niveau des afférences excitatrices que reçoivent les interneurons du CA1 dans le modèle KA en comparaison de l'état contrôle. On y montre que l'amplitude et la fréquence de l'activité spontanée excitatrice ainsi que l'amplitude des EPSPs évoqués dans les interneurons O/A sont inchangés chez les rats KA, mais leurs temps de montée et de descente sont plus lents (Perez Y et al. 2006). Cette différence de cinétique est spécifique aux synapses des O/A-INS, n'étant pas observée aux synapses des Rad-INS. Cette différente cinétique pourrait être due à de nouvelles connexions issues des axones collatéraux des cellules pyramidales du CA1 (Perez Y et al. 1996; Esclapez M et Houser CR 1999). La cinétique plus lente de l'activité synaptique des fibres axonales nouvellement formées sur les cellules pyramidales favorise la sommation temporelle des EPSPs (Konig P et al. 1996) et a pour effet d'augmenter l'hyperexcitabilité du réseau. La cinétique plus lente

de l'activité synaptique sur les O/A-INS favorise plutôt l'inhibition du réseau, peut-être de manière compensatoire à la perte d'inhibition dans le modèle KA (Ratte S et Lacaille JC 2006). Par contre ce changement pourrait aussi, à l'inverse, augmenter l'excitotoxicité de ces interneurons pendant l'activité épileptique.

Il est intéressant de noter que c'est la composante médiée par les NMDAR des courants synaptiques qui montrent un changement de cinétique dans le modèle KA, et que celui-ci pourrait être causé par une modification de leur dépendance au voltage (Perez Y et al. 2006). Or, certaines sous-unités NR2 des NMDAR ont une cinétique plus lente ainsi qu'une moindre dépendance au voltage (Monyer H et al. 1992). De plus, un couplage fonctionnel des mGluR5 aux NMDAR a été décrit (Mannaioni G et al. 2001; Alagarsamy S et al. 1999; Alagarsamy S et al. 2005). Considérant ceci avec le fait que les mGluR5 jouent un rôle important dans l'activité épileptiforme déclenchée *in vitro* dans les O/A-INS, on pourrait envisager que l'activation des mGluR5 durant l'activité épileptiforme puisse être liée à un changement au niveau des sous-unités NMDAR ce qui favoriserait une activité de plus longue durée spécifiquement dans les O/A-INS.

## **4.7 Implications fonctionnelles de la perte d'interneurones dans le modèle KA du TLE**

En somme, les recherches effectuées au cours de cette thèse ont montré une perte sélective d'interneurones O/A du CA1 dans le modèle KA, dont la vulnérabilité pourrait être due à une activation spécifique des mGluR1/5 durant l'activité épileptiforme dans ces cellules. Cette perte d'interneurones inhibiteurs dans le modèle KA peut avoir plusieurs conséquences fonctionnelles sur le niveau d'excitabilité du réseau hippocampique.

Une des conséquences fonctionnelles de la perte des O/A-INS consiste en une désinhibition des dendrites distales des cellules pyramidales (Cossart R et al. 2001; Sanon N et al. 2002; Ang CW et al. 2006). En effet, les interneurones O-LM sont un sous-type d'interneurones du O/A qui sont particulièrement vulnérables. Ces interneurones inhibent spécifiquement les dendrites distales des cellules pyramidales dans la couche L/M. Les principales afférences excitatrices ciblant les dendrites apicales des cellules pyramidales du CA1 proviennent des SC des cellules pyramidales du CA3. Une seconde voie issue du EC contacte les dendrites plus distales des cellules pyramidales, soit la voie temporo-ammonique (TA) (Colbert CM et Levy WB 1992) qui a un rôle modulateur sur les cellules pyramidales par leurs synapses surtout sur les interneurones (Empson RM et Heinemann U 1995) et est impliquée dans le relai de l'information sur le positionnement provenant du CE aux "place cells" (Brun VH et al. 2002). Par contre, la voie TA constitue une entrée

synaptique de moindre "poids" que les SC (Levy WB et al. 1995), même si ces dernières sont partiellement lésées dans le modèle. Ainsi dans le modèle KA, le ratio excitation/inhibition dans la couche L-M est altéré en faveur de l'excitation à cause de la perte de l'input inhibiteur et la voie TA subit donc une augmentation d'efficacité (Ang CW et al. 2006), contribuant ainsi à une hyperexcitabilité du réseau local.

Les interneurones sont des régulateurs importants des circuits neuronaux (Aradi I et Soltesz I 2002) qui influencent l'activité rythmique du réseau local par leur effet inhibiteur localisé dans l'espace (connexions ciblées) et dans le temps (patrons de décharges précis). L'effet de l'activité d'un neurone sur le réseau a été montré directement par les enregistrements simultanés de l'activité intracellulaire dans un O/A-IN et l'activité extracellulaire dans la couche pyramidale du CA1 montrant que le maximum d'inhibition est en phase avec le minimum d'activité du réseau, dans un modèle d'activité épileptiforme induite par une concentration élevée de potassium extracellulaire (McBain CJ 1995). Ainsi la perte d'interneurones dans un contexte pathologique comme dans les couches O/A du CA1 empêche le contrôle de l'excitabilité des couches profondes, et pourrait aussi affecter la rythmicité du réseau, certains de ces interneurones (O-LM) étant importants à la génération du rythme theta, impliqué dans le comportement moteur exploratoire, sans toutefois affecter le rythme gamma du réseau (Wulff P et al. 2009).

## 4.8 mGluR1 et mGluR5 comme potentielle cible thérapeutique

La plupart des anti-épileptiques actuellement utilisés agissent sur la régulation de l'excitation en bloquant les canaux sodiques ou calciques voltage-dépendants (Rogawski MA 2006; Stefani A et al. 1997; Curry WJ et Kulling DL 1998), ou de l'inhibition GABAergique (agoniste du GABA, inhibiteur du catabolisme du GABA, inhibiteur de la recapture du GABA, facilitateur de la libération du GABA, ou facilitateur de l'activité du récepteur GABAergique) (Ben-Menachem E 1995).

Étant donné le rôle important des mGluR1 et mGluR5 dans l'activité épileptique *in vivo* (Nagaraja RY et al. 2005; Renaud J et al. 2002; Lu YM et al. 1997) et l'activité épileptiforme *in vitro* (Lee AC et al. 2002; nos données), il serait intéressant de considérer des agents agissant sur ces récepteurs comme outil pharmacologique anti-épileptique (Alexander GM et Godwin DW 2006). Des antagonistes spécifiques de ces récepteurs, tels le LY367385 et le MPEP, pourraient être utilisés. Un avantage de tels agents agissant sur les mGluR1 et 5 serait que leur mécanisme d'action n'est pas impliqué dans les réponses synaptiques rapides des récepteurs glutamatergiques ionotropes mais plutôt lors de réponses impliquant une plus grande libération de glutamate, comme lors de l'activité épileptique. On pourrait envisager un effet anti-convulsivant de ces agents en bloquant 1) l'initiation et le maintien des bouffées épileptiformes (Merlin LR 2002), et 2) l'activation des TRPC par l'intermédiaire des mGluR1 $\alpha$  (Topolnik L et al. 2006) et des courants des canaux cationiques non-sélectifs activés par les récepteurs mGluR1/5 (Anwyl R 1999).

Par contre, étant donné la distribution ubiquitaire des récepteurs mGluR1 et 5 (Ferraguti F et Shigemoto R 2006), on peut anticiper des effets secondaires suite à une administration systémique. Ainsi, des molécules antiépileptiques ciblant précisément les mGluR1/5 devront exercer leur effet de manière spécifique aux structures impliquées dans l'épilepsie du lobe temporal.

## 4.9 Perspectives d'avenir

### 4.9.1 Régulation de l'activation des mGluR5 par les transporteurs du glutamate

Aux synapses des interneurons de la couche *oriens* du CA1 le niveau de glutamate est contrôlé par des transporteurs du glutamate situés sur les astrocytes (Huang YH et al. 2004). Les mGluR1/5 sont activés au cours de l'activité épileptiforme dans ces interneurons mais non dans les R/LM-INS. Nous avons émis l'hypothèse que l'absence d'activation des mGluR5 soit due à leur localisation extra-synaptique sur les R/LM-INS et à une régulation astrocytaire plus efficace des concentrations de glutamate libéré à ces synapses. Afin de vérifier cette hypothèse il serait, dans un premier temps, utile de déterminer si le bloc des transporteurs du glutamate par le dihydrokainate (antagoniste de ces transporteurs astrocytaires) entraîne une activation des mGluR5 lors de l'activité épileptiforme dans les R/LM-INS. Dans la négative, ceci indiquerait que les récepteurs pourraient être situés à une distance inaccessible au glutamate libéré dans la fente synaptique. Dans l'affirmative, il y aurait donc une clairance efficace du glutamate aux synapses des R/LM-INS par les transporteurs empêchant l'activation des mGluR5, même lors de l'activité épileptiforme.

#### **4.9.2 Mécanismes calciques liés à l'activation des mGluR1/5 durant l'activité épileptiforme**

Étant donné que nos résultats suggèrent une implication possible du calcium intracellulaire induit par l'activité mGluR1/5 principalement par les canaux TRP et les stocks intracellulaires dans la vulnérabilité sélective des interneurons (Topolnik L et al. 2006), il serait intéressant de mesurer les variations de  $Ca^{2+}$  induites dans les conditions épileptiformes dans les O/A-INS, c'est-à-dire lors de la PD obtenue en présence de QX-314 et de caractériser les mécanismes impliqués, notamment l'implication des canaux TRP. Ces expériences compareraient les niveaux de  $Ca^{2+}$  intracellulaire induits lors de la PD en présence et en absence des antagonistes mGluR1 $\alpha$ , TRP et de la ryanodine soit avec le LY367385, le SKF et la thapsigargine respectivement. Ceci mettrait en évidence l'apport des canaux TRP à la réponse calcique épileptiforme dans les interneurons (O-LM) identifiés morphologiquement et reconnus comme étant vulnérables dans le modèle KA. On s'attend ainsi à voir une réponse calcique amoindrie en présence de l'antagoniste mGluR1 $\alpha$  à cause du lien fonctionnel de ce récepteur aux canaux TRP dans les interneurons de l'oriens. De plus, il serait intéressant d'effectuer ces enregistrements au niveau des dendrites, puisque qu'ils contiennent des micro-domaines calciques où il y a modification à long terme des canaux calciques dendritiques voltage-dépendants (L-type) via les mGluR5 (Topolnik L et al. 2009).

### **4.9.3 Rôle spécifique des sous-types mGluR1/5 dans les changements chroniques du modèle KA**

Il serait intéressant d'évaluer l'implication spécifique de chacun des sous-types de récepteur mGluR1 et 5 dans les divers changements qui surviennent à long terme dans la région CA1 en utilisant les antagonistes sélectifs mGluR1 $\alpha$  (LY) et mGluR5 (MPEP).

Premièrement, dans le but de tester un rôle spécifique dans l'établissement de l'état de crise chronique et la conséquence sur les fonctions cognitives, il serait possible d'injecter des rats au KA avec un traitement simultané au LY ou MPEP. Les deux groupes de rats seront comparés à un troisième groupe KA servant de contrôle. Après l'apparition des crises récurrentes durant la période dite chronique, soit environ deux semaines et plus, les rats pourraient être évalués du point de vue comportemental pour déterminer la fréquence des crises et leur niveau de gravité selon l'échelle de Racine (Racine RJ 1972). Il serait aussi intéressant d'évaluer les déficits de la mémoire spatiale dépendante de l'hippocampe par le test de labyrinthe aquatique de Morris. Puisqu'une implication des mGluRs du groupe I a été montrée dans les déficits de fonctions cognitives (Renaud J et al. 2002), les résultats de l'étude proposée permettraient de distinguer l'implication spécifique des sous-types mGluR1 ou 5 dans l'épileptogénèse menant à un déficit comportemental dans le modèle KA.

Dans un deuxième temps, il serait intéressant d'évaluer le rôle spécifique des mGluR1/5 dans l'hyperexcitabilité des neurones CA1 en utilisant des enregistrements

électrophysiologiques extracellulaire de tranches issues des rats précédemment évalués pour leurs crises des trois groupes (KA, KA+LY, KA+MPEP). D'une part, les tranches issues des rats qui ont démontré des crises récurrentes (rats KA contrôles) devraient avoir des potentiels de champs avec plusieurs pics de population (population spikes) suite à une stimulation des collatérales de Schaffer, indiquant une hyperexcitabilité de la région CA1. Dans le cas des rats ayant subi un traitement avec un des antagonistes, la sévérité des crises ainsi que l'hyperexcitabilité devraient être moins prononcées, se reflétant en une diminution de l'amplitude et du nombre des population spikes.

Finalement, il serait intéressant d'évaluer le rôle spécifique des mGluR1 et 5 dans la vulnérabilité des interneurons à l'excitotoxicité. Puisque nos résultats indiquent qu'il y a perte des interneurons situés dans la couche *oriens* qui sont immunopositifs pour la somatostatine (SS) et la parvalbumine (PV), il serait possible d'évaluer cette perte cellulaire par immuno-histochimie en utilisant un double-marquage  $GAD^+/SS^+$  ou  $GAD^+/PV^+$  sur un sous-groupe de tranches issues des groupes KA, KA+LY et KA+MPEP.

## 4.10 Conclusion générale

Dans le modèle KA de nombreux changements anatomiques et physiologiques ont lieu dans le réseau GABAergique de l'hippocampe. En particulier, certains interneurons inhibiteurs du CA1 connaissent une vulnérabilité sélective. Or, par leur ciblage de régions dendritiques précises des cellules pyramidales du CA1, l'activité de ces interneurons a des conséquences importantes sur l'activité du réseau de cette région de l'hippocampe.

Ainsi, l'objectif principal de cette thèse était de mettre en évidence le rôle des récepteurs du glutamate dans l'activité épileptiforme des interneurons de l'hippocampe et de vérifier si l'activation de ces récepteurs pouvait être liée à la vulnérabilité sélective de certains interneurons dans le modèle KA de l'épilepsie du lobe temporal. Nos données montrent d'une part une claire implication des mGluR1 et 5 au cours de l'activité épileptiforme des interneurons O/A. D'autre part nos données montrent que les effets liés à l'activation des mGluR1 et mGluR5 sont différents, notamment au niveau de leur cinétique, suggérant que ces deux sous-types puissent avoir des rôles distincts dans ces interneurons. Nos données suggèrent donc que les sous-types mGluR1 et 5 pourraient être impliqués dans la vulnérabilité sélective des interneurons par leur activation sélective lors de l'activité épileptiforme dans ces neurones. Mais l'activation de ces récepteurs constitue-t-elle un facteur qui est la cause de l'épileptogénèse dans le modèle KA ou qui en est la conséquence? Nos données ne peuvent distinguer ces deux possibilités puisque d'une part, l'activation des mGluR1/5 participe à l'activité épileptiforme, leur bloc diminuant

significativement cette activité; et d'autre part, une stimulation de forte intensité, comme l'activité épileptiforme, est nécessaire à leur activation synaptique.

Il a déjà été dit que "*seizures beget seizures*" (Chen K et al. 1999; Ben-Ari Y et Holmes GL 2006) ou la présence de crises engendre d'autres crises. Il se pourrait donc que l'activation des mGluR1/5 constitue à la fois une cause et une conséquence de l'activité épileptiforme.

## **Annexe I**

### **Cell-type specific changes in spontaneous and minimally evoked excitatory synaptic activity in hippocampal CA1 interneurons of KA-treated rats.**

Perez Y, Ratté S, Sanon N, Lapointe V, Lacaille J-C

*Epilepsy Research* 68: 241-254, 2006



Epilepsy Research 68 (2006) 241–254

---

**Epilepsy  
Research**


---

www.elsevier.com/locate/epilepsyres

## Cell type-specific changes in spontaneous and minimally evoked excitatory synaptic activity in hippocampal CA1 interneurons of kainate-treated rats

Yaël Perez<sup>1</sup>, Stéphanie Ratté<sup>1</sup>, Nathalie Sanon, Valérie Lapointe,  
Jean-Claude Lacaille\*

*Département de Physiologie et Centre de Recherche en Sciences Neurologiques, Université de Montréal, Qué., Canada H3C 3J7*

Received 29 June 2005; received in revised form 6 October 2005; accepted 10 November 2005  
Available online 20 December 2005

---

### Abstract

The epileptiform activity in the kainic acid (KA) model of epilepsy arises from complex changes in excitation and inhibition. To assess the involvement of excitatory drive onto inhibitory interneurons in this epileptiform activity, we examined changes in spontaneous and minimally evoked excitatory post-synaptic currents (sEPSCs and eEPSCs) in CA1 interneurons in stratum oriens/alveus (O/A) and stratum radiatum (RAD) in rat hippocampal slices after KA treatment. The frequency and amplitude of sEPSCs and the amplitude of eEPSCs were unchanged in O/A interneurons, but the EPSC kinetics were significantly slower. These changes appear to be due to altered kinetics and voltage-dependent properties of the NMDA component of EPSCs in O/A interneurons. In contrast, sEPSCs and eEPSCs in RAD interneurons did not change after KA treatment. The distinct changes in excitatory synaptic activity in interneurons differentially involved in feedback (O/A) versus feedforward (RAD) inhibition suggest a cell type-specific reorganization of excitatory synapses after KA treatment. These modifications in excitatory input to interneurons could contribute to the maintenance of inhibition of CA1 pyramidal cells after KA treatment, or may also create network conditions favourable to epileptiform activity.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Kainic acid; Epilepsy; Interneurons; Hippocampus; NMDA; EPSC

---

### 1. Introduction

Intraventricular injections of kainate (KA) in rats produce a loss of cells in the hippocampal CA3/CA4 regions, cause a partial de-afferentation of CA1 cells, result in epileptiform activity in the CA1 region, and lead to the development of a chronic epileptic state

(Nadler et al., 1980a; Lancaster and Wheal, 1984; Franck and Schwartzkroin, 1985; Ashwood and Wheal, 1986). This animal model of epilepsy shares important neuropathological features with human temporal lobe epilepsy (Ben-Ari, 1985), making it useful for investigating mechanisms of epileptogenesis that may be relevant to the human disorder (Nadler, 1981; Ben-Ari et al., 1981; Ben-Ari, 1985).

In the KA-lesioned rat, multiple changes contribute to the hyperexcitability of the CA1 region and these involve both excitatory and inhibitory pathways. At the level of excitatory circuits, there is sprouting of axon collaterals of CA1 pyramidal cells into oriens and radiatum layers (Perez et al., 1996; Esclapez et al., 1999). This local reorganization of excitatory pathways is associated with an increased glutamatergic synaptic drive on pyramidal cells (Esclapez et al., 1999). *N*-Methyl-D-aspartate (NMDA) receptor-mediated component of excitatory post-synaptic potentials (EPSPs) is also increased in CA1 pyramidal neurons (Turner and Wheal, 1991; Williams et al., 1993), which contributes to the generation of epileptiform burst discharges (Herron et al., 1985; Ashwood and Wheal, 1986, 1987; Smith and Dudek, 2001). In addition to these changes, KA-induced hyperexcitability of CA1 pyramidal cells is also associated with alterations in synaptic inhibition. Polysynaptic inhibitory post-synaptic potentials (IPSPs) mediated by  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) receptors are significantly diminished in these cells after KA lesions (Franck and Schwartzkroin, 1985; Ashwood et al., 1986; Franck et al., 1988; Williams et al., 1993). This disinhibition could be partly explained by the selective loss of certain subtypes of inhibitory interneurons in CA1 stratum oriens (Best et al., 1993, 1994; Morin et al., 1998a; Smith and Dudek, 2001; Sanon et al., 2005; but see Davenport et al., 1990; Nakajima et al., 1991). A reduction in evoked excitatory drive of other interneurons in stratum lacunosum-moleculare could also contribute to the disinhibition (Morin et al., 1998b). Nonetheless, numerous aspects of GABAergic inhibition remain unchanged after KA treatment. Many interneurons are present and functional, the number of GABA<sub>A</sub> receptor binding sites does not decrease, CA1 pyramidal neurons remain responsive to exogenously applied GABA and direct stimulation of interneurons reveals unimpaired monosynaptic inhibition of pyramidal cells (Franck et al., 1988; Williams et al., 1993;

Morin et al., 1998b). Thus, a large part of the inhibitory circuitry of the CA1 area remains functionally intact in the KA-lesioned hippocampus, indicating that the alterations leading to impaired inhibition of pyramidal cells involve certain specific interneuron subtypes (Cossart et al., 2001).

The inhibitory circuitry in CA1 is composed of various subtypes of GABAergic interneurons, which can be differentiated morphologically by location of their soma and the pattern of their axonal and dendritic arborizations (Freund and Buzsaki, 1996). Given the modifications in the excitatory and inhibitory pathways in the hyperexcitable hippocampus, the aim of the present study was to determine if changes in the properties of the excitatory synaptic inputs onto interneurons (excitatory post-synaptic currents; EPSCs) could contribute to hyperexcitability in the CA1 area in the KA model of epilepsy (Franck and Schwartzkroin, 1985; Ashwood et al., 1986; Franck et al., 1988; Morin et al., 1998b). Whole-cell recordings were used to measure spontaneous and minimally evoked excitatory synaptic currents (sEPSCs and eEPSCs, respectively) in CA1 hippocampal interneurons in hyperexcitable slices from KA-treated rats as well as slices from untreated animals. Synaptic activity was examined in interneurons located in stratum oriens-alveus (O/A) and stratum radiatum (RAD) since these interneuron subtypes are differentially involved in feedback and feedforward inhibition, respectively (Blasco-Ibanez and Freund, 1995; Buzsaki, 1984; Lacaille et al., 1987; Lacaille and Schwartzkroin, 1988). Our results uncover cell type-specific changes in spontaneous and evoked synaptic activity in interneurons. Preliminary reports of this work have appeared in abstract form (Perez and Lacaille, 1997, 1998, 1999).

## 2. Methods

### 2.1. Kainate lesions

All animal experiments in the present study received the approval of the Animal Care and Use Committee at Université de Montréal. Procedures for KA lesions were as previously described (Perez et al., 1996). Adult male Sprague-Dawley rats (140–175 g, ~4–9-week-old; Charles River) were deeply anaesthetized with a ketamine-xylazine mixture (165 mg/kg,

10 mg/kg i.m.) and given atropine (0.27 mg/kg i.p.). Rats were positioned in a stereotaxic apparatus and 0.55–0.60  $\mu\text{g}$  KA in 1  $\mu\text{l}$  0.9% saline (pH 7.3–7.4) was injected into the right lateral ventricle using a 10  $\mu\text{l}$  Hamilton syringe. Injection site coordinates were 0.6 mm posterior to bregma, 2 mm lateral to the midline and 3.5 mm ventral to the dura (Paxinos and Watson, 1986). Injections were made over 30 min, with 0.2  $\mu\text{l}$  of KA solution injected every 5 min. The syringe was left in place for 10 min following the last injection before removal. Of the 65 animals injected, 59 animals developed overt signs of seizure activity under anesthesia (continuous vibration of whiskers and periodic jaw movements). Wounds were treated with a topical antibiotic and sutured. Animals were returned to their cages and were given food and water ad libitum for 2–4 weeks before electrophysiological recordings. Animals were not monitored for spontaneous seizures but KA lesions of CA3–CA4 pyramidal cells were histologically verified with Nissl staining in three rats as previously described (Morin et al., 1998b). In all other animals, electrophysiological criteria were used as evidence of KA lesions (see Section 2.3; Franck et al., 1988; Williams et al., 1993; Morin et al., 1998b).

### 2.2. Hippocampal slices

Hippocampal slices were obtained as described previously (Morin et al., 1998b) from rats lesioned with KA 2–4 weeks previously ( $n=59$ ) and sham-treated or age-matched (6–11-week-old) unoperated control rats ( $n=45$ ). Animals were deeply anaesthetized with halothane and decapitated. The brain was quickly removed from the skull and placed in cold (4°C) artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing (in mM) 124 NaCl, 5 KCl, 1.25  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 2  $\text{MgSO}_4$ , 2  $\text{CaCl}_2$ , 26  $\text{NaHCO}_3$  and 10 dextrose. A block of tissue containing the hippocampus was glued with cyanoacrylate to the tissue holder of a vibrating microtome (Vibroslice, Campden Instruments). Transverse slices (300  $\mu\text{m}$  thick) were cut from the middle third of the hippocampus of the right hemisphere and transferred to a container filled with oxygenated ACSF at room temperature. After a recovery period of 1 h, a slice was positioned and maintained submerged in a recording chamber. Slices were continuously perfused with oxygenated ACSF (2–4 ml/min) at room temperature (22–24°C). The recording chamber was mounted on

an upright microscope (Axioskop FS, Zeiss) equipped with a long-range water immersion objective (40 $\times$ ), Nomarski optics and an infrared video camera (Model 6500, Cohu). Under these conditions, various subtypes of interneurons located in different hippocampal layers were easily distinguishable upon visual inspection.

### 2.3. Field potential and whole-cell recordings

Since only a subset of slices of KA-lesioned hippocampi display hyperexcitability (Nakajima et al., 1991), slices from KA-treated animals were screened using evoked field potentials prior to whole-cell recording (Williams et al., 1993; Morin et al., 1998b). A fine monopolar or concentric bipolar tungsten microelectrode was used to stimulate CA1 afferent fibers in stratum radiatum with constant current pulses (50  $\mu\text{s}$ , 0.1–0.3 Hz, 0–1000  $\mu\text{A}$  in 100  $\mu\text{A}$  increments; Pulse-master A300, World Precision Instruments) delivered via a stimulus isolation unit (A360, World Precision Instruments). Field potentials were recorded with borosilicate patch electrodes (5–7  $\text{M}\Omega$ ; A-M Systems) filled with 2 M NaCl and placed in stratum pyramidale. Using a microsurgery knife, CA1 and CA3 regions were isolated in all slices by a cut to avoid the propagation of any possible epileptiform activity arising in CA3 (see Morin et al., 1998b). In slices of untreated rats, stimulation of stratum radiatum elicited a single population spike. Slices from KA-treated rats that displayed two or more population spikes were considered hyperexcitable (Ashwood and Wheal, 1986; Franck et al., 1988; Nakajima et al., 1991; Williams et al., 1993; Morin et al., 1998b) and were selected for whole-cell recordings. Slices from KA-treated rats that did not fulfill this criterion were excluded from the study.

Whole-cell voltage-clamp recordings were made from interneurons located in stratum oriens-alveus (O/A) and stratum radiatum (RAD). Patch electrodes (3–8  $\text{M}\Omega$ ) were filled with (in mM): 120 Cs-methane sulphonate, 20 lidocaine *N*-ethyl-bromide (QX-314), 0.06 spermine, 5 NaCl, 1  $\text{MgCl}_2$ , 10 HEPES, 2 ATP-Tris, 0.4 GTP-Tris, pH adjusted to 7.2 with CsOH. The Cs-methane sulphonate and QX-314 present in the intracellular solution improved the space clamp by blocking  $\text{K}^+$  and  $\text{Na}^+$  currents. Biocytin (0.1%) was also added to the recording solution to intracellularly label the cell and allow later morphological characterization. Spermine was not included in the

intracellular solution when NMDA receptor-mediated currents were recorded, and 2 mM QX-314 was used in experiments with minimal stimulation-evoked EPSCs.

Tight-seals ( $>1\text{ G}\Omega$ ) were formed on somata of selected interneurons and whole-cell recordings were obtained by rupturing the cell membrane with negative pressure. Voltage-clamp recordings were made using an Axopatch 1D or Multiclamp 700 A amplifier (Axon Instruments) and series resistance was not compensated. Data were low-pass filtered at 1 KHz (Model 900, Frequency Devices), displayed on an oscilloscope (Model 1604, Gould), and digitized at 22 KHz for storage on a video cassette recorder (Neuro-Corder DR-886, Neuro Data Instruments). Responses were also digitized at 20 kHz using a microcomputer and a data acquisition board (TL-1-125, Axon Instruments), and analyzed off-line using the software packages pClamp6, 8 and 9 (Axon Instruments) and N-Protected Mode (written by Dr. S.F. Traynelis, Emory University). Recordings were accepted if series resistance and capacitance could be properly compensated and if the holding current was stable. Resting membrane potential and input resistance were measured from each cell shortly after breaking in. Mean series resistance ( $\pm$ S.E.M.) was  $14.34 \pm 0.43\text{ M}\Omega$  ( $n = 80$ ). One cell was recorded per slice.

#### 2.4. Measurements of spontaneous EPSCs

Individual spontaneous EPSCs (sEPSCs) were identified visually over a 1.5 min period of recording. Events that could be clearly distinguished from noise, and that were not overlapping, were used to generate an average EPSC. To calculate the frequency of events, the onset time was noted for all events, including overlapping ones. The 10–90% rise time, amplitude and single exponential decay tau were measured on the average EPSCs for each cell. The rise time was calculated from regression over the points that fall within 10–90% of the peak amplitude and the fit of the regression line was inspected visually. Decay tau was estimated by fitting the decay phase using a single exponential algebraic function that iterated until convergence was reached; the resulting curves were inspected visually (Traynelis et al., 1993). The rectification ratio of NMDA receptor-mediated sEPSCs was calculated as the ratio of the isolated sEPSC amplitude at  $-30\text{ mV}$  over isolated sEPSC amplitude at  $+30\text{ mV}$ . The methods for acqui-

sition and analysis of sEPSCs were identical in cells from control and KA-treated animals, and the criteria for selecting spontaneous events (visual inspection of non-overlapping events clearly distinguishable from background noise) were also the same for both groups of cells. Noise level was more pronounced at depolarized holding potentials ( $+50\text{ mV}$ ), but this was similar in control and KA-treated animals (not shown).

#### 2.5. Measurement of EPSCs evoked by minimal stimulation

Synaptic responses were evoked in interneurons using constant current pulses ( $50\text{ }\mu\text{s}$ ) delivered through a bipolar  $\theta$ -glass electrode filled with ACSF and positioned  $100\text{ }\mu\text{m}$  lateral from recorded cell somata. Putative single-fiber EPSCs were evoked at 0.2 Hz using a minimal stimulation paradigm (Stevens and Wang, 1994; Raastad, 1995), as previously described (Perez et al., 2001). To reduce levels of spontaneous activity and polysynaptic activation in these experiments, we used ACSF containing elevated ( $4\text{ mM}$  each)  $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ . Analysis was performed on an average of at least 15 successfully evoked currents.

#### 2.6. Pharmacology

Bicuculline ( $10\text{ }\mu\text{M}$ ) was present throughout the experiments to block GABA<sub>A</sub> receptors and isolate EPSCs. Selective glutamate receptor antagonists were used to isolate different components of EPSCs: the amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA)/KA receptor antagonist 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX;  $20\text{ }\mu\text{M}$ ) was used to isolate NMDA receptor-mediated currents. The NMDA receptor antagonist ( $\pm$ )-2-amino-5-phosphonovalerate (AP5;  $100\text{ }\mu\text{M}$ ) was used to isolate non-NMDA receptor-mediated currents. Stock solutions of glutamate antagonists, prepared and stored frozen in 1 ml aliquots, were diluted each day to their final concentrations in the perfusion ACSF. All drugs were purchased from Sigma.

#### 2.7. Statistical analysis

Differences between cells in control slices and in hyperexcitable slices from KA-treated animals were analyzed using two-way repeated measures analy-

ses of variance (RMANOVAs) followed by post hoc Student–Newman–Keuls tests (SNK). For simple comparisons between two groups (e.g. Fig. 4B), Student's *t*-tests were used. Significance levels were set at  $P < 0.05$ . All data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (S.E.M.) and asterisks indicate significant differences.

### 2.8. Histology

At the end of experiments, hippocampal slices were removed from the recording chamber and placed overnight in fixative solution consisting of 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB; pH 7.4). Slices were rinsed in PB and kept at 4°C. To improve visualization of biocytin filled axons, slices were embedded in 1% agarose and serially cut into 60  $\mu$ m thick sections using a vibratome (Vibratome Series 1000, Technical Products International). Endogenous peroxidase activity was eliminated by exposing sections to 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 20 min followed by rinsing in 0.1 M phosphate buffered saline (PBS; 0.9% NaCl; 4  $\times$  5 min). Sections were then exposed to 2.5% dimethylsulfoxide (DMSO) and 0.1% Triton-X-100 in PBS (4  $\times$  5 min), and were incubated for 24 h in avidin–biotin complex (ABC kit) diluted 1:200 in the previous solution. Slices were then rinsed in Tris buffer (0.05 M, pH 7.6) and the reaction product was visualized by adding 0.001% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to a solution containing 0.05% 3',3'-diaminobenzidine (DAB), 0.02% nickel sulfate, and 0.1 M imidazole in Tris buffer. After thoroughly rinsing the sections in Tris-buffered saline, they were air-dried, cleared in xylene and mounted in D.P.X. for light microscopy.

## 3. Results

### 3.1. Whole-cell recordings and membrane properties of interneurons

Cells were visually identified with infrared video microscopy in slices of control animals and in hyperexcitable slices of KA-treated rats (two to five extracellular population spikes). Interneurons were selected based on the location and morphology of their somata and primary dendrites. Whole-cell recordings were made from interneurons in O/A ( $n = 26$  in control

and 25 in KA groups) and RAD ( $n = 25$  in control and 24 in KA groups). The basic membrane properties of O/A and RAD interneurons were not different in slices of control and KA-treated rats, nor were they different in O/A and RAD interneurons within the control and KA groups. Since the patch pipette solution contained Cs<sup>+</sup> and QX-314 to intracellularly block K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> conductances, values for resting membrane potential and input resistance were affected accordingly. The mean resting membrane potential and input resistance of O/A interneurons were  $-41.0 \pm 2.6$  mV and  $418.6 \pm 65.0$  M $\Omega$  in the control group and  $-35.8 \pm 1.9$  mV and  $428.3 \pm 62.0$  M $\Omega$  in the KA group. The mean resting membrane potential and input resistance of RAD interneurons were  $-35.5 \pm 1.6$  mV and  $475.2 \pm 37.1$  M $\Omega$  in the control group and  $-36.7 \pm 2.0$  mV and  $444.6 \pm 45.4$  M $\Omega$  in the KA group.

### 3.2. Spontaneous EPSCs in O/A interneurons

To examine whether spontaneous excitatory drive was altered in interneurons of hyperexcitable slices of KA-treated rats, sEPSCs were recorded in voltage-clamp mode with O/A cells held at  $-70$  mV, in ACSF containing bicuculline. In cells from control slices, sEPSCs were inward with a fast rise time and decay (Fig. 1A). In hyperexcitable slices, the mean frequency and amplitude of sEPSCs were not significantly different from those in control slices (Fig. 1C;  $n = 16$  in control versus 12 in KA), but their kinetics were significantly slower (Fig. 1B and C). Spontaneous EPSCs had an increased mean rise time (225% of control) and a longer decay tau (220% of control) after KA treatment.

### 3.3. Spontaneous EPSCs in RAD interneurons

To examine if the changes seen after KA treatment in the spontaneous excitatory drive of interneurons were specific to certain cell-types, sEPSCs were similarly examined in RAD interneurons. In RAD cells held at  $-70$  mV, the currents were inward with a fast rise time and decay (Fig. 2A). Spontaneous EPSCs in RAD interneurons were not different in hyperexcitable slices of KA-treated rats ( $n = 12$ ) and control slices ( $n = 12$ ; Fig. 2B). No significant differences were detected in the mean frequency, amplitude or kinetics (rise time and decay tau) of sEPSCs (Fig. 2C).

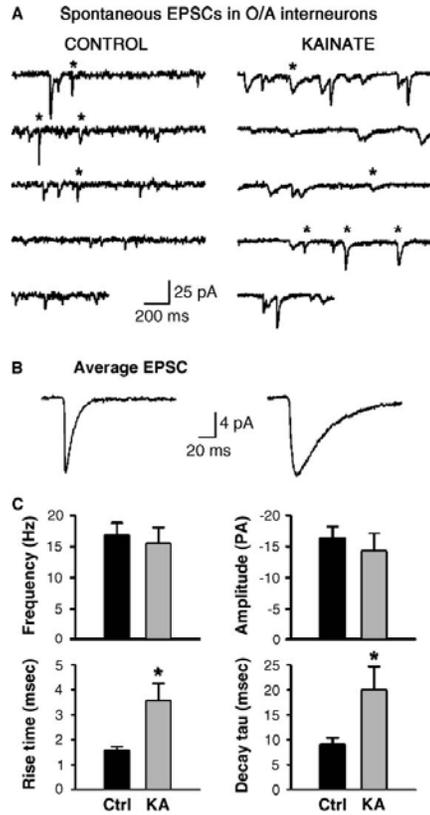


Fig. 1. Changes in the kinetics of spontaneous EPSCs (sEPSCs) of oriens/alveus (O/A) interneurons in hyperexcitable slices after kainic acid (KA) treatment. (A) sEPSCs recorded at  $-70$  mV in O/A interneurons of control (left) and KA-treated (right) rats are displayed over a period of 7.5 s. (B) Corresponding examples of average sEPSCs recorded from O/A interneurons in a control and KA-treated rat, showing the slower kinetics after KA treatment. All non-overlapping events distinguishable from noise (e.g. those indicated by asterisks in 'A') recorded during a 1.5 min period were used for calculation of the average sEPSCs. (C) Summary bar graphs of mean values of sEPSC kinetics and frequency for all cells in control (black bars) and KA-treated rats (gray bars). The rise time and decay tau were significantly larger after KA treatment indicating that spontaneous currents were slower.

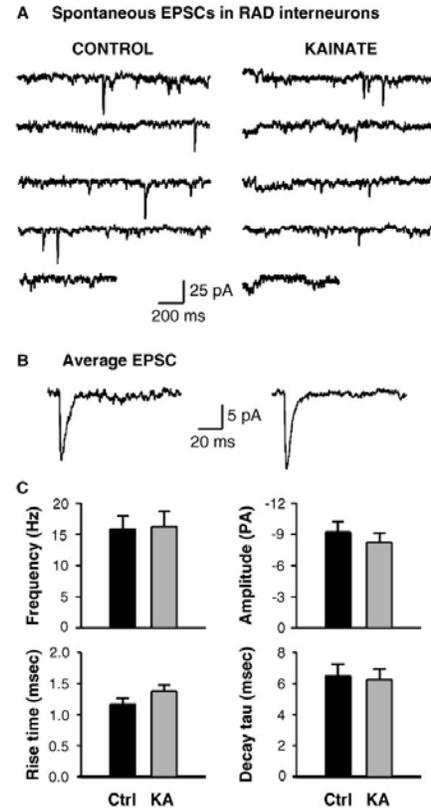


Fig. 2. Properties of sEPSCs in radiatum (RAD) interneurons are unchanged after KA treatment. (A) sEPSCs recorded at  $-70$  mV in RAD interneurons of control and KA-treated rats are displayed over a period of 7.5 s. (B) Corresponding examples of average sEPSCs recorded from RAD interneurons showing comparable properties in control (left) and KA-treated (right) rats. (C) Summary bar graphs of mean values of sEPSC kinetics and frequency for all cells. No significant changes were observed after KA treatment.

3.4. Altered NMDA sEPSCs in hyperexcitable slices

Because the decay kinetics of sEPSCs were significantly slower in O/A interneurons of hyperexcitable slices, the non-NMDA and NMDA receptor-mediated

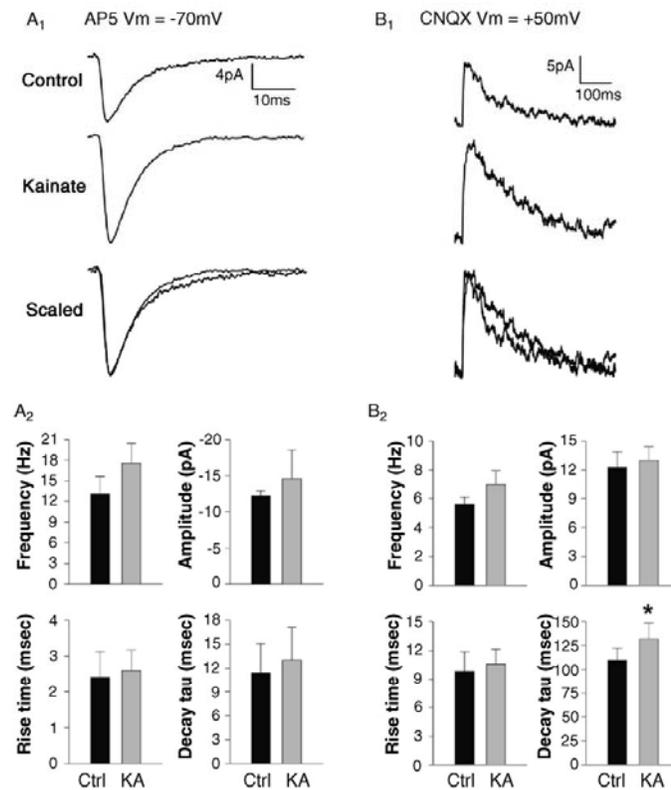


Fig. 3. Intact non-NMDA and altered NMDA sEPSCs in hyperexcitable slices. (A<sub>1</sub> and B<sub>1</sub>) Examples of average non-NMDA sEPSCs at  $-70$  mV (A<sub>1</sub>) and average NMDA sEPSCs at  $+50$  mV (B<sub>1</sub>) recorded in O/A interneurons from a control (top trace) and a KA-treated rat (middle trace). The average control and KA traces are scaled to the same amplitude and overlapped (bottom trace) illustrating a change in decay of NMDA sEPSCs (B<sub>1</sub>) but no change in the non-NMDA sEPSCs (A<sub>1</sub>). (A<sub>2</sub> and B<sub>2</sub>) Summary bar graphs of mean values of sEPSC kinetics and frequency for all cells in control (black bars) and KA-treated rats (gray bars). Only the decay tau of NMDA sEPSCs recorded in the presence of CNQX were significantly larger after KA treatment.

components of synaptic currents were examined individually in these cells. Non-NMDA receptor-mediated sEPSCs, isolated in  $100 \mu\text{M}$  AP5 and measured at  $-70$  mV, were not altered by KA treatment (Fig. 3A<sub>1</sub>;  $n = 7$  in control and 10 in KA groups); the mean frequency, amplitude, rise time and decay tau were not significantly different in control and hyperexcitable slices (Fig. 3A<sub>2</sub>).

NMDA receptor-mediated sEPSCs were isolated in the presence of  $20 \mu\text{M}$  CNQX and measured at  $+50$  mV. The decay phase of these currents was signif-

icantly slower in interneurons of hyperexcitable slices (Fig. 3B<sub>1</sub>). After KA treatment, the mean decay tau of NMDA receptor-mediated sEPSCs was increased (120% of control) while all other parameters were not significantly changed ( $n = 5$  in control and 7 in KA groups) (Fig. 3B<sub>2</sub>).

To further investigate the properties of spontaneous NMDA receptor-mediated currents, the current–voltage ( $I/V$ ) relationship was assessed from average sEPSCs. In slices from both control and KA-treated animals, the  $I/V$  curve consisted of a linear

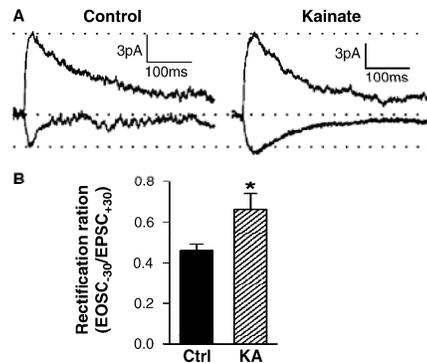


Fig. 4. Modification in the voltage dependency of NMDA sEPSCs in hyperexcitable slices. (A) Examples of superimposed NMDA average sEPSCs at +30 mV (outward) and -30 mV (inward) in O/A interneurons of control and KA-treated rats. Outward currents at +30 mV were scaled to the same amplitude to show that currents at -30 mV are proportionately larger in amplitude after KA treatment. (B) Summary histogram of the rectification ratio of NMDA sEPSC (-30 mV/+30 mV). After KA treatment, the rectification ratio was significantly larger than in control interneurons (black bar) suggesting a decrease in the rectification due to the  $Mg^{2+}$  block of NMDA currents.

component at positive potentials and a non-linear component at negative potentials as expected with rectification due to a voltage dependent  $Mg^{2+}$  block (not shown). To examine the rectification properties of NMDA receptor-mediated sEPSCs after KA treatment, the mean rectification ratio (sEPSC amplitude at -30 mV/sEPSC amplitude at +30 mV) was calculated for each group (Fig. 4A). The rectification ratio was significantly larger in hyperexcitable slices of KA-treated rats (143% of control, Student's *t*-test), suggesting a modification in the voltage-dependent properties of NMDA-mediated current after KA treatment (Fig. 4B), in addition to the change in decay kinetics observed at +50 mV (Fig. 3).

### 3.5. EPSCs evoked by minimal stimulation

In order to find out whether synaptically evoked EPSCs (eEPSCs) were also differentially affected in O/A and RAD interneurons of hyperexcitable slices, we recorded minimally evoked responses in cells from control and KA-treated rats. At -70 mV, eEPSCs in

O/A interneurons had comparable amplitude in control and kainate groups ( $n=8$  and 7 cells, respectively). However, rise and decay times were significantly slower in kainate-treated animals (Fig. 5A). In contrast, the amplitude and kinetics of eEPSCs in RAD interneurons were not significantly different in kainate and control groups (Fig. 5B;  $n=6$  cells in each group). Thus, similar cell type-specific changes in kinetics are found for EPSCs evoked by minimal stimulation and spontaneous EPSCs after KA treatment.

### 3.6. Morphology of biocytin-filled interneurons

All cells selected for whole-cell recordings were filled with biocytin to examine their morphology and they were all confirmed as interneurons in O/A or RAD. Although a detailed anatomical analysis was not performed, cells were morphologically heterogeneous and no obvious or consistent difference was seen in the overall axonal or dendritic arborization pattern between control and KA-treated rats (Fig. 6). Indeed, this may not be surprising since the visual criteria used to select cells for recordings were similar in control and KA-treated rats.

## 4. Discussion

The major finding of the present study is a cell type-specific change in excitatory synaptic activity after KA treatment. The frequency of sEPSCs, as well as the amplitude of sEPSCs and eEPSCs were unaffected after KA treatment, but the kinetics were slower in O/A inhibitory interneurons. In contrast, properties of spontaneous and evoked EPSCs were unaltered in RAD interneurons. The changes in kinetics in O/A cells were associated with modified rectification of the NMDA receptor-mediated component of the EPSCs. These results suggest a functional reorganization of excitatory input onto interneurons which differentially affects specific interneuron cell types.

### 4.1. Excitatory drive is not reduced in O/A and RAD interneurons

We found that the hippocampal CA1 hyperexcitability, observed 2–4 weeks after KA treatment, was not associated with a decrease in spontaneous excita-

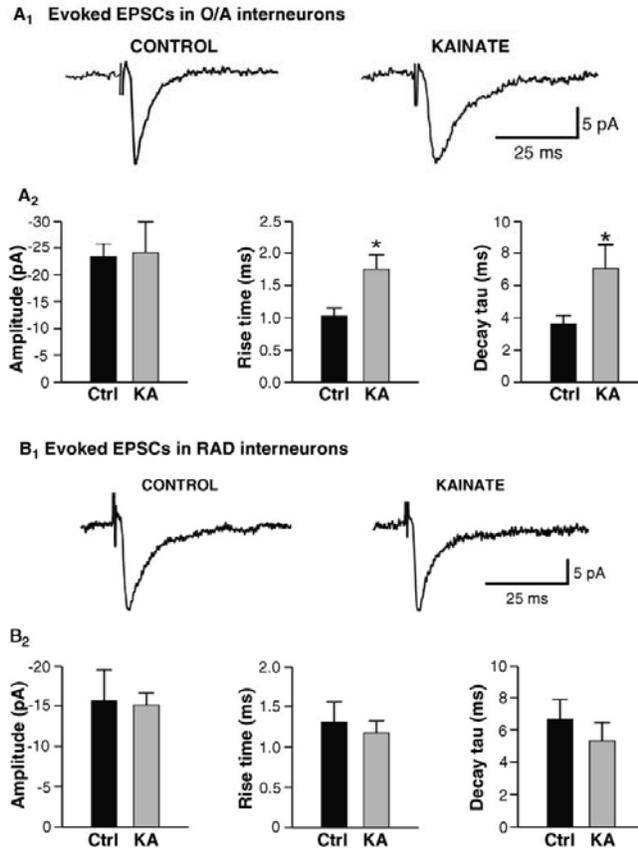


Fig. 5. Alterations in EPSCs evoked by minimal stimulation (eEPSCs) in O/A but not RAD interneurons of hyperexcitable slices. (A<sub>1</sub> and B<sub>1</sub>) Examples of average eEPSCs recorded at  $-70$  mV in O/A (A<sub>1</sub>) and RAD (B<sub>1</sub>) interneurons of control and KA-treated rats. (A<sub>2</sub> and B<sub>2</sub>) Summary histograms of mean values of eEPSC amplitude and kinetics. Evoked EPSCs of O/A interneurons demonstrated significant changes in rise and decay times (A<sub>2</sub>), whereas no significant changes were observed in RAD interneurons (B<sub>2</sub>) after KA treatment.

tory synaptic activity in O/A and RAD interneurons. The frequency and amplitude of sEPSCs remained unchanged in both types of interneurons, demonstrating that, in hyperexcitable slices, normal levels of spontaneous excitatory activity were maintained in these cells. These results are consistent with the lack of change in the amplitude of minimally evoked EPSCs observed here and the unchanged evoked compound EPSCs previously reported by Morin et al. (1998b) in O/A interneurons. Our results with RAD interneurons, however, are not consistent with the reported decrease

in amplitude and conductance of compound EPSCs in RAD interneurons (Morin et al., 1998b). These differences in results might be explained by the different stimulation paradigm (minimal versus multi-fiber stimulation) in the two studies. The unaltered frequency of spontaneous EPSCs in oriens interneurons in the present study is consistent with the previous report at longer intervals (1–24 months) post-KA and pilocarpine treatment (Cossart et al., 2001). It appears at odds, however, with the increased frequency of spontaneous excitatory activity reported in RAD interneu-

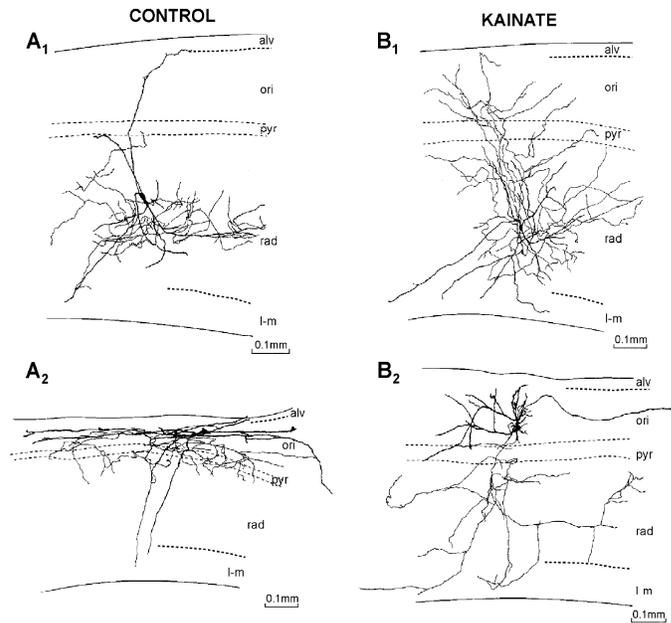


Fig. 6. Morphological identification of interneurons. (A<sub>1</sub> and B<sub>1</sub>) Examples of biocytin-filled interneuron subtypes with somata located in stratum radiatum. (A<sub>2</sub> and B<sub>2</sub>) Examples of interneurons with somata located in stratum oriens/alveus. Cells in 'A' are from control animals and in 'B' from KA-treated rats.

rons at longer intervals (1–24 months) post-KA or pilocarpine treatment (Cossart et al., 2001). In that study, the frequency of spontaneous EPSCs was much lower in RAD interneurons of control animals than reported here (approximately 1 Hz versus 10–15 Hz in the present study), suggesting that different subtypes of RAD interneurons may have been examined in the two studies. The difference in results may also be due to the different time point of analysis or model-dependent changes.

Our observations suggest that KA-resistant interneurons in O/A and RAD are not functionally disconnected from excitatory inputs. It thus seems that the disinhibition of CA1 pyramidal cells contributing to the initial stages of epileptogenesis (2–4 weeks post-KA treatment; Williams et al., 1993) may not be due to a reduction of the spontaneous excitatory drive on interneurons (Sloviter, 1987, 1991; Bekenstein

and Lothman, 1993). In this context, our results are consistent with other evidence that interneurons in area CA1 are not disconnected from their excitatory afferents in the KA (Bernard et al., 1998) and continuous stimulation (Rempe et al., 1997) models of temporal lobe epilepsy. One could even have expected an increased glutamatergic drive on O/A interneurons, given the sprouting of CA1 pyramidal cell axons after KA treatment (Perez et al., 1996). Although CA1 pyramidal cells typically provide strong input to oriens interneurons, the newly formed collaterals might be involved in recurrent excitation of other pyramidal cells (Shao and Dudek, 2004) more than of interneurons. This would be consistent with the expected extensive de-afferentation of CA1 pyramidal cells, but not O/A interneurons (Blasco-Ibanez and Freund, 1995), due to CA3 pyramidal cell loss after KA treatment. It is interesting to note that a loss

of specific O/A interneuron subtypes projecting to pyramidal cell dendrites, coupled with an intact spontaneous excitatory drive in other O/A interneurons that are KA-resistant and also project to pyramidal cell dendrites, would be coherent with the decrease in spontaneous dendritic inhibitory activity observed in pyramidal cells at 1–24 months post-treatment (Cossart et al., 2001).

#### 4.2. NMDA receptor-mediated currents are increased in O/A interneurons

The changes in synaptic activity found specifically in O/A interneurons suggest an increased excitatory drive in these cells. O/A interneurons of KA-treated rats showed prolonged rise and decay times of spontaneous and evoked EPSCs. Similar changes have been reported in the hyperexcitable dentate gyrus after status epilepticus, where the rise and decay times of hilar border interneurons sEPSCs were prolonged without any alteration of amplitude or frequency (Doherty and Dingledine, 2001).

Pharmacological isolation of non-NMDA and NMDA receptor-mediated responses indicated that these modifications were associated with changes in the NMDA receptor-dependent component of EPSCs. First, isolated NMDA receptor-mediated sEPSCs were found to have a prolonged decay time. Second, the rectification of NMDA receptor-mediated sEPSCs was decreased at  $-30$  mV suggesting an alteration in the voltage-dependent properties of NMDA receptor-mediated EPSCs. Overall, these results demonstrate an enhancement of the NMDA receptor-mediated EPSCs in O/A interneurons. Given the slow decay kinetics of NMDA receptor-mediated responses (Collingridge et al., 1988; Nicoll et al., 1992), this may lead to a change in temporal integration of post-synaptic potentials after KA treatment. It would be interesting in future studies to examine in more details the altered properties of the isolated NMDA component. Possible mechanisms could include changes in subunit expression (Monyer et al., 1994; Tang et al., 1999; Misra et al., 2000) and/or altered glutamate transporter function (Simantov et al., 1999; Overstreet et al., 1999, but also see Sarantis et al., 1993).

It is unclear how the change in rectification and decay kinetics of NMDA responses might relate to a slower rise time of EPSCs, suggesting that perhaps

other changes occur at these synapses. Rise time should be determined by the fast component of the current (i.e. non-NMDA) but, paradoxically, we showed that this component does not change. It could be argued that slower rise time (and decay time) is due to filtering of more distally located synapses in KA-treated animals (Biró et al., 2005). However, this would be expected to affect the kinetics of both AMPA/kainate and NMDA components alike, and we found that isolated non-NMDA currents did not change. Alternatively, there could be, in KA animals, pure slow events (i.e. NMDA). This is also unlikely since the addition of pure NMDA receptor-mediated events, without a change in non-NMDA receptor-mediated events (Fig. 3), should result in changes in either sEPSC amplitude or frequency; but we observed no such change. Hence, the nature of the changes responsible for the slower rise time of EPSCs after KA treatment remains to be clarified.

The modification of the NMDA component of EPSCs observed in O/A interneurons parallels some of the changes seen in CA1 pyramidal cells after KA treatment. Namely, the  $Mg^{2+}$  blockade of NMDA receptor channels is reduced (Chen et al., 1999) and the NMDA receptor-mediated component of EPSPs is increased in CA1 pyramidal cells of KA-treated rats, resulting in burst discharges (Ashwood and Wheal, 1986, 1987; Herron et al., 1985; Turner and Wheal, 1991; Williams et al., 1993; Smith and Dudek, 2001). Recurrent excitation seems to be involved in this bursting activity since antidromic stimulation of CA1 pyramidal cell axons evokes epileptiform burst responses, which disappear when synaptic transmission is blocked (Franck et al., 1988). Because synaptic responses from recurrent collaterals are NMDA receptor-mediated (Thomson and Radpour, 1991), the sprouting of recurrent collaterals of CA1 pyramidal cells after KA treatment (Perez et al., 1996; Esclapez et al., 1999) may result in a synaptic reorganization on both pyramidal cells and O/A interneurons, and may lead to an increase in their NMDA receptor-mediated synaptic excitation.

#### 4.3. Functional implications of interneuron-selective changes

Overall, our results show cell type-specific changes in the excitatory activity of inhibitory interneurons

2–4 weeks after intraventricular KA injections. These changes affect O/A and RAD interneurons differently and do not appear to contribute to the disinhibition of CA1 pyramidal cells. Although we have not examined if such changes are absent in non-hyperexcitable slices of KA-treated animals, this would need to be addressed in future studies to unequivocally associate the observed changes with slice hyperexcitability. Nevertheless, the hyperexcitability may thus arise from complex changes within the CA1 inhibitory circuit. The loss of CA3 pyramidal cells after KA treatment results in partial de-afferentation of CA1 pyramidal neurons, whereas the loss of specific interneurons in O/A likely contribute to a decrease in feedback inhibition of pyramidal cells (Best et al., 1993, 1994; Morin et al., 1998a; Smith and Dudek, 2001; Cossart et al., 2001). However, the sprouting of axonal collaterals of CA1 pyramidal cells after KA treatment (Perez et al., 1996; Esclapez et al., 1999) may be associated with an increased NMDA component of EPSCs in O/A interneurons. Thus, synaptic reorganization of inputs onto KA-resistant O/A interneurons may compensate for the loss of other interneurons. However, it is likely that these changes do not restore feedback inhibition to normal levels (Cossart et al., 2001). In RAD interneurons, the maintenance of spontaneous excitatory drive might also be a result of compensatory mechanisms, for example an increased input from a different afferent pathway (e.g. temporo-ammonic pathway) (Cossart et al., 2001), since these cells likely lose part of their normal CA3 afferent projections (Buzsáki, 1984) after KA treatment.

The development of epileptiform activity after KA treatment progresses over time (Nadler et al., 1980b; Franck and Schwartzkroin, 1985; Franck et al., 1988; Smith and Dudek, 2001). The changes observed in the present study could possibly proceed further and also result in an increased frequency of spontaneous excitatory activity at later time points after KA treatment (Cossart et al., 2001). Although the observed changes in excitatory activity after KA appear consistent with unimpaired inhibition, the possibility remains that enhanced excitatory activity in interneurons involved in feedback inhibition may result in the hypersynchronization of CA1 pyramidal cells, and thus contribute to epileptiform discharges (Wong et al., 1986).

## Acknowledgments

Supported by the Canadian Institutes for Health Research (J.-C.L.), the Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (J.-C.L. and Y.P.), the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (J.-C.L.), and the Savoy Foundation (Y.P., S.R., N.S.). J.C.L. is the recipient of the Canada Research Chair in Cellular and Molecular Neurophysiology. We thank L. Topolnik for help with some experiments and comments on the manuscript.

## References

- Ashwood, T.J., Lancaster, B., Wheal, H.V., 1986. Intracellular electrophysiology of CA1 pyramidal neurons in slices of kainic acid-lesioned hippocampus of the rat. *Exp. Brain Res.* 62, 189–198.
- Ashwood, T.J., Wheal, H.V., 1986. Extracellular studies on the role of *N*-methyl-D-aspartate receptors in epileptiform activity recorded from the kainic acid-lesioned hippocampus. *Neurosci. Lett.* 67, 147–152.
- Ashwood, T.J., Wheal, H.V., 1987. The expression of *N*-methyl-D-aspartate-receptor-mediated component during epileptiform synaptic activity in the hippocampus. *Br. J. Pharmacol.* 91, 815–822.
- Bekenstein, J.W., Lothman, E.W., 1993. Dormancy of inhibitory interneurons in a model of temporal lobe epilepsy. *Science* 259, 97–100.
- Ben-Ari, Y., 1985. Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 14, 375–403.
- Ben-Ari, Y., Tremblay, E., Riche, D., Ghilini, G., Naquet, R., 1981. Electrographic, clinical and pathological alterations following systemic administration of kainic acid, bicuculline or pentazocine: metabolic mapping using the deoxyglucose method with special reference to the pathology of epilepsy. *Neuroscience* 6, 1361–1391.
- Bernard, C., Esclapez, M., Hirsch, J.C., Ben-Ari, Y., 1998. Interneurons are not so dormant in temporal lobe epilepsy: a critical reappraisal of the dormant basket cell hypothesis. *Epilepsy Res.* 32, 93–103.
- Best, N., Mitchell, J., Baimbridge, K.G., Wheal, H.V., 1993. Changes in parvalbumin-immunoreactive neurons in the rat hippocampus following a kainic acid lesion. *Neurosci. Lett.* 155, 1–6.
- Best, N., Mitchell, J., Wheal, H.V., 1994. Ultrastructure of parvalbumin-immunoreactive neurons in the CA1 area of the rat hippocampus following a kainic acid injection. *Acta Neuropathol.* 87, 187–195.
- Biró, A.A., Holderith, N.B., Nusser, Z., 2005. Quantal size is independent of the release probability at hippocampal excitatory synapses. *J. Neurosci.* 25, 223–232.
- Blasco-Ibanez, J.M., Freund, T.F., 1995. Synaptic input of horizontal interneurons in stratum oriens of the hippocampal CA1 sub-

- field: structural basis of feed-back activation. *Eur. J. Neurosci.* 7, 2170–2180.
- Buzsáki, G., 1984. Feed-forward inhibition in the hippocampal formation. *Prog. Neurobiol.* 22, 131–153.
- Chen, Y., Chad, J.E., Cannon, R.C., Wheal, H.V., 1999. Reduced  $Mg^{2+}$  blockade of synaptically activated *N*-methyl-D-aspartate receptor-channels in CA1 pyramidal neurons in kainic acid-lesioned rat hippocampus. *Neuroscience* 88, 727–739.
- Collingridge, G.L., Herron, C.E., Lester, R.A., 1988. Frequency-dependent *N*-methyl-D-aspartate receptor-mediated synaptic transmission in rat hippocampus. *J. Physiol.* 399, 301–312.
- Cossart, R., Dincourt, C., Hirsch, J.C., Merchan-Perez, A., DeFelipe, J., Ben-Ari, Y., Esclapez, M., Bernard, C., 2001. Dendritic but not somatic GABAergic inhibition is decreased in experimental epilepsy. *Nat. Neurosci.* 4, 52–62.
- Davenport, C.J., Brown, W.J., Babb, T.L., 1990. GABAergic neurons are spared after intrahippocampal kainate in the rat. *Epilepsy Res.* 5, 28–42.
- Doherty, J., Dingledine, R., 2001. Reduced excitatory drive onto interneurons in the dentate gyrus after status epilepticus. *J. Neurosci.* 21, 2048–2057.
- Esclapez, M., Hirsch, J.C., Khazipov, R., Ben-Ari, Y., Bernard, C., 1999. Newly formed excitatory pathways provide a substrate for hyperexcitability in experimental temporal lobe epilepsy. *J. Comp. Neurol.* 408, 449–460.
- Franck, J.E., Kunkel, D.D., Baskin, D.G., Schwartzkroin, P.A., 1988. Inhibition in kainate-lesioned hyperexcitable hippocampi: physiologic, autoradiographic and immunocytochemical observations. *J. Neurosci.* 8, 1991–2002.
- Franck, J.E., Schwartzkroin, P.A., 1985. Do kainate lesioned hippocampi become epileptogenic? *Brain Res.* 389, 309–313.
- Freund, T.F., Buzsáki, G., 1996. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6, 347–470.
- Herron, C.E., Williamson, R., Collingridge, G.L., 1985. A selective *N*-methyl-D-aspartate antagonist depresses epileptiform activity in rat hippocampal slices. *Neurosci. Lett.* 61, 225–260.
- Lacaille, J.-C., Mueller, A., Kunkel, D.D., Schwartzkroin, P.A., 1987. Local circuit interactions between oriens/alveus interneurons and CA1 pyramidal cells in hippocampal slices: electrophysiology and morphology. *J. Neurosci.* 7, 1979–1993.
- Lacaille, J.-C., Schwartzkroin, P.A., 1988. Stratum lacunosum-moleculare interneurons of hippocampal CA1 region. II. Intracellular and intradendritic recordings of local circuit synaptic interactions. *J. Neurosci.* 8, 1411–1424.
- Lancaster, B., Wheal, H.V., 1984. Chronic failure of inhibition of the CA1 area of the hippocampus following kainic acid lesions of the CA3/CA4 area. *Brain Res.* 295, 317–324.
- Misra, C., Brickley, S.G., Wyllie, D.J., Cull-Candy, S.G., 2000. Slow deactivation kinetics of NMDA receptors containing NR1 and NR2D subunits in rat cerebellar Purkinje cells. *J. Physiol.* 525 Pt 2, 299–305.
- Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D.J., Sakmann, B., Seeburg, P.H., 1994. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12 (3), 529–540.
- Morin, F., Beaulieu, C., Lacaille, J.-C., 1998a. Selective loss of GABA neurons in area CA1 of the rat hippocampus after intraventricular kainate. *Epilepsy Res.* 32, 363–369.
- Morin, F., Beaulieu, C., Lacaille, J.-C., 1998b. Cell-specific alterations in synaptic properties of hippocampal CA1 interneurons after kainate treatment. *J. Neurophysiol.* 80, 2836–2847.
- Nadler, J.V., 1981. Kainic acid as a tool for the study of temporal lobe epilepsy. *Life Sci.* 29, 2031–2042.
- Nadler, J.V., Perry, B.W., Gentry, C., Cotman, C.W., 1980a. Degeneration of hippocampal CA3 pyramidal cells induced by intraventricular kainic acid. *J. Comp. Neurol.* 192, 333–359.
- Nadler, J.V., Perry, B.W., Gentry, C., Cotman, C.W., 1980b. Loss and reacquisition of hippocampal synapses after selective destruction of CA3–CA4 afferents with kainic acid. *Brain Res.* 191, 387–403.
- Nakajima, S., Franck, J.E., Bilkey, D., Schwartzkroin, P.A., 1991. Local circuit synaptic interactions between CA1 pyramidal cells and interneurons in the kainate-lesioned hyperexcitable hippocampus. *Hippocampus* 1, 67–78.
- Nicoll, A., Larkman, A., Blakemore, C., 1992. EPSPs in rat neocortical pyramidal neurons in vitro are prolonged by NMDA receptor-mediated currents. *Neurosci. Lett.* 143, 5–9.
- Overstreet, L.S., Kinney, G.A., Liu, Y.B., Billups, D., Slater, N.T., 1999. Glutamate transporters contribute to the time course of synaptic transmission in cerebellar granule cells. *J. Neurosci.* 19 (21), 9663–9673.
- Paxinos, G., Watson, C., 1986. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, New York.
- Perez, Y., Lacaille, J.-C., 1997. Spontaneous excitatory postsynaptic currents in hippocampal CA1 interneurons in the kainate model of epilepsy. *Soc. Neurosci. Abstr.* 23, 2153.
- Perez, Y., Lacaille, J.-C., 1998. AMPA- and NMDA-receptor mediated spontaneous EPSCs in hippocampal CA1 interneurons in the kainate model of epilepsy. *Soc. Neurosci. Abstr.* 24, 2141.
- Perez, Y., Lacaille, J.-C., 1999. Spontaneous excitatory currents in hippocampal inhibitory interneurons persist in hyperexcitable slices after kainate treatment. *Epilepsia* 40 (Suppl. 7), 20–21.
- Perez, Y., Morin, F., Beaulieu, C., Lacaille, J.-C., 1996. Axonal sprouting of CA1 pyramidal cells in hyperexcitable hippocampal slices of kainate treated rats. *Eur. J. Neurosci.* 8, 736–748.
- Perez, Y., Morin, F., Lacaille, J.-C., 2001. A hebbian form of long-term potentiation dependent on mGluR1a in hippocampal inhibitory interneurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 9401–9406.
- Raastad, M., 1995. Extracellular activation of unitary excitatory synapses between hippocampal CA3 and CA1 pyramidal cells. *Eur. J. Neurosci.* 7, 1882–1888.
- Rempe, D.A., Bertram, E.H., Williamson, J.M., Lothman, E.W., 1997. Interneurons in area CA1 stratum radiatum and stratum oriens remain functionally connected to excitatory synaptic input in chronically epileptic animals. *J. Neurophysiol.* 78, 1504–1515.
- Sanon, N., Carmant, L., Emond, M., Congar, P., Lacaille, J.C., 2005. Short-term effects of kainic acid on CA1 hippocampal interneurons differentially vulnerable to excitotoxicity. *Epilepsia* 46, 837–848.
- Sarantis, M., Ballerini, L., Miller, B., Silver, R.A., Edwards, M., Attwell, D., 1993. Glutamate uptake from the synaptic cleft does

- not shape the decay of the non-NMDA component of the synaptic current. *Neuron* 11 (3), 541–549.
- Shao, L.R., Dudek, F.E., 2004. Increased excitatory synaptic activity and local connectivity of hippocampal CA1 pyramidal cells in rats with kainate-induced epilepsy. *J. Neurophysiol.* 92, 1366–1373.
- Simantov, R., Crispino, M., Hoe, W., Broutman, G., Tocco, G., Rothstein, J.D., Baudry, M., 1999. Changes in expression of neuronal and glial glutamate transporters in rat hippocampus following kainate-induced seizure activity. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 65 (1), 112–123.
- Sloviter, R.S., 1987. Decreased hippocampal inhibition and a selective loss of interneurons in experimental epilepsy. *Science* 235, 73–76.
- Sloviter, R.S., 1991. Permanently altered structure, excitability, and inhibition after experimental status epilepticus in the rat: the “dormant basket cell” hypothesis and its possible relevance to temporal lobe epilepsy. *Hippocampus* 1, 41–66.
- Smith, B.N., Dudek, F.E., 2001. Short- and long-term changes in CA1 network excitability after kainate treatment in rats. *J. Neurophysiol.* 85, 1–9.
- Stevens, C.F., Wang, Y., 1994. Changes in reliability of synaptic function as a mechanism for plasticity. *Nature* 371, 704–707.
- Tang, Y.P., Shimizu, E., Dube, G.R., Rampon, C., Kerchner, G.A., Zhuo, M., Liu, G., Tsien, J.Z., 1999. Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature* 401 (6748), 63–69.
- Thomson, A.L., Radpour, S., 1991. Excitatory connections between CA1 pyramidal cells revealed by action potential triggered averaging in slices of rat hippocampus are partially NMDA receptor mediated. *Eur. J. Neurosci.* 3, 587–601.
- Traynelis, S.F., Silver, R.A., Cull-Candy, S.G., 1993. Estimated conductance of glutamate receptor channels activated during EPSCs at the cerebellar mossy fiber-granule cell synapse. *Neuron* 11, 279–289.
- Turner, D.A., Wheal, H.V., 1991. Excitatory synaptic potentials in kainic-acid denervated rat CA1 pyramidal neurons. *J. Neurosci.* 11, 2786–2794.
- Williams, S., Vachon, P., Lacaille, J.-C., 1993. Monosynaptic GABA-mediated inhibitory postsynaptic potentials in CA1 pyramidal cells of hyperexcitable hippocampal slices from kainic acid-treated rats. *Neuroscience* 52, 541–554.
- Wong, R.K.S., Traub, R.D., Miles, R., 1986. Cellular basis of neuronal synchrony in epilepsy. *Adv. Neurol.* 44, 583–592.

## Annexe II

### Liste des coauteurs des articles inclus dans la thèse

**Article 1: "Short-term effects of kainic acid on CA1 hippocampal interneurons differentially vulnerable to excitotoxicity". *Epilepsia* 2005**

Auteurs: Nathalie Sanon  
Lionel Carmant  
Martine Émond  
Patrice Congar  
Jean-Claude Lacaille

**Article 2: "Interneuron sub-type specific activation of mGluR1/5 during epileptiform activity in hippocampus". *Epilepsia* 2010**

Auteurs: Nathalie Sanon  
Joe-Guillaume Pelletier  
Lionel Carmant  
Jean-Claude Lacaille

**Article 3: "Cell type-specific changes in spontaneous and minimally evoked excitatory synaptic activity in hippocampal CA1 interneurons of kainate-treated rats" *Epilepsy Res.* 2006**

Auteurs: Yaël Perez  
Stéphanie Ratté  
Nathalie Sanon  
Valérie Lapointe  
Jean-Claude Lacaille

## Annexe III

### Contribution de l'étudiante

-Sanon N, Carmant L, Émond M, Congar P, Lacaille J-C: "*Short-term effects of kainic acid on CA1 hippocampal interneurons differentially vulnerable to excitotoxicity*" **Epilepsia**. 2005 Jun;46(6):837-48. Publié.

J'ai effectué tous les enregistrements d'électrophysiologie et d'imagerie calcique, toutes les analyses concernant ces expériences, toutes les figures et participé à la rédaction de l'article.

-Sanon N, Pelletier J-G, Carmant L, Lacaille J-C. "*Interneuron subtype-specific activation of mGluR1/5 during epileptiform activity in rat hippocampal slices*". **Epilepsia** 2010 51(8): 1607-1618. Publié

J'ai effectué la majorité des expériences, sauf une partie des expériences sur les différentes voies stimulées (Fig supplémentaire 2) effectuée par J-G Pelletier, et l'analyse des données. J'ai préparé toutes les figures et j'ai participé à la rédaction de l'article.

-Perez Y, Ratte S, Sanon N, Lapointe V, Lacaille JC. "*Cell type-specific changes in spontaneous and minimally evoked excitatory synaptic activity in hippocampal CA1 interneurons of kainate-treated rats*." **Epilepsy Res**. 2006 Mar;68(3):241-54. Publié

J'ai effectué les chirurgies stéréotaxiques pour les injections d'acide kaïnique rendant les rats épileptiques et participé à la rédaction du manuscrit. Cet article est placé en annexe de la thèse.

## **Références bibliographiques**

- Abe T, Sugihara H, Nawa H, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S (1992). Molecular characterization of a novel metabotropic glutamate receptor mGluR5 coupled to inositol phosphate/Ca<sup>2+</sup> signal transduction. *J Biol Chem* 267: 13361-13368.
- Al-Noori S et Swann JW (2000). A role for sodium and chloride in kainic acid-induced beading of inhibitory interneuron dendrites. *Neuroscience* 101: 337-348.
- Alagarsamy S, Marino MJ, Rouse ST, Gereau RW, Heinemann SF, Conn PJ (1999). Activation of NMDA receptors reverses desensitization of mGluR5 in native and recombinant systems. *Nat Neurosci* 2: 234-240.
- Alagarsamy S, Saugstad J, Warren L, Mansuy IM, Gereau RW, Conn PJ (2005). NMDA-induced potentiation of mGluR5 is mediated by activation of protein phosphatase 2B/calcineurin. *Neuropharmacology* 49 Suppl 1: 135-145.
- Albala BJ, Moshe SL, Okada R (1984). Kainic-acid-induced seizures: a developmental study. *Brain Res* 315: 139-148.
- Alexander GM et Godwin DW (2006). Metabotropic glutamate receptors as a strategic target for the treatment of epilepsy. *Epilepsy Res* 71: 1-22.
- Alger BE et Nicoll RA (1979). GABA-mediated biphasic inhibitory responses in hippocampus. *Nature* 281: 315-317.
- Alger BE et Nicoll RA (1980). Epileptiform burst afterhyperpolarization: calcium-dependent potassium potential in hippocampal CA1 pyramidal cells. *Science* 210: 1122-1124.
- Alger BE et Nicoll RA (1982). Pharmacological evidence for two kinds of GABA receptor on rat hippocampal pyramidal cells studied in vitro. *J Physiol* 328: 125-141.

- Alonso A et Klink R (1993). Differential electroresponsiveness of stellate and pyramidal-like cells of medial entorhinal cortex layer II. *J Neurophysiol* 70: 128-143.
- Amaral DG, Insausti R, Cowan WM (1987). The entorhinal cortex of the monkey: I. Cytoarchitectonic organization. *J Comp Neurol* 264: 326-355.
- Ananth C, Thameem DS, Gopalakrishnakone P, Kaur C (2001). Domoic acid-induced neuronal damage in the rat hippocampus: changes in apoptosis related genes (bcl-2, bax, caspase-3) and microglial response. *J Neurosci Res* 66: 177-190.
- Ang CW, Carlson GC, Coulter DA (2005). Hippocampal CA1 circuitry dynamically gates direct cortical inputs preferentially at theta frequencies. *J Neurosci* 25: 9567-9580.
- Ang CW, Carlson GC, Coulter DA (2006). Massive and specific dysregulation of direct cortical input to the hippocampus in temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* 26: 11850-11856.
- Anwyl R (1999). Metabotropic glutamate receptors: electrophysiological properties and role in plasticity. *Brain Res Brain Res Rev* 29: 83-120.
- Aradi I et Soltesz I (2002). Modulation of network behaviour by changes in variance in interneuronal properties. *J Physiol* 538: 227-251.
- Aramori I et Nakanishi S (1992). Signal transduction and pharmacological characteristics of a metabotropic glutamate receptor, mGluR1, in transfected CHO cells. *Neuron* 8: 757-765.
- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG (1999). Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci* 22: 208-215.

- Attwell PJ, Koumentaki A, Abdul-Ghani AS, Croucher MJ, Bradford HF (1998). Specific group II metabotropic glutamate receptor activation inhibits the development of kindled epilepsy in rats. *Brain Res* 787: 286-291.
- Avoli M (1996). GABA-mediated synchronous potentials and seizure generation. *Epilepsia* 37: 1035-1042.
- Avoli M, Hwa G, Louvel J, Kurcewicz I, Pumain R, Lacaille JC (1997). Functional and pharmacological properties of GABA-mediated inhibition in the human neocortex. *Can J Physiol Pharmacol* 75: 526-534.
- Avoli M et Olivier A (1987). Bursting in human epileptogenic neocortex is depressed by an N-methyl-D-aspartate antagonist. *Neurosci Lett* 76: 249-254.
- Bancaud J, Talairach J, Morel P, Bresson M (1966). [Ammon's horn and amygdaline nucleus: clinical and electric effects of their stimulation in man]. *Rev Neurol (Paris)* 115: 329-352.
- Barbarosie M et Avoli M (1997). CA3-driven hippocampal-entorhinal loop controls rather than sustains in vitro limbic seizures. *J Neurosci* 17: 9308-9314.
- Barbarosie M, Louvel J, Kurcewicz I, Avoli M (2000). CA3-Released entorhinal seizures disclose dentate gyrus epileptogenicity and unmask a temporoammonic pathway. *J Neurophysiol* 83: 1115-1124.
- Barclay J et Rees M (1999). Mouse models of spike-wave epilepsy. *Epilepsia* 40 Suppl 3: 17-22.
- Bashir ZI, Bortolotto ZA, Davies CH, Berretta N, Irving AJ, Seal AJ, Henley JM, Jane DE, Watkins JC, Collingridge GL (1993a). Induction of LTP in the hippocampus needs synaptic activation of glutamate metabotropic receptors. *Nature* 363: 347-350.

- Bashir ZI, Jane DE, Sunter DC, Watkins JC, Collingridge GL (1993b). Metabotropic glutamate receptors contribute to the induction of long-term depression in the CA1 region of the hippocampus. *Eur J Pharmacol* 239: 265-266.
- Baude A, Nusser Z, Roberts JD, Mulvihill E, McIlhinney RA, Somogyi P (1993). The metabotropic glutamate receptor (mGluR1 alpha) is concentrated at perisynaptic membrane of neuronal subpopulations as detected by immunogold reaction. *Neuron* 11: 771-787.
- Ben Ari Y (1985). Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 14: 375-403.
- Ben-Ari Y (2001). Cell death and synaptic reorganizations produced by seizures. *Epilepsia* 42 Suppl 3: 5-7.
- Ben-Ari Y et Holmes GL (2006). Effects of seizures on developmental processes in the immature brain. *Lancet Neurol* 5: 1055-1063.
- Ben-Ari Y, Lagowska J, Tremblay E, Le Gal La SG (1979). A new model of focal status epilepticus: intra-amygdaloid application of kainic acid elicits repetitive secondarily generalized convulsive seizures. *Brain Res* 163: 176-179.
- Ben-Ari Y et Represa A (1990). Brief seizure episodes induce long-term potentiation and mossy fibre sprouting in the hippocampus. *Trends Neurosci* 13: 312-318.
- Ben-Menachem E (1995). Vigabatrin. *Epilepsia* 36 Suppl 2: S95-104.
- Bennett JA et Dingledine R (1995). Topology profile for a glutamate receptor: three transmembrane domains and a channel-lining reentrant membrane loop. *Neuron* 14: 373-384.

- Berger M et Ben-Ari Y (1983). Autoradiographic visualization of [3H]kainic acid receptor subtypes in the rat hippocampus. *Neurosci Lett* 39: 237-242.
- Bergles DE, Doze VA, Madison DV, Smith SJ (1996). Excitatory actions of norepinephrine on multiple classes of hippocampal CA1 interneurons. *J Neurosci* 16: 572-585.
- Bertram EH et Zhang DX (1999). Thalamic excitation of hippocampal CA1 neurons: a comparison with the effects of CA3 stimulation. *Neuroscience* 92: 15-26.
- Best N, Mitchell J, Baimbridge KG, Wheal HV (1993). Changes in parvalbumin-immunoreactive neurons in the rat hippocampus following a kainic acid lesion. *Neurosci Lett* 155: 1-6.
- Best N, Sundstrom LE, Mitchell J, Wheal HV (1996). Pre-exposure to subtoxic levels prevents kainic acid lesions in organotypic hippocampal slice cultures: effects of kainic acid on parvalbumin-immunoreactive neurons and expression of heat shock protein 72 following the induction of tolerance. *Eur J Neurosci* 8: 1209-1219.
- Binaschi A, Bregola G, Simonato M (2003). On the role of somatostatin in seizure control: clues from the hippocampus. *Rev Neurosci* 14: 285-301.
- Bliss TV et Collingridge GL (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361: 31-39.
- Blumcke I, Becker AJ, Klein C, Scheiwe C, Lie AA, Beck H, Waha A, Friedl MG, Kuhn R, Emson P, Elger C, Wiestler OD (2000). Temporal lobe epilepsy associated up-regulation of metabotropic glutamate receptors: correlated changes in mGluR1 mRNA and protein expression in experimental animals and human patients. *J Neuropathol Exp Neurol* 59: 1-10.

- Bocti C, Robitaille Y, Diadori P, Lortie A, Mercier C, Bouthillier A, Carmant L (2003). The pathological basis of temporal lobe epilepsy in childhood. *Neurology* 60: 191-195.
- Bolshakov VY et Siegelbaum SA (1994). Postsynaptic induction and presynaptic expression of hippocampal long-term depression. *Science* 264: 1148-1152.
- Bonnert TP, McKernan RM, Farrar S, le BB, Heavens RP, Smith DW, Hewson L, Rigby MR, Sirinathsingji DJ, Brown N, Wafford KA, Whiting PJ (1999). theta, a novel gamma-aminobutyric acid type A receptor subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 9891-9896.
- Bortolotto ZA, Bashir ZI, Davies CH, Collingridge GL (1994). A molecular switch activated by metabotropic glutamate receptors regulates induction of long-term potentiation. *Nature* 368: 740-743.
- Bouilleret V, Schwaller B, Schurmans S, Celio MR, Fritschy JM (2000). Neurodegenerative and morphogenic changes in a mouse model of temporal lobe epilepsy do not depend on the expression of the calcium-binding proteins parvalbumin, calbindin, or calretinin. *Neuroscience* 97: 47-58.
- Bourdeau ML, Morin F, Laurent CE, Azzi M, Lacaille JC (2007). Kv4.3-mediated A-type K<sup>+</sup> currents underlie rhythmic activity in hippocampal interneurons. *J Neurosci* 27: 1942-1953.
- Bouvier M, Chidiac P, Hebert TE, Loisel TP, Moffett S, Mouillac B (1995). Dynamic palmitoylation of G-protein-coupled receptors in eukaryotic cells. *Methods Enzymol* 250: 300-314.

- Brabet I, Mary S, Bockaert J, Pin JP (1995). Phenylglycine derivatives discriminate between mGluR1- and mGluR5-mediated responses. *Neuropharmacology* 34: 895-903.
- Bruckner C, Stenkamp K, Meierkord H, Heinemann U (1999). Epileptiform discharges induced by combined application of bicuculline and 4-aminopyridine are resistant to standard anticonvulsants in slices of rats. *Neurosci Lett* 268: 163-165.
- Brun VH, Otnass MK, Molden S, Steffenach HA, Witter MP, Moser MB, Moser EI (2002). Place cells and place recognition maintained by direct entorhinal-hippocampal circuitry. *Science* 296: 2243-2246.
- Buzsaki G (1984). Feed-forward inhibition in the hippocampal formation. *Prog Neurobiol* 22: 131-153.
- Buzsaki G et Chrobak JJ (1995). Temporal structure in spatially organized neuronal ensembles: a role for interneuronal networks. *Curr Opin Neurobiol* 5: 504-510.
- Buzsaki G et Eidelberg E (1982). Direct afferent excitation and long-term potentiation of hippocampal interneurons. *J Neurophysiol* 48: 597-607.
- Cahill L, Babinsky R, Markowitsch HJ, McGaugh JL (1995). The amygdala and emotional memory. *Nature* 377: 295-296.
- Camon L, Vives P, de Vera N, Martinez E (1998). Seizures and neuronal damage induced in the rat by activation of group I metabotropic glutamate receptors with their selective agonist 3,5-dihydroxyphenylglycine. *J Neurosci Res* 51: 339-348.
- Carmant L, Woodhall G, Ouardouz M, Robitaille R, Lacaille JC (1997). Interneuron-specific Ca<sup>2+</sup> responses linked to metabotropic and ionotropic glutamate receptors in rat hippocampal slices. *Eur J Neurosci* 9: 1625-1635.

- Castillo PE, Malenka RC, Nicoll RA (1997). Kainate receptors mediate a slow postsynaptic current in hippocampal CA3 neurons. *Nature* 388: 182-186.
- Cavalheiro EA, Leite JP, Bortolotto ZA, Turski WA, Ikonomidou C, Turski L (1991). Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. *Epilepsia* 32: 778-782.
- Cenquizca LA et Swanson LW (2007). Spatial organization of direct hippocampal field CA1 axonal projections to the rest of the cerebral cortex. *Brain Res Rev* 56:1-26
- Chapman AG, Nanan K, Williams M, Meldrum BS (2000). Anticonvulsant activity of two metabotropic glutamate group I antagonists selective for the mGlu5 receptor: 2-methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine (MPEP), and (E)-6-methyl-2-styryl-pyridine (SIB 1893). *Neuropharmacology* 39: 1567-1574.
- Chen K, Baram TZ, Soltesz I (1999). Febrile seizures in the developing brain result in persistent modification of neuronal excitability in limbic circuits. *Nat Med* 5: 888-894.
- Chen QX, Stelzer A, Kay AR, Wong RK (1990). GABAA receptor function is regulated by phosphorylation in acutely dissociated guinea-pig hippocampal neurones. *J Physiol* 420: 207-221.
- Chen Y, Chad JE, Cannon RC, Wheal HV (1999). Reduced Mg<sup>2+</sup> blockade of synaptically activated N-methyl-D-aspartate receptor-channels in CA1 pyramidal neurons in kainic acid-lesioned rat hippocampus. *Neuroscience* 88: 727-739.
- Cherubini E, Martina M, Sciancalepore M, Strata F (1998). GABA excites immature CA3 pyramidal cells through bicuculline-sensitive and -insensitive chloride-dependent receptors. *Perspect Dev Neurobiol* 5: 289-304.

- Chittajallu R, Vignes M, Dev KK, Barnes JM, Collingridge GL, Henley JM (1996). Regulation of glutamate release by presynaptic kainate receptors in the hippocampus. *Nature* 379: 78-81.
- Choi DW (1994). Calcium and excitotoxic neuronal injury. *Ann N Y Acad Sci* 747: 162-171.
- Chuang SC, Bianchi R, Kim D, Shin HS, Wong RK (2001). Group I metabotropic glutamate receptors elicit epileptiform discharges in the hippocampus through PLCbeta1 signaling. *J Neurosci* 21: 6387-6394.
- Clark BP, Baker SR, Glodsworthy J, Harris JR, Kingston AE (1997). (+)-2-Methyl-4-carboxyphenylglycine (LY 367385) selectively antagonizes metabotropic glutamate mGluR1 receptors. *Bioorg Med Chem Lett* 7: 2777-2780.
- Clifford DB, Olney JW, Maniotis A, Collins RC, Zorumski CF (1987). The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures. *Neuroscience* 23: 953-968.
- Cobb SR, Buhl EH, Halasy K, Paulsen O, Somogyi P (1995). Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABAergic interneurons. *Nature* 378: 75-78.
- Coenen AM, Drinkenburg WH, Inoue M, van Luijtelaar EL (1992). Genetic models of absence epilepsy, with emphasis on the WAG/Rij strain of rats. *Epilepsy Res* 12: 75-86.
- Cohen I, Huberfeld G, Miles R (2006). Emergence of disinhibition-induced synchrony in the CA3 region of the guinea pig hippocampus in vitro. *J Physiol* 570: 583-594.

- Colbert CM et Levy WB (1992). Electrophysiological and pharmacological characterization of perforant path synapses in CA1: mediation by glutamate receptors. *J Neurophysiol* 68: 1-8.
- Collingridge GL et Lester RA (1989). Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacol Rev* 41: 143-210.
- Cossart R, Bernard C, Ben Ari Y (2005). Multiple facets of GABAergic neurons and synapses: multiple fates of GABA signalling in epilepsies. *Trends Neurosci* 28: 108-115.
- Cossart R, Esclapez M, Hirsch JC, Bernard C, Ben Ari Y (1998). GluR5 kainate receptor activation in interneurons increases tonic inhibition of pyramidal cells. *Nat Neurosci* 1: 470-478.
- Cossart R, Tyzio R, Dinocourt C, Esclapez M, Hirsch JC, Ben Ari Y, Bernard C (2001). Presynaptic kainate receptors that enhance the release of GABA on CA1 hippocampal interneurons. *Neuron* 29: 497-508.
- Csicsvari J, Jamieson B, Wise KD, Buzsaki G (2003). Mechanisms of gamma oscillations in the hippocampus of the behaving rat. *Neuron* 37: 311-322.
- Curia G, Longo D, Biagini G, Jones RS, Avoli M (2008). The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci Methods* 172: 143-157.
- Curry WJ et Kulling DL (1998). Newer antiepileptic drugs: gabapentin, lamotrigine, felbamate, topiramate and fosphenytoin. *Am Fam Physician* 57: 513-520.
- D'Antuono M, Benini R, Biagini G, D'Arcangelo G, Barbarosie M, Tancredi V, Avoli M (2002). Limbic network interactions leading to hyperexcitability in a model of temporal lobe epilepsy. *J Neurophysiol* 87: 634-639.

- de Curtis M et Avanzini G (2001). Interictal spikes in focal epileptogenesis. *Prog Neurobiol* 63: 541-567.
- De Keyser J, Sulter G, Luiten PG (1999). Clinical trials with neuroprotective drugs in acute ischaemic stroke: are we doing the right thing? *Trends Neurosci* 22: 535-540.
- DeFelipe J (2002). Cortical interneurons: from Cajal to 2001. *Prog Brain Res* 136: 215-238.
- Desmond NL, Scott CA, Jane JA, Jr., Levy WB (1994). Ultrastructural identification of entorhinal cortical synapses in CA1 stratum lacunosum-moleculare of the rat. *Hippocampus* 4: 594-600.
- Dichter MA, Ayala GF. (1987). Cellular mechanisms of epilepsy: a status report. *Science* 237: 157-64.
- Dietrich D, Kral T, Clusmann H, Friedl M, Schramm J (2002). Presynaptic group II metabotropic glutamate receptors reduce stimulated and spontaneous transmitter release in human dentate gyrus. *Neuropharmacology* 42: 297-305.
- Dinocourt C, Petanjek Z, Freund TF, Ben Ari Y, Esclapez M (2003). Loss of interneurons innervating pyramidal cell dendrites and axon initial segments in the CA1 region of the hippocampus following pilocarpine-induced seizures. *J Comp Neurol* 459: 407-425.
- Doherty J et Dingledine R (2001). Reduced excitatory drive onto interneurons in the dentate gyrus after status epilepticus. *J Neurosci* 21: 2048-2057.
- Doyle CA, Slater P. (1997). Localization of neuronal and endothelial nitric oxide synthase isoforms in human hippocampus. *Neuroscience*. 76:387-95.

- Duggan AW, Hope PJ, Jarrott B, Schaible HG, Fleetwood-Walker SM (1990). Release, spread and persistence of immunoreactive neurokinin A in the dorsal horn of the cat following noxious cutaneous stimulation. Studies with antibody microprobes. *Neuroscience* 35: 195-202.
- Duncan JS (2007). Epilepsy surgery. *Clin Med* 7: 137-142.
- Durand GM, Gregor P, Zheng X, Bennett MV, Uhl GR, Zukin RS (1992). Cloning of an apparent splice variant of the rat N-methyl-D-aspartate receptor NMDAR1 with altered sensitivity to polyamines and activators of protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 9359-9363.
- Dutar P et Nicoll RA (1988). A physiological role for GABAB receptors in the central nervous system. *Nature* 332: 156-158.
- Dzhala VI, Talos DM, Sdrulla DA, Brumback AC, Mathews GC, Benke TA, Delpire E, Jensen FE, Staley KJ (2005). NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain. *Nat Med* 11: 1205-1213.
- Empson RM et Heinemann U (1995). Perforant path connections to area CA1 are predominantly inhibitory in the rat hippocampal-entorhinal cortex combined slice preparation. *Hippocampus* 5: 104-107.
- Engel J Jr (1989). *Seizures and Epilepsy*, F.A. Davis Company, USA.
- Engel J, Jr. (2006). ILAE classification of epilepsy syndromes. *Epilepsy Res* 70 Suppl 1: S5-10.
- Enz R, Brandstatter JH, Wassle H, Bormann J (1996). Immunocytochemical localization of the GABA<sub>A</sub> receptor rho subunits in the mammalian retina. *J Neurosci* 16: 4479-4490.

- Erlander MG, Tillakaratne NJ, Feldblum S, Patel N, Tobin AJ (1991). Two genes encode distinct glutamate decarboxylases. *Neuron* 7: 91-100.
- Esclapez M, Hirsch JC, Khazipov R, Ben-Ari Y, Bernard C (1997). Operative GABAergic inhibition in hippocampal CA1 pyramidal neurons in experimental epilepsy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 12151-12156.
- Esclapez M et Houser CR (1999). Up-regulation of GAD65 and GAD67 in remaining hippocampal GABA neurons in a model of temporal lobe epilepsy. *J Comp Neurol* 412: 488-505.
- Etter A, Cully DF, Liu KK, Reiss B, Vassilatis DK, Schaeffer JM, Arena JP (1999). Picrotoxin blockade of invertebrate glutamate-gated chloride channels: subunit dependence and evidence for binding within the pore. *J Neurochem.* 72:318-26.
- Feindel W (1999). Herbert Henri Jasper (1906-1999): an appreciation. *Can J Neurol Sci* 26: 224-229.
- Ferraguti F, Cobden P, Pollard M, Cope D, Shigemoto R, Watanabe M, Somogyi P (2004). Immunolocalization of metabotropic glutamate receptor 1alpha (mGluR1alpha) in distinct classes of interneuron in the CA1 region of the rat hippocampus. *Hippocampus* 14: 193-215.
- Ferraguti F, Conquet F, Corti C, Grandes P, Kuhn R, Knopfel T (1998). Immunohistochemical localization of the mGluR1beta metabotropic glutamate receptor in the adult rodent forebrain: evidence for a differential distribution of mGluR1 splice variants. *J Comp Neurol* 400: 391-407.
- Ferraguti F et Shigemoto R (2006). Metabotropic glutamate receptors. *Cell Tissue Res* 326: 483-504.

- Ficker E et Heinemann U (1992). Slow and fast transient potassium currents in cultured rat hippocampal cells. *J Physiol* 445: 431-455.
- Foster AC et Fagg GE (1984). Acidic amino acid binding sites in mammalian neuronal membranes: their characteristics and relationship to synaptic receptors. *Brain Res* 319: 103-164.
- Fotuhi M, Standaert DG, Testa CM, Penney JB, Jr., Young AB (1994). Differential expression of metabotropic glutamate receptors in the hippocampus and entorhinal cortex of the rat. *Brain Res Mol Brain Res* 21: 283-292.
- Franck JE, Kunkel DD, Baskin DG, Schwartzkroin PA (1988). Inhibition in kainate-lesioned hyperexcitable hippocampi: physiologic, autoradiographic, and immunocytochemical observations. *J Neurosci* 8: 1991-2002.
- Franck JE et Schwartzkroin PA (1985). Do kainate-lesioned hippocampi become epileptogenic? *Brain Res* 329: 309-313.
- Frerking M, Malenka RC, Nicoll RA (1998). Synaptic activation of kainate receptors on hippocampal interneurons. *Nat Neurosci* 1: 479-486.
- Frerking M, Petersen CC, Nicoll RA (1999). Mechanisms underlying kainate receptor-mediated disinhibition in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 12917-12922.
- Freund TF et Buzsaki G (1996). Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6: 347-470.
- Friedman LK (2006). Calcium: a role for neuroprotection and sustained adaptation. *Mol Interv* 6: 315-329.

- Fujiwara-Tsakamoto Y, Isomura Y, Nambu A, Takada M (2003). Excitatory GABA input directly drives seizure-like rhythmic synchronization in mature hippocampal CA1 pyramidal cells. *Neuroscience* 119: 265-275.
- Galanopoulou AS (2007). Developmental patterns in the regulation of chloride homeostasis and GABA(A) receptor signaling by seizures. *Epilepsia* 48 Suppl 5: 14-18.
- Gasparini F, Lingenhohl K, Stoehr N, Flor PJ, Heinrich M, Vranesic I, Biollaz M, Allgeier H, Heckendorn R, Urwyler S, Varney MA, Johnson EC, Hess SD, Rao SP, Sacaan AI, Santori EM, Velicelebi G, Kuhn R (1999). 2-Methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine (MPEP), a potent, selective and systemically active mGlu5 receptor antagonist. *Neuropharmacology* 38: 1493-1503.
- Gastaut H (1970). Clinical and electroencephalographical classification of epileptic seizures. *Epilepsia* 11: 102-113.
- Gereau RW et Conn PJ (1995). Roles of specific metabotropic glutamate receptor subtypes in regulation of hippocampal CA1 pyramidal cell excitability. *J Neurophysiol* 74: 122-129.
- Gibbs JW, III, Zhang YF, Kao CQ, Holloway KL, Oh KS, Coulter DA (1996). Characterization of GABAA receptor function in human temporal cortical neurons. *J Neurophysiol* 75: 1458-1471.
- Glickfeld LL, Atallah BV, Scanziani M (2008). Complementary modulation of somatic inhibition by opioids and cannabinoids. *J Neurosci* 28: 1824-1832.
- Gloveli T, Albrecht D, Heinemann U (1995). Properties of low Mg<sup>2+</sup> induced epileptiform activity in rat hippocampal and entorhinal cortex slices during adolescence. *Brain Res Dev Brain Res* 87: 145-152.

- Goddard GV, McIntyre DC, Leech CK (1969). A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Experimental Neurology* 25: 295-330.
- Goodkin HP, Joshi S, Mchedlishvili Z, Brar J, Kapur J (2008). Subunit-specific trafficking of GABA(A) receptors during status epilepticus. *J Neurosci* 28: 2527-2538.
- Gorter JA, Goncalves Pereira PM, van Vliet EA, Aronica E, Lopes da Silva FH, Lucassen PJ (2003). Neuronal cell death in a rat model for mesial temporal lobe epilepsy is induced by the initial status epilepticus and not by later repeated spontaneous seizures. *Epilepsia* 44: 647-658.
- Grover LM, Lambert NA, Schwartzkroin PA, Teyler TJ (1993). Role of HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ions in depolarizing GABAA receptor-mediated responses in pyramidal cells of rat hippocampus. *J Neurophysiol* 69: 1541-1555.
- Gulyas AI, Hajos N, Freund TF (1996). Interneurons containing calretinin are specialized to control other interneurons in the rat hippocampus. *J Neurosci* 16: 3397-3411.
- Gutierrez R (2000). Seizures induce simultaneous GABAergic and glutamatergic transmission in the dentate gyrus-CA3 system. *J Neurophysiol* 84: 3088-3090.
- Hajos N, Papp EC, Acsady L, Levey AI, Freund TF (1998). Distinct interneuron types express m2 muscarinic receptor immunoreactivity on their dendrites or axon terminals in the hippocampus. *Neuroscience* 82: 355-376.
- Hamilton SE, Loose MD, Qi M, Levey AI, Hille B, McKnight GS, Idzerda RL, Nathanson NM (1997). Disruption of the m1 receptor gene ablates muscarinic receptor-dependent M current regulation and seizure activity in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 13311-13316.

- Hamon B, Stanton PK, Heinemann U (1987). An N-methyl-D-aspartate receptor-independent excitatory action of partial reduction of extracellular  $[Mg^{2+}]$  in CA1-region of rat hippocampal slices. *Neurosci Lett* 75: 240-245.
- Hampson DR et Manalo JL (1998). The activation of glutamate receptors by kainic acid and domoic acid. *Nat Toxins* 6: 153-158.
- Han ZS, Buhl EH, Lorinczi Z, Somogyi P (1993). A high degree of spatial selectivity in the axonal and dendritic domains of physiologically identified local-circuit neurons in the dentate gyrus of the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 5: 395-410.
- Hebb DO (1949). The organization of behavior, John Wiley, New-York.
- Heinemann U, Kann O, Schuchmann S (2006). Chapter 4: An overview of in vitro Seizure Models in acute organotypic slices. *Models of Seizures and Epilepsy*. Elsevier Inc.
- Herb A, Burnashev N, Werner P, Sakmann B, Wisden W, Seeburg PH (1992). The KA-2 subunit of excitatory amino acid receptors shows widespread expression in brain and forms ion channels with distantly related subunits. *Neuron* 8: 775-785.
- Hestrin S, Nicoll RA, Perkel DJ, Sah P (1990). Analysis of excitatory synaptic action in pyramidal cells using whole-cell recording from rat hippocampal slices. *J Physiol* 422: 203-225.
- Hille B (2001). Ion channels of excitable membranes, 3rd. ed. Sinauer, Sunderland.
- Hoffmann AF, Zhao Q, Holmes GL (2004). Cognitive impairment following status epilepticus and recurrent seizures during early development: support for the "two-hit hypothesis". *Epilepsy Behav* 5: 873-877.

- Holmes GL et Ben-Ari Y (2001). The neurobiology and consequences of epilepsy in the developing brain. *Pediatr Res* 49: 320-325.
- Houamed KM, Kuijper JL, Gilbert TL, Haldeman BA, O'Hara PJ, Mulvihill ER, Almers W, Hagen FS (1991). Cloning, expression, and gene structure of a G protein-coupled glutamate receptor from rat brain. *Science* 252: 1318-1321.
- Huang YH, Sinha SR, Tanaka K, Rothstein JD, Bergles DE (2004). Astrocyte glutamate transporters regulate metabotropic glutamate receptor-mediated excitation of hippocampal interneurons. *J Neurosci* 24: 4551-4559.
- Huber KM, Kayser MS, Bear MF (2000). Role for rapid dendritic protein synthesis in hippocampal mGluR-dependent long-term depression. *Science* 288: 1254-1257.
- Ingram EM, Wiseman JW, Tessler S, Emson PC (2001). Reduction of glial glutamate transporters in the parietal cortex and hippocampus of the EL mouse. *J Neurochem* 79: 564-575.
- Isokawa M (1996). Decrement of GABAA receptor-mediated inhibitory postsynaptic currents in dentate granule cells in epileptic hippocampus. *J Neurophysiol* 75: 1901-1908.
- Isokawa M (1997). Preservation of dendrites with the presence of reorganized mossy fiber collaterals in hippocampal dentate granule cells in patients with temporal lobe epilepsy. *Brain Res* 744: 339-343.
- Isokawa M et Levesque MF (1991). Increased NMDA responses and dendritic degeneration in human epileptic hippocampal neurons in slices. *Neurosci Lett* 132: 212-216.

- Iversen LL, Iversen SD, Bloom F, Douglas C, Brown M, Vale W (1978). Calcium-dependent release of somatostatin and neurotensin from rat brain in vitro. *Nature* 273: 161-163.
- Jefferys JG et Haas HL (1982). Synchronized bursting of CA1 hippocampal pyramidal cells in the absence of synaptic transmission. *Nature* 300: 448-450.
- Jensen FE, Applegate CD, Holtzman D, Belin TR, Burchfiel JL (1991). Epileptogenic effect of hypoxia in the immature rodent brain. *Ann Neurol* 29: 629-637.
- Johnson SW et Seutin V (1997). Bicuculline methiodide potentiates NMDA-dependent burst firing in rat dopamine neurons by blocking apamin-sensitive Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> currents. *Neurosci Lett* 231: 13-16.
- Jonas P (1993). AMPA-type glutamate receptors--nonselective cation channels mediating fast excitatory transmission in the CNS. *EXS* 66: 61-76.
- Jones MV et Westbrook GL (1996). The impact of receptor desensitization on fast synaptic transmission. *Trends Neurosci* 19: 96-101.
- Jones RS et Heinemann U (1987). Pre- and postsynaptic K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> fluxes in area CA1 of the rat hippocampus in vitro: effects of Ni<sup>2+</sup>, TEA and 4-AP. *Exp Brain Res* 68: 205-209.
- Jones RS et Lambert JD (1990). Synchronous discharges in the rat entorhinal cortex in vitro: site of initiation and the role of excitatory amino acid receptors. *Neuroscience* 34: 657-670.
- Jones S et Yakel JL (1997). Functional nicotinic ACh receptors on interneurons in the rat hippocampus. *J Physiol* 504 ( Pt 3): 603-610.

- Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM (2000). *Principals of Neural Science*, Fourth Ed. McGraw-Hill, New-York.
- Karr L et Rutecki PA (2008). Activity-dependent induction and maintenance of epileptiform activity produced by group I metabotropic glutamate receptors in the rat hippocampal slice. *Epilepsy Res* 81: 14-23.
- Katada T, Northup JK, Bokoch GM, Ui M, Gilman AG (1984). The inhibitory guanine nucleotide-binding regulatory component of adenylate cyclase. Subunit dissociation and guanine nucleotide-dependent hormonal inhibition. *J Biol Chem* 259: 3578-3585.
- Kaufman DL, Houser CR, Tobin AJ (1991). Two forms of the gamma-aminobutyric acid synthetic enzyme glutamate decarboxylase have distinct intraneuronal distributions and cofactor interactions. *J Neurochem* 56: 720-723.
- Kawa K (1994). Distribution and functional properties of 5-HT<sub>3</sub> receptors in the rat hippocampal dentate gyrus: a patch-clamp study. *J Neurophysiol* 71: 1935-1947.
- Kawaguchi Y et Kubota Y (1993). Correlation of physiological subgroupings of nonpyramidal cells with parvalbumin- and calbindinD28k-immunoreactive neurons in layer V of rat frontal cortex. *J Neurophysiol* 70: 387-396.
- Khalilov I, Hirsch J, Cossart R, Ben-Ari Y (2002). Paradoxical anti-epileptic effects of a GluR5 agonist of kainate receptors. *J Neurophysiol* 88: 523-527.
- Khalilov I, Khazipov R, Esclapez M, Ben-Ari Y (1997). Bicuculline induces ictal seizures in the intact hippocampus recorded in vitro. *Eur J Pharmacol* 319: R5-R6.

- Khawaled R, Bruening-Wright A, Adelman JP, Maylie J (1999). Bicuculline block of small-conductance calcium-activated potassium channels. *Pflugers Arch* 438: 314-321.
- Kim SJ, Kim YS, Yuan JP, Petralia RS, Worley PF, Linden DJ (2003). Activation of the TRPC1 cation channel by metabotropic glutamate receptor mGluR1. *Nature* 426: 285-291.
- Kitamura A, Ishibashi H, Watanabe M, Takatsuru Y, Brodwick M, Nabekura J (2008). Sustained depolarizing shift of the GABA reversal potential by glutamate receptor activation in hippocampal neurons. *Neurosci Res* 62: 270-277.
- Klausberger T, Magill PJ, Marton LF, Roberts JD, Cobden PM, Buzsaki G, Somogyi P (2003). Brain-state- and cell-type-specific firing of hippocampal interneurons in vivo. *Nature* 421: 844-848.
- Klausberger T, Marton LF, O'Neill J, Huck JH, Dalezios Y, Fuentealba P, Suen WY, Papp E, Kaneko T, Watanabe M, Csicsvari J, Somogyi P (2005). Complementary roles of cholecystinin- and parvalbumin-expressing GABAergic neurons in hippocampal network oscillations. *J Neurosci* 25: 9782-9793.
- Klausberger T et Somogyi P (2008). Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science* 321: 53-57.
- Klueva J, Munsch T, Albrecht D, Pape HC (2003). Synaptic and non-synaptic mechanisms of amygdala recruitment into temporolimbic epileptiform activities. *Eur J Neurosci* 18: 2779-2791.
- Knowles WD et Schwartzkroin PA (1981). Local circuit synaptic interactions in hippocampal brain slices. *J Neurosci* 1: 318-322.

- Koh DS, Geiger JR, Jonas P, Sakmann B (1995). Ca(2+)-permeable AMPA and NMDA receptor channels in basket cells of rat hippocampal dentate gyrus. *J Physiol* 485 (Pt 2): 383-402.
- Konig P, Engel AK, Singer W (1996). Integrator or coincidence detector? The role of the cortical neuron revisited. *Trends Neurosci* 19: 130-137.
- Krnjević K (1970). Glutamate and gamma-aminobutyric acid in brain. *Nature* 228:119-24.
- Lacaille JC, Mueller AL, Kunkel DD, Schwartzkroin PA (1987). Local circuit interactions between oriens/alveus interneurons and CA1 pyramidal cells in hippocampal slices: electrophysiology and morphology. *J Neurosci* 7: 1979-1993.
- Lacaille JC et Schwartzkroin PA (1988a). Stratum lacunosum-moleculare interneurons of hippocampal CA1 region. I. Intracellular response characteristics, synaptic responses, and morphology. *J Neurosci* 8: 1400-1410.
- Lacaille JC et Schwartzkroin PA (1988b). Stratum lacunosum-moleculare interneurons of hippocampal CA1 region. II. Intracellular and intradendritic recordings of local circuit synaptic interactions. *J Neurosci* 8: 1411-1424.
- Lacaille JC et Williams S (1990). Membrane properties of interneurons in stratum oriens-alveus of the CA1 region of rat hippocampus in vitro. *Neuroscience* 36: 349-359.
- Lambert NA et Wilson WA (1996). High-threshold Ca<sup>2+</sup> currents in rat hippocampal interneurons and their selective inhibition by activation of GABA(B) receptors. *J Physiol* 492 ( Pt 1): 115-127.

- Lamsa KP, Heeroma JH, Somogyi P, Rusakov DA, Kullmann DM (2007). Anti-Hebbian long-term potentiation in the hippocampal feedback inhibitory circuit. *Science* 315: 1262-1266.
- Lapointe V, Morin F, Ratte S, Croce A, Conquet F, Lacaille JC (2004). Synapse-specific mGluR1-dependent long-term potentiation in interneurons regulates mouse hippocampal inhibition. *J Physiol* 555: 125-135.
- Laschet JJ, Minier F, Kurcewicz I, Bureau MH, Trottier S, Jeanneteau F, Griffon N, Samyn B, Van BJ, Louvel J, Sokoloff P, Pumain R (2004). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a GABAA receptor kinase linking glycolysis to neuronal inhibition. *J Neurosci* 24: 7614-7622.
- Lawrence JJ et McBain CJ (2003). Interneuron diversity series: containing the detonation--feedforward inhibition in the CA3 hippocampus. *Trends Neurosci* 26: 631-640.
- Lee AC, Wong RK, Chuang SC, Shin HS, Bianchi R (2002). Role of synaptic metabotropic glutamate receptors in epileptiform discharges in hippocampal slices. *J Neurophysiol* 88: 1625-1633.
- Lee J et Wu CF (2002). Electroconvulsive seizure behavior in *Drosophila*: analysis of the physiological repertoire underlying a stereotyped action pattern in bang-sensitive mutants. *J Neurosci* 22: 11065-11079.
- Lee J et Wu CF (2006). Genetic modifications of seizure susceptibility and expression by altered excitability in *Drosophila* Na<sup>(+)</sup> and K<sup>(+)</sup> channel mutants. *J Neurophysiol* 96: 2465-2478.
- Leranth C et Hajszan T (2007). Extrinsic afferent systems to the dentate gyrus. *Prog Brain Res* 163: 63-84.

- Leschinger A, Stabel J, Igelmund P, Heinemann U (1993). Pharmacological and electrographic properties of epileptiform activity induced by elevated K<sup>+</sup> and lowered Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> concentration in rat hippocampal slices. *Exp Brain Res* 96: 230-240.
- LeVasseur M, Ran I, Lacaille JC (2008). Selective induction of metabotropic glutamate receptor 1- and metabotropic glutamate receptor 5-dependent chemical long-term potentiation at oriens/alveus interneuron synapses of mouse hippocampus. *Neuroscience* 151: 28-42.
- Levy WB, Colbert CM, Desmond NL (1995). Another network model bites the dust: entorhinal inputs are no more than weakly excitatory in the hippocampal CA1 region. *Hippocampus* 5: 137-140.
- Li S et Stys PK (2000). Mechanisms of ionotropic glutamate receptor-mediated excitotoxicity in isolated spinal cord white matter. *J Neurosci* 20: 1190-1198.
- Lipton SA et Rosenberg PA (1994). Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med* 330: 613-622.
- Liu Z, Stafstrom CE, Sarkisian M, Tandon P, Yang Y, Hori A, Holmes GL (1996). Age-dependent effects of glutamate toxicity in the hippocampus. *Brain Res Dev Brain Res* 97: 178-184.
- Lorente de No (1934). Studies on the structure of the cerebral cortex. II Continuation of the study of the ammonic system. *J Psychol Neurol* 46: 113-177.
- Losonczy A, Somogyi P, Nusser Z (2003). Reduction of excitatory postsynaptic responses by persistently active metabotropic glutamate receptors in the hippocampus. *J Neurophysiol* 89: 1910-1919.

- Lowenstein DH, Bleck T, Macdonald RL (1999). It's time to revise the definition of status epilepticus. *Epilepsia* 40: 120-122.
- Lu YM, Jia Z, Janus C, Henderson JT, Gerlai R, Wojtowicz JM, Roder JC (1997). Mice lacking metabotropic glutamate receptor 5 show impaired learning and reduced CA1 long-term potentiation (LTP) but normal CA3 LTP. *J Neurosci* 17: 5196-5205.
- Lubke J, Frotscher M, Spruston N (1998). Specialized electrophysiological properties of anatomically identified neurons in the hilar region of the rat fascia dentata. *J Neurophysiol* 79: 1518-1534.
- Lujan R, Nusser Z, Roberts JD, Shigemoto R, Somogyi P (1996). Perisynaptic location of metabotropic glutamate receptors mGluR1 and mGluR5 on dendrites and dendritic spines in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 8: 1488-1500.
- Luscher C, Jan LY, Stoffel M, Malenka RC, Nicoll RA (1997). G protein-coupled inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels (GIRKs) mediate postsynaptic but not presynaptic transmitter actions in hippocampal neurons. *Neuron* 19: 687-695.
- Lux HD, Heinemann U, Dietzel I (1986). Ionic changes and alterations in the size of the extracellular space during epileptic activity. *Adv Neurol* 44: 619-639.
- Maccaferri G et Lacaille JC (2003). Interneuron Diversity series: Hippocampal interneuron classifications--making things as simple as possible, not simpler. *Trends Neurosci* 26: 564-571.
- Maccaferri G et McBain CJ (1995). Passive propagation of LTD to stratum oriens-alveus inhibitory neurons modulates the temporoammonic input to the hippocampal CA1 region. *Neuron* 15: 137-145.

- Magloczky Z, Wittner L, Borhegyi Z, Halasz P, Vajda J, Czirjak S, Freund TF (2000). Changes in the distribution and connectivity of interneurons in the epileptic human dentate gyrus. *Neuroscience* 96: 7-25.
- Mann EO et Paulsen O (2005). Mechanisms underlying gamma ('40 Hz') network oscillations in the hippocampus--a mini-review. *Prog Biophys Mol Biol* 87: 67-76.
- Mannaioni G, Marino MJ, Valenti O, Traynelis SF, Conn PJ (2001). Metabotropic glutamate receptors 1 and 5 differentially regulate CA1 pyramidal cell function. *J Neurosci* 21: 5925-5934.
- Marescaux C, Vergnes M, Depaulis A (1992). Genetic absence epilepsy in rats from Strasbourg--a review. *J Neural Transm Suppl* 35: 37-69.
- Martina M et Jonas P (1997). Functional differences in Na<sup>+</sup> channel gating between fast-spiking interneurons and principal neurons of rat hippocampus. *J Physiol* 505 ( Pt 3): 593-603.
- Mathern GW, Wilson CL, Beck H (2007). Chapter 13: Hippocampal sclerosis. *Epilepsy: A Comprehensive Textbook Vol 1*, Wolters Kluwer Health.
- Mayer ML et Westbrook GL (1987). Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurons. *J Physiol* 394: 501-527.
- Mayer ML, Westbrook GL, Guthrie PB (1984). Voltage-dependent block by Mg<sup>2+</sup> of NMDA responses in spinal cord neurons. *Nature* 309: 261-263.
- McBain CJ (1995). Hippocampal inhibitory neuron activity in the elevated potassium model of epilepsy. *J Neurophysiol* 73: 2853-2863.

- McBain CJ (2008). New directions in synaptic and network plasticity--a move away from NMDA receptor mediated plasticity. *J Physiol* 586: 1473-1474.
- McBain CJ, DiChiara TJ, Kauer JA (1994). Activation of metabotropic glutamate receptors differentially affects two classes of hippocampal interneurons and potentiates excitatory synaptic transmission. *J Neurosci* 14: 4433-4445.
- McLennan H (1983). Receptors for the excitatory amino acids in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 20: 251-271.
- McNamara JO, Bonhaus DW, Shin C (1993). Chapter 1: The kindling model of Epilepsy. *Epilepsy: models mechanisms and concepts*. Cambridge Press.
- Mello LE, Cavalheiro EA, Tan AM, Kupfer WR, Pretorius JK, Babb TL, Finch DM (1993). Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting. *Epilepsia* 34: 985-995.
- Ménard C, Patenaude C, Gagne AM, Massicotte G (2009). AMPA receptor-mediated cell death is reduced by docosahexaenoic acid but not by eicosapentaenoic acid in area CA1 of hippocampal slice cultures. *J Neurosci Res* 87: 876-886.
- Mendoza E, Galarraga E, Tapia D, Laville A, Hernandez-Echeagaray E, Bargas J (2006). Differential induction of long term synaptic plasticity in inhibitory synapses of the hippocampus. *Synapse* 60: 533-542.
- Menendez de la Prida L, avides-Piccione R, Sola R, Pozo MA (2002). Electrophysiological properties of interneurons from intraoperative spiking areas of epileptic human temporal neocortex. *Neuroreport* 13: 1421-1425.
- Merlin LR (2002). Differential roles for mGluR1 and mGluR5 in the persistent prolongation of epileptiform bursts. *J Neurophysiol* 87: 621-625.

- Merlin LR, Taylor GW, Wong RK (1995). Role of metabotropic glutamate receptor subtypes in the patterning of epileptiform activities in vitro. *J Neurophysiol* 74: 896-900.
- Merlin LR et Wong RK (1997). Role of group I metabotropic glutamate receptors in the patterning of epileptiform activities in vitro. *J Neurophysiol* 78: 539-544.
- Miles R, Toth K, Gulyas AI, Hajos N, Freund TF (1996). Differences between somatic and dendritic inhibition in the hippocampus. *Neuron* 16: 815-823.
- Miles R et Wong RK (1987). Inhibitory control of local excitatory circuits in the guinea-pig hippocampus. *J Physiol* 388: 611-629.
- Monaghan DT et Cotman CW (1982). The distribution of [3H]kainic acid binding sites in rat CNS as determined by autoradiography. *Brain Res* 252: 91-100.
- Montgomery SM, Sirota A, Buzsaki G (2008). Theta and gamma coordination of hippocampal networks during waking and rapid eye movement sleep. *J Neurosci* 28: 6731-6741.
- Monyer H, Sprengel R, Schoepfer R, Herb A, Higuchi M, Lomeli H, Burnashev N, Sakmann B, Seeburg PH (1992). Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science* 256: 1217-1221.
- Mori M, Abegg MH, Gahwiler BH, Gerber U (2004). A frequency-dependent switch from inhibition to excitation in a hippocampal unitary circuit. *Nature* 431: 453-456.
- Mori M et Gerber U (2002). Slow feedback inhibition in the CA3 area of the rat hippocampus by synergistic synaptic activation of mGluR1 and mGluR5. *J Physiol* 544: 793-799.

- Morin F, Beaulieu C, Lacaille JC (1998a). Cell-specific alterations in synaptic properties of hippocampal CA1 interneurons after kainate treatment. *J Neurophysiol* 80: 2836-2847.
- Morin F, Beaulieu C, Lacaille JC (1998b). Selective loss of GABA neurons in area CA1 of the rat hippocampus after intraventricular kainate. *Epilepsy Res* 32: 363-369.
- Morris RG, Anderson E, Lynch GS, Baudry M (1986). Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 319: 774-776.
- Mott DD, Li Q, Okazaki MM, Turner DA, Lewis DV (1999). GABAB-Receptor-mediated currents in interneurons of the dentate-hilus border. *J Neurophysiol* 82: 1438-1450.
- Mott DD, Turner DA, Okazaki MM, Lewis DV (1997). Interneurons of the dentate-hilus border of the rat dentate gyrus: morphological and electrophysiological heterogeneity. *J Neurosci* 17: 3990-4005.
- Mulle C, Sailer A, Perez-Otano I, Dickinson-Anson H, Castillo PE, Bureau I, Maron C, Gage FH, Mann JR, Bettler B, Heinemann SF (1998). Altered synaptic physiology and reduced susceptibility to kainate-induced seizures in GluR6-deficient mice. *Nature* 392: 601-605.
- Mulle C, Sailer A, Swanson GT, Brana C, O'Gorman S, Bettler B, Heinemann SF (2000). Subunit composition of kainate receptors in hippocampal interneurons. *Neuron* 28: 475-484.
- Munari C, Bancaud J, Bonis A, Buser P, Talairach J, Szikla G (1979). [Role of the amygdala in the occurrence of oro-alimentary signs of during epileptic seizures in man (author's transl)]. *Rev Electroencephalogr Neurophysiol Clin* 9: 236-240.

- Naber PA, Witter MP, Lopez da Silva FH (1999). Perirhinal cortex input to the hippocampus in the rat: evidence for parallel pathways, both direct and indirect. A combined physiological and anatomical study. *Eur J Neurosci* 11: 4119-4133.
- Nadler JV (1981). Minireview. Kainic acid as a tool for the study of temporal lobe epilepsy. *Life Sci* 29: 2031-2042.
- Nadler JV, Perry BW, Gentry C, Cotman CW (1980). Degeneration of hippocampal CA3 pyramidal cells induced by intraventricular kainic acid. *J Comp Neurol* 192: 333-359.
- Nagaraja RY, Becker A, Reymann KG, Balschun D (2005). Repeated administration of group I mGluR antagonists prevents seizure-induced long-term aberrations in hippocampal synaptic plasticity. *Neuropharmacology* 49 Suppl 1: 179-187.
- Najm IM, Hadam J, Ckakraverty D, Mikuni N, Penrod C, Sopa C, Markarian G, Luders HO, Babb T, Baudry M (1998). A short episode of seizure activity protects from status epilepticus-induced neuronal damage in rat brain. *Brain Res* 810: 72-75.
- Nakanishi N, Axel R, Shneider NA (1992). Alternative splicing generates functionally distinct N-methyl-D-aspartate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 8552-8556.
- Nayeem N, Green TP, Martin IL, Barnard EA (1994). Quaternary structure of the native GABAA receptor determined by electron microscopic image analysis. *J Neurochem* 62: 815-818.
- Newberry NR et Nicoll RA (1985). Comparison of the action of baclofen with gamma-aminobutyric acid on rat hippocampal pyramidal cells in vitro. *J Physiol* 360: 161-185.

- Nicoll RA et Malenka RC (1995). Contrasting properties of two forms of long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 377: 115-118.
- Nitecka L, Tremblay E, Charton G, Bouillot JP, Berger ML, Ben-Ari Y (1984). Maturation of kainic acid seizure-brain damage syndrome in the rat. II. Histopathological sequelae. *Neuroscience* 13: 1073-1094.
- O'Hara PJ, Sheppard PO, Thogersen H, Venezia D, Haldeman BA, McGrane V, Houamed KM, Thomsen C, Gilbert TL, Mulvihill ER (1993). The ligand-binding domain in metabotropic glutamate receptors is related to bacterial periplasmic binding proteins. *Neuron* 11: 41-52.
- O'Neill MJ, Bond A, Ornstein PL, Ward MA, Hicks CA, Hoo K, Bleakman D, Lodge D (1998). Decahydroisoquinolines: novel competitive AMPA/kainate antagonists with neuroprotective effects in global cerebral ischaemia. *Neuropharmacology* 37: 1211-1222.
- Obenaus A, Esclapez M, Houser CR (1993). Loss of glutamate decarboxylase mRNA-containing neurons in the rat dentate gyrus following pilocarpine-induced seizures. *J Neurosci* 13: 4470-4485.
- Oliet SH, Malenka RC, Nicoll RA (1997). Two distinct forms of long-term depression coexist in CA1 hippocampal pyramidal cells. *Neuron* 18: 969-982.
- Oliva AA, Jr., Lam TT, Swann JW (2002). Distally directed dendrotoxicity induced by kainic Acid in hippocampal interneurons of green fluorescent protein-expressing transgenic mice. *J Neurosci* 22: 8052-8062.
- Olney JW et Sharpe LG (1969). Brain lesions in an infant rhesus monkey treated with monosodium glutamate. *Science* 166: 386-388.

- Olney JW, Teitelbaum J, Pinsky C, Debonnel G (1990). Domoic acid toxicity. Panel discussion: treatment. *Can Dis Wkly Rep* 16 Suppl 1E: 117-120.
- Ong J, Parker DA, Marino V, Kerr DI, Puspawati NM, Prager RH (2005). 3-Chloro,4-methoxyfendiline is a potent GABA(B) receptor potentiator in rat neocortical slices. *Eur J Pharmacol* 507: 35-42.
- Otsuka M, Iversen LL, Hall ZW, Kravitz EA (1966). Release of gamma-aminobutyric acid from inhibitory nerves of lobster. *Proc Natl Acad Sci U S A* 56: 1110-1115.
- Ouardouz M et Lacaille JC (1995). Mechanisms of selective long-term potentiation of excitatory synapses in stratum oriens/alveus interneurons of rat hippocampal slices. *J Neurophysiol* 73: 810-819.
- Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, Geschwind DH, Sloviter RS, Lowenstein DH (1997). Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J Neurosci* 17: 3727-3738.
- Parra P, Gulyas AI, Miles R (1998). How many subtypes of inhibitory cells in the hippocampus? *Neuron* 20: 983-993.
- Patenaude C, Chapman CA, Bertrand S, Congar P, Lacaille JC (2003). GABAB receptor- and metabotropic glutamate receptor-dependent cooperative long-term potentiation of rat hippocampal GABAA synaptic transmission. *J Physiol* 553: 155-167.
- Paternain AV, Morales M, Lerma J (1995). Selective antagonism of AMPA receptors unmasks kainate receptor-mediated responses in hippocampal neurons. *Neuron* 14: 185-189.

- Pellicciari R, Luneia R, Costantino G, Marinozzi M, Natalini B, Jakobsen P, Kanstrup A, Lombardi G, Moroni F, Thomsen C (1995). 1-Aminoindan-1,5-dicarboxylic acid: a novel antagonist at phospholipase C-linked metabotropic glutamate receptors. *J Med Chem* 38: 3717-3719.
- Penfield W (1959). The interpretive cortex; the stream of consciousness in the human brain can be electrically reactivated. *Science* 129: 1719-1725.
- Perez Y, Morin F, Beaulieu C, Lacaille JC (1996). Axonal sprouting of CA1 pyramidal cells in hyperexcitable hippocampal slices of kainate-treated rats. *Eur J Neurosci* 8: 736-748.
- Perez Y, Morin F, Lacaille JC (2001). A hebbian form of long-term potentiation dependent on mGluR1a in hippocampal inhibitory interneurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 9401-9406.
- Perez Y, Ratte S, Sanon N, Lapointe V, Lacaille JC (2006). Cell type-specific changes in spontaneous and minimally evoked excitatory synaptic activity in hippocampal CA1 interneurons of kainate-treated rats. *Epilepsy Res* 68: 241-254.
- Perreault P et Avoli M (1991). Physiology and pharmacology of epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in rat hippocampal slices. *J Neurophysiol* 65: 771-785.
- Petralia RS, Wang YX, Wenthold RJ (1994). Histological and ultrastructural localization of the kainate receptor subunits, KA2 and GluR6/7, in the rat nervous system using selective antipeptide antibodies. *J Comp Neurol* 349: 85-110.
- Phelps EA (2004). Human emotion and memory: interactions of the amygdala and hippocampal complex. *Curr Opin Neurobiol* 14: 198-202.

- Poncer JC et Miles R (1995). Fast and slow excitation of inhibitory cells in the CA3 region of the hippocampus. *J Neurobiol* 26: 386-395.
- Racine RJ (1972). Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 32: 281-294.
- Randall AD et Collingridge GL (1992). Amino acid receptor-mediated synaptic currents in the CA1 region of the hippocampus. *Ion Channels* 3: 63-81.
- Ratte S et Lacaille JC (2006). Selective degeneration and synaptic reorganization of hippocampal interneurons in a chronic model of temporal lobe epilepsy. *Adv Neurol* 97: 69-76.
- Raymond CR, Thompson VL, Tate WP, Abraham WC (2000). Metabotropic glutamate receptors trigger homosynaptic protein synthesis to prolong long-term potentiation. *J Neurosci* 20: 969-976.
- Rempe DA, Bertram EH, Williamson JM, Lothman EW (1997). Interneurons in area CA1 stratum radiatum and stratum oriens remain functionally connected to excitatory synaptic input in chronically epileptic animals. *J Neurophysiol* 78: 1504-1515.
- Renaud J, Emond M, Meilleur S, Psarropoulou C, Carmant L (2002). AIDA, a class I metabotropic glutamate-receptor antagonist limits kainate-induced hippocampal dysfunction. *Epilepsia* 43: 1306-1317.
- Represa A, Tremblay E, Ben-Ari Y (1987). Kainate binding sites in the hippocampal mossy fibers: localization and plasticity. *Neuroscience* 20: 739-748.
- Ribak CE (1978). Aspiny and sparsely-spiny stellate neurons in the visual cortex of rats contain glutamic acid decarboxylase. *J Neurocytol* 7: 461-478.

- Rivera C, Voipio J, Payne JA, Ruusuvuori E, Lahtinen H, Lamsa K, Pirvola U, Saarma M, Kaila K (1999). The K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* 397: 251-255.
- Rodriguez-Moreno A (2003). [Kainate receptors. Their function in the regulation of GABAergic synaptic transmission in the hippocampus]. *Rev Neurol* 36: 852-859.
- Rodriguez-Moreno A, Herreras O, Lerma J (1997). Kainate receptors presynaptically downregulate GABAergic inhibition in the rat hippocampus. *Neuron* 19: 893-901.
- Rodriguez-Moreno A, Lopez-Garcia JC, Lerma J (2000). Two populations of kainate receptors with separate signaling mechanisms in hippocampal interneurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 1293-1298.
- Rogawski MA (2006). Diverse mechanisms of antiepileptic drugs in the development pipeline. *Epilepsy Res* 69: 273-294.
- Romo-Parra H, Aceves J, Gutierrez R (2005). Tonic modulation of inhibition by dopamine D4 receptors in the rat hippocampus. *Hippocampus* 15: 254-259.
- Ropert N et Guy N (1991). Serotonin facilitates GABAergic transmission in the CA1 region of rat hippocampus in vitro. *J Physiol* 441: 121-136.
- Rutecki PA, Lebeda FJ, Johnston D (1987). 4-Aminopyridine produces epileptiform activity in hippocampus and enhances synaptic excitation and inhibition. *J Neurophysiol* 57: 1911-1924.
- Salt TE, Binns KE, Turner JP, Gasparini F, Kuhn R (1999). Antagonism of the mGlu5 agonist 2-chloro-5-hydroxyphenylglycine by the novel selective mGlu5 antagonist 6-methyl-2-(phenylethynyl)-pyridine (MPEP) in the thalamus. *Br J Pharmacol* 127: 1057-1059.

- Sanon N, Carmant L, Emond M, Congar P, Lacaille JC (2005). Short-term effects of kainic acid on CA1 hippocampal interneurons differentially vulnerable to excitotoxicity. *Epilepsia* 46: 837-848.
- Sanon N, Carmant L, Lacaille JC (2002). Conséquence fonctionnelle de la vulnérabilité sélective des interneurons O/A dans le modèle kainate de l'épilepsie. Congrès du Centre de recherche de l'hôpital Ste-Justine
- Sanon N, Pelletier J-G, Carmant L, Lacaille J-C (2010). Interneuron sub-type specific activation of mGluR1/5 during epileptiform activity in hippocampus. *Epilepsia* 51:1607-1618.
- Savarese TM et Fraser CM (1992). In vitro mutagenesis and the search for structure-function relationships among G protein-coupled receptors. *Biochem J* 283 ( Pt 1): 1-19.
- Sayin U, Sutula TP, Stafstrom CE (2004). Seizures in the developing brain cause adverse long-term effects on spatial learning and anxiety. *Epilepsia* 45: 1539-1548.
- Scantlebury MH, Ouellet PL, Psarropoulou C, Carmant L (2004). Freeze lesion-induced focal cortical dysplasia predisposes to atypical hyperthermic seizures in the immature rat. *Epilepsia* 45: 592-600.
- Scanziani M, Gahwiler BH, Charpak S (1998). Target cell-specific modulation of transmitter release at terminals from a single axon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 12004-12009.
- Scharfman HE (2007). The CA3 "backprojection" to the dentate gyrus. *Prog Brain Res* 163: 627-637.

- Schmid R, Tandon P, Stafstrom CE, Holmes GL (1999). Effects of neonatal seizures on subsequent seizure-induced brain injury. *Neurology* 53: 1754-1761.
- Schmitz D, Empson RM, Heinemann U (1995). Serotonin reduces inhibition via 5-HT<sub>1A</sub> receptors in area CA1 of rat hippocampal slices in vitro. *J Neurosci* 15: 7217-7225.
- Schmitz D, Frerking M, Nicoll RA (2000). Synaptic activation of presynaptic kainate receptors on hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron* 27: 327-338.
- Schmitz D, Mellor J, Frerking M, Nicoll RA (2001). Presynaptic kainate receptors at hippocampal mossy fiber synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 11003-11008.
- Schoepp DD, Goldsworthy J, Johnson BG, Salhoff CR, Baker SR (1994). 3,5-dihydroxyphenylglycine is a highly selective agonist for phosphoinositide-linked metabotropic glutamate receptors in the rat hippocampus. *J Neurochem* 63: 769-772.
- Schwarcz R, Zaczek R, Coyle JT (1978). Microinjection of kainic acid into the rat hippocampus. *Eur J Pharmacol* 50: 209-220.
- Schwartz RH, Eaton J, Bower BD, Aynsley-Green A (1989). Ketogenic diets in the treatment of epilepsy: short-term clinical effects. *Dev Med Child Neurol* 31: 145-151.
- Schwartzkroin PA et Mathers LH (1978). Physiological and morphological identification of a nonpyramidal hippocampal cell type. *Brain Res* 157: 1-10.
- Seal AJ, Irving AJ, Henley JM, Collingridge GL (1994). Stereoselective antagonism of the metabotropic glutamate receptor mGluR1 alpha by alpha-methyl-4-carboxyphenylglycine. *Biochem Soc Trans* 22: 138S-

- Seeburg PH (1993). The TiPS/TINS lecture: the molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends Pharmacol Sci* 14: 297-303.
- Segal M, Rogawski MA, Barker JL (1984). A transient potassium conductance regulates the excitability of cultured hippocampal and spinal neurons. *J Neurosci* 4: 604-609.
- Semyanov A et Kullmann DM (2001). Kainate receptor-dependent axonal depolarization and action potential initiation in interneurons. *Nat Neurosci* 4: 718-723.
- Shetty AK (2002). Entorhinal axons exhibit sprouting in CA1 subfield of the adult hippocampus in a rat model of temporal lobe epilepsy. *Hippocampus* 12: 534-542.
- Shigemoto R, Kinoshita A, Wada E, Nomura S, Ohishi H, Takada M, Flor PJ, Neki A, Abe T, Nakanishi S, Mizuno N (1997). Differential presynaptic localization of metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat hippocampus. *J Neurosci* 17: 7503-7522.
- Simmonds MA (1980). A site for the potentiation of GABA-mediated responses by benzodiazepines. *Nature*. Apr 10;284(5756):558-60.
- Sloviter RS, Dichter MA, Rachinsky TL, Dean E, Goodman JH, Sollas AL, Martin DL (1996). Basal expression and induction of glutamate decarboxylase and GABA in excitatory granule cells of the rat and monkey hippocampal dentate gyrus. *J Comp Neurol* 373: 593-618.
- Sloviter RS, Zappone CA, Harvey BD, Bumanglag AV, Bender RA, Frotscher M (2003). "Dormant basket cell" hypothesis revisited: relative vulnerabilities of dentate gyrus mossy cells and inhibitory interneurons after hippocampal status epilepticus in the rat. *J Comp Neurol* 459: 44-76.

- Smith BN et Dudek FE (1997). Enhanced population responses in the basolateral amygdala of kainate-treated, epileptic rats in vitro. *Neurosci Lett* 222: 1-4.
- Smolders I, Bortolotto ZA, Clarke VR, Warre R, Khan GM, O'Neill MJ, Ornstein PL, Bleakman D, Ogden A, Weiss B, Stables JP, Ho KH, Ebinger G, Collingridge GL, Lodge D, Michotte Y (2002). Antagonists of GLU(K5)-containing kainate receptors prevent pilocarpine-induced limbic seizures. *Nat Neurosci* 5: 796-804.
- Smolders I, Khan GM, Manil J, Ebinger G, Michotte Y (1997). NMDA receptor-mediated pilocarpine-induced seizures: characterization in freely moving rats by microdialysis. *Br J Pharmacol* 121: 1171-1179.
- Somera-Molina KC, Robin B, Somera CA, Anderson C, Stine C, Koh S, Behanna HA, Van Eldik LJ, Watterson DM, Wainwright MS (2007). Glial activation links early-life seizures and long-term neurologic dysfunction: evidence using a small molecule inhibitor of proinflammatory cytokine upregulation. *Epilepsia* 48: 1785-1800.
- Sommer W (1880). Erkrankung des Ammon's horn als aetiologis ches moment der epilepsien. *Arch Psychiatr Nurs* 10: 631-675.
- Somogyi P et Klausberger T (2005). Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. *J Physiol* 562: 9-26.
- Spehlmann R (1988). EEG Primer, 7th. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.
- Stafstrom CE (2006). Epilepsy: a review of selected clinical syndromes and advances in basic science. *J Cereb Blood Flow Metab* 26: 983-1004.
- Stafstrom CE, Chronopoulos A, Thurber S, Thompson JL, Holmes GL (1993). Age-dependent cognitive and behavioral deficits after kainic acid seizures. *Epilepsia* 34: 420-432.

- Staley KJ, Soldo BL, Proctor WR (1995). Ionic mechanisms of neuronal excitation by inhibitory GABAA receptors. *Science* 269: 977-981.
- Stefani A, Spadoni F, Bernardi G (1997). Differential inhibition by riluzole, lamotrigine, and phenytoin of sodium and calcium currents in cortical neurons: implications for neuroprotective strategies. *Exp Neurol* 147: 115-122.
- Stewart GR, Zorumski CF, Price MT, Olney JW (1990). Domoic acid: a dementia-inducing excitotoxic food poison with kainic acid receptor specificity. *Exp Neurol* 110: 127-138.
- Stoop R et Pralong E (2000). Functional connections and epileptic spread between hippocampus, entorhinal cortex and amygdala in a modified horizontal slice preparation of the rat brain. *Eur J Neurosci* 12: 3651-3663.
- Storm JF (1987). Action potential repolarization and a fast after-hyperpolarization in rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol* 385: 733-759.
- Storm JF (1988). Temporal integration by a slowly inactivating K<sup>+</sup> current in hippocampal neurons. *Nature* 336: 379-381.
- Stumm RK, Zhou C, Schulz S, Hollt V (2004). Neuronal types expressing mu- and delta-opioid receptor mRNA in the rat hippocampal formation. *J Comp Neurol* 469: 107-118.
- Sun L, Margolis FL, Shipley MT, Lidow MS (1998). Identification of a long variant of mRNA encoding the NR3 subunit of the NMDA receptor: its regional distribution and developmental expression in the rat brain. *FEBS Lett* 441: 392-396.
- Sutula TP (1991). Reactive changes in epilepsy: cell death and axon sprouting induced by kindling. *Epilepsy Res* 10: 62-70.

- Swanson LW, Wyss JM, Cowan WM (1978). An autoradiographic study of the organization of intrahippocampal association pathways in the rat. *J Comp Neurol* 181: 681-715.
- Szpirer C, Molne M, Antonacci R, Jenkins NA, Finelli P, Szpirer J, Riviere M, Rocchi M, Gilbert DJ, Copeland NG, . (1994). The genes encoding the glutamate receptor subunits KA1 and KA2 (GRIK4 and GRIK5) are located on separate chromosomes in human, mouse, and rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 11849-11853.
- Taylor CP et Dudek FE (1982). A physiological test for electrotonic coupling between CA1 pyramidal cells in rat hippocampal slices. *Brain Res* 235: 351-357.
- Tebano MT, Martire A, Rebola N, Pepponi R, Domenici MR, Gro MC, Schwarzschild MA, Chen JF, Cunha RA, Popoli P (2005). Adenosine A2A receptors and metabotropic glutamate 5 receptors are co-localized and functionally interact in the hippocampus: a possible key mechanism in the modulation of N-methyl-D-aspartate effects. *J Neurochem* 95: 1188-1200.
- Teyler TJ et DiScenna P (1984). The topological anatomy of the hippocampus: a clue to its function. *Brain Res Bull* 12: 711-719.
- Teyler TJ et DiScenna P (1985). The role of hippocampus in memory: a hypothesis. *Neurosci Biobehav Rev* 9: 377-389.
- Thompson SM, Capogna M, Scanziani M (1993). Presynaptic inhibition in the hippocampus. *Trends Neurosci* 16: 222-227.
- Thompson SM et Gahwiler BH (1989). Activity-dependent disinhibition. I. Repetitive stimulation reduces IPSP driving force and conductance in the hippocampus in vitro. *J Neurophysiol* 61: 501-511.

- Timofeev I, Grenier F, Steriade M (2002). The role of chloride-dependent inhibition and the activity of fast-spiking neurons during cortical spike-wave electrographic seizures. *Neuroscience* 114: 1115-1132.
- Topolnik L, Azzi M, Morin F, Kougioumoutzakis A, Lacaille JC (2006). mGluR1/5 subtype-specific calcium signalling and induction of long-term potentiation in rat hippocampal oriens/alveus interneurons. *J Physiol* 575: 115-131.
- Topolnik L, Chamberland S, Pelletier JG, Ran I, Lacaille JC (2009). Activity-dependent compartmentalized regulation of dendritic Ca<sup>2+</sup> signaling in hippocampal interneurons. *J Neurosci* 29: 4658-4663.
- Toth K, Wittner L, Urban Z, Doyle WK, Buzsaki G, Shigemoto R, Freund TF, Maglóczy Z (2007). Morphology and synaptic input of substance P receptor-immunoreactive interneurons in control and epileptic human hippocampus. *Neuroscience* 144: 495-508.
- Traub RD, Miles R, Wong RK (1989). Model of the origin of rhythmic population oscillations in the hippocampal slice. *Science* 243: 1319-1325.
- Traynelis SF et Dingledine R (1988). Potassium-induced spontaneous electrographic seizures in the rat hippocampal slice. *J Neurophysiol* 59: 259-276.
- Turski WA, Cavalheiro EA, Schwarz M, Czuczwar SJ, Kleinrok Z, Turski L (1983). Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res* 9: 315-335.
- Tuunanen J, Halonen T, Pitkanen A (1996). Status epilepticus causes selective regional damage and loss of GABAergic neurons in the rat amygdaloid complex. *Eur J Neurosci* 8: 2711-2725.

- van Hooft JA, Giuffrida R, Blatow M, Monyer H (2000). Differential expression of group I metabotropic glutamate receptors in functionally distinct hippocampal interneurons. *J Neurosci* 20: 3544-3551.
- Vignes M, Clarke VR, Davies CH, Chambers A, Jane DE, Watkins JC, Collingridge GL (1995). Pharmacological evidence for an involvement of group II and group III mGluRs in the presynaptic regulation of excitatory synaptic responses in the CA1 region of rat hippocampal slices. *Neuropharmacology* 34: 973-982.
- Vigot R, Barbieri S, Brauner-Osborne H, Turecek R, Shigemoto R, Zhang YP, Lujan R, Jacobson LH, Biermann B, Fritschy JM, Vacher CM, Muller M, Sansig G, Guetg N, Cryan JF, Kaupmann K, Gassmann M, Oertner TG, Bettler B (2006). Differential compartmentalization and distinct functions of GABAB receptor variants. *Neuron* 50: 589-601.
- Vigouroux R, Naquet R, Gastaut H (1953). [Cure of experimental amygdaloid epilepsy by resection of the lesioned focus under electrocorticographic control.]. *Rev Neurol (Paris)* 88: 574-578.
- Wang C, Shimizu-Okabe C, Watanabe K, Okabe A, Matsuzaki H, Ogawa T, Mori N, Fukuda A, Sato K (2002). Developmental changes in KCC1, KCC2, and NKCC1 mRNA expressions in the rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* 139: 59-66.
- Wang M, Bianchi R, Chuang SC, Zhao W, Wong RK (2007). Group I metabotropic glutamate receptor-dependent TRPC channel trafficking in hippocampal neurons. *J Neurochem* 101: 411-421.
- Wang YT, Zhang M, Neuman RS, Bieger D (1993). Somatostatin regulates excitatory amino acid receptor-mediated fast excitatory postsynaptic potential components in vagal motoneurons. *Neuroscience* 53: 7-9.

- Wasterlain CG (1997). Recurrent seizures in the developing brain are harmful. *Epilepsia* 38: 728-734.
- Wentholt RJ, Trumpy VA, Zhu WS, Petralia RS (1994). Biochemical and assembly properties of GluR6 and KA2, two members of the kainate receptor family, determined with subunit-specific antibodies. *J Biol Chem* 269: 1332-1339.
- Werner P, Voigt M, Keinänen K, Wisden W, Seeburg PH (1991). Cloning of a putative high-affinity kainate receptor expressed predominantly in hippocampal CA3 cells. *Nature* 351: 742-744.
- Westmoreland BF (1996). Epileptiform electroencephalographic patterns. *Mayo Clin Proc* 71: 501-511.
- Wieser HG (2003). Chapter 46: Limbic Status Epilepticus (Psychomotor Status). *Epilepsy: A comprehensive Textbook*. Wolters Kluwer Health.
- Williams S, Vachon P, Lacaille JC (1993). Monosynaptic GABA-mediated inhibitory postsynaptic potentials in CA1 pyramidal cells of hyperexcitable hippocampal slices from kainic acid-treated rats. *Neuroscience* 52: 541-554.
- Wilson RI, Kunos G, Nicoll RA (2001). Presynaptic specificity of endocannabinoid signaling in the hippocampus. *Neuron* 31: 453-462.
- Wisden W et Seeburg PH (1993). A complex mosaic of high-affinity kainate receptors in rat brain. *J Neurosci* 13: 3582-3598.
- Wong RK, Bianchi R, Chuang SC, Merlin LR (2005). Group I mGluR-induced epileptogenesis: distinct and overlapping roles of mGluR1 and mGluR5 and implications for antiepileptic drug design. *Epilepsy Curr* 5: 63-68.

- Woodhall G, Gee CE, Robitaille R, Lacaille JC (1999). Membrane potential and intracellular Ca<sup>2+</sup> oscillations activated by mGluRs in hippocampal stratum oriens/alveus interneurons. *J Neurophysiol* 81: 371-382.
- Woodson W, Nitecka L, Ben Ari Y (1989). Organization of the GABAergic system in the rat hippocampal formation: a quantitative immunocytochemical study. *J Comp Neurol* 280: 254-271.
- Wulff P, Ponomarenko AA, Bartos M, Korotkova TM, Fuchs EC, Bahner F, Both M, Tort AB, Kopell NJ, Wisden W, Monyer H (2009). Hippocampal theta rhythm and its coupling with gamma oscillations require fast inhibition onto parvalbumin-positive interneurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 3561-3566.
- Xiang Z, Huguenard JR, Prince DA (1998). Cholinergic switching within neocortical inhibitory networks. *Science* 281: 985-988.
- Xie Z et Sastry BR (1992). Actions of somatostatin on GABA-ergic synaptic transmission in the CA1 area of the hippocampus. *Brain Res* 591: 239-247.
- Yeckel MF et Berger TW (1990). Feedforward excitation of the hippocampus by afferents from the entorhinal cortex: redefinition of the role of the trisynaptic pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 5832-5836.
- Zilles K, Qu MS, Kohling R, Speckmann EJ (1999). Ionotropic glutamate and GABA receptors in human epileptic neocortical tissue: quantitative in vitro receptor autoradiography. *Neuroscience* 94: 1051-1061.
- Zucker RS (1989). Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 12: 13-31.