



HAL
open science

Contrôle homéostatique de l'activité corticale: Etude de la balance Excitation / Inhibition des neurones pyramidaux de couche 5 du cortex visuel.

Nicolas Le Roux

► **To cite this version:**

Nicolas Le Roux. Contrôle homéostatique de l'activité corticale: Etude de la balance Excitation / Inhibition des neurones pyramidaux de couche 5 du cortex visuel.. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Paris Sud - Paris XI, 2007. Français. NNT: . tel-00159415

HAL Id: tel-00159415

<https://theses.hal.science/tel-00159415>

Submitted on 3 Jul 2007

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

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

**UNIVERSITÉ PARIS XI
FACULTÉ DE MÉDECINE PARIS-SUD**

Année 2006-2007

N°

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS XI

spécialité : Signalisations, Neurosciences, Endocrinologie, Reproduction

présentée et soutenue publiquement

par

Nicolas LE ROUX

le 21 juin 2007

Titre

Contrôle homéostatique de l'activité corticale :

**Etude de la balance Excitation / Inhibition des neurones pyramidaux de
couche 5 du cortex visuel**

Directeur de thèse : **Dr. Philippe FOSSIER**

JURY

M. Hervé DANIEL	Président
M. Bertrand LAMBOLEZ	Rapporteur
M. Jean-Luc GAIARSA	Rapporteur
Mme. Anne JOUVENCEAU	Examinatrice
M. Marc PANANCEAU	Examineur
M. Philippe FOSSIER	Directeur de thèse

Contrôle homéostatique de l'activité corticale :
Etude de la balance Excitation / Inhibition des neurones pyramidaux de
couche 5 du cortex visuel

Homeostatic control of cortical activity:
Study of the Excitation / Inhibition balance of layer 5 pyramidal neurons in
visual cortex

RÉSUMÉ : La plasticité homéostatique est un processus qui consiste à réguler l'efficacité globale des entrées synaptiques (excitatrices et inhibitrices) sur un neurone afin d'empêcher des modifications trop importantes de son niveau d'activité. Afin de caractériser les mécanismes à l'origine de ce processus, la balance Excitation/Inhibition des neurones pyramidaux de couche 5 du cortex visuel a été estimée. Elle est composée de 20 % d'excitation et de 80 % d'inhibition. A l'aide de protocoles de stimulation induisant des changements à long terme de l'efficacité des entrées synaptiques, les phénomènes de potentiation homéostatique et de dépression homéostatique ont été mis en évidence. L'induction de ces phénomènes, qui requiert l'activation de récepteurs NMDA et d'un signal NO, est sous le contrôle des systèmes inhibiteurs GABAergique et glycinergique. La récurrence entre signaux excitateurs et inhibiteurs apparaît comme l'élément clé de la régulation de l'activité neuronale.

DISCIPLINE : Neurobiologie

MOTS-CLÉS : balance Excitation/Inhibition, plasticité homéostatique, neurones pyramidaux, cortex, réseaux neuronaux, interactions récurrentes.

SUMMARY: The process of homeostatic plasticity consists in the regulation of the strength of excitatory and inhibitory neuronal inputs in order to prevent a deregulation of neuronal activity. To characterize the mechanisms underlying this process, the Excitation/Inhibition balance of cortical layer 5 pyramidal neurons was estimated. It is composed by 20 % of excitation and 80 % of inhibition. Using stimulation protocols inducing long term changes of the strength of neuronal inputs, the processes of homeostatic potentiation and homeostatic depression were observed. Their induction, which requires the activation of NMDA receptors and a NO signal, is controlled by inhibitory GABAergic and glycinergic systems. The recurrence between excitatory and inhibitory circuits appears as the key element of the regulation of neuronal activity.

KEYWORDS: Excitation/Inhibition balance, homeostatic plasticity, pyramidal neurons, cortex, neuronal networks, recurrent interactions.

ADRESSE DU LABORATOIRE : Institut de Neurobiologie Alfred Fessard – FRC2118

Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire – UPR9040, CNRS

91198 Gif sur Yvette cedex

Ce travail a été réalisé sous la direction du Dr. Philippe Fossier, dans le laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire (CNRS, Gif-sur-Yvette) dirigé par le Dr. Gérard Baux.

Je tiens à remercier tout particulièrement le Dr. Philippe Fossier pour m'avoir accueilli au sein de son équipe depuis mon stage de DEA et de m'avoir formé à la recherche scientifique. Je le remercie pour sa disponibilité, son écoute, ses conseils et pour m'avoir toujours donné les moyens de travailler dans de bonnes conditions. Je tiens à lui exprimer toute ma gratitude et mon amitié.

Je remercie également le Dr. Muriel Amar pour son assistance technique et sa disponibilité de tous les instants.

Je remercie aussi le Dr. Jordi Molgó sans qui la réalisation de cette thèse n'aurait pas été possible.

Je remercie également tout spécialement les Drs. Evelyne Benoît et Seana O'Regan pour leur bravoure face à la lecture de certains de mes articles. Leurs critiques m'auront été d'une aide précieuse.

Un grand merci au Dr. Jean-Pierre Mothet pour son aide et ses conseils.

Je remercie également tous les membres du laboratoire chercheurs, ingénieurs ou étudiants avec une pensée particulière pour Emmanuelle, Pierre, Hua, Sabine, Stéphane, Nathalie, Martine, Gilles...

Je remercie également tout particulièrement Cendrine Lecardeur, Morgane Roulot, Bernadette Wiszniowsky, Patrick Parra ou encore Jean-Yves Tiercelin sans qui mon travail n'aurait pas été possible.

Je ne voudrais surtout pas oublier de remercier, pour leur bonne humeur, les membres de l'INAF que sont ou qu'étaient Suzie Pagel, Elise Alvaro Diaz et Pascal Abbas. Qu'ils soient assurés de ma sincère amitié.

Un autre grand merci pour mon « exceptionnel » collègue de travail Alexandre Moreau, qui a illuminé bon nombre de mes journées de par sa seule présence.

Enfin, un grand merci à mes parents et mes sœurs pour leur soutien sans faille.

A la mémoire du Football Club de Nantes Atlantique (1963-2007)

Table des matières

Table des illustrations.....	10
Liste des principales abréviations.....	12
Introduction.....	13
I. Le cortex cérébral.....	14
A) Organisation du cortex visuel.....	14
1. Organisation morphologique.....	14
2. Traitement de l'information.....	17
B) Les réseaux neuronaux corticaux.....	19
1. Les réseaux excitateurs corticaux.....	19
a) Les neurones excitateurs.....	19
b) Les projections excitatrices interlaminaires corticales :.....	21
2. Les réseaux inhibiteurs corticaux.....	21
a) D'un point de vue anatomique.....	21
b) D'un point de vue électrophysiologique.....	24
c) D'un point de vue neurochimique.....	26
d) D'un point de vue fonctionnel.....	27
3. Les connexions corticales.....	29
II. L'intégration corticale.....	31
A) La transmission synaptique.....	31
B) intégration dendritique.....	33
1. La partie distale de la dendrite apicale.....	33
a) Les signaux excitateurs.....	33
b) Les signaux inhibiteurs.....	36
2. La propagation des signaux le long de la dendrite apicale.....	40
a) Rôle des canaux dendritiques sensibles au potentiel.....	40
b) Les différents signaux dépolarisants.....	41
c) Le contrôle dendritique de l'amplitude des signaux.....	41
3. La partie basale proximale de la dendrite apicale.....	42
III. Balance excitation / inhibition.....	43
A) La balance E/I au cours du développement des connexions corticales.....	43
B) Importance physiologique de la balance E/I.....	44
IV. La plasticité synaptique.....	44
A) La plasticité des synapses excitatrices.....	46
1. La potentiation à long terme (LTP).....	46

a)	Induction de la LTP	46
b)	Expression de la LTP	49
c)	Maintien de la LTP.....	52
2.	La dépression à long terme (LTD).....	53
a)	Induction de la LTD	53
b)	Expression de la LTD.....	55
c)	Maintien de la LTD	57
3.	Induction différentielle de la LTP ou de la LTD au niveau des synapses excitatrices.....	58
a)	La fréquence de stimulation	58
b)	La synchronisation des activités présynaptique et postsynaptique	58
c)	L'hypothèse NMDA.....	60
4.	Modulateurs de la plasticité	62
B)	La plasticité des synapses inhibitrices.....	63
1.	Induction de la plasticité des synapses inhibitrices.....	63
a)	La fréquence de stimulation	65
b)	La dépolarisation postsynaptique	65
c)	Le signal calcique.....	67
2.	Mécanismes cellulaires à la base de l'induction de la plasticité des synapses inhibitrices..	67
a)	La potentiation à long terme.....	67
b)	La dépression à long terme.....	68
3.	Induction différentielle de la LTP ou de la LTD au niveau des synapses inhibitrices.....	68
4.	Importance fonctionnelle des synapses inhibitrices.....	69
a)	Les connexions inhibitrices et le modelage des réponses neuronales	69
b)	La synchronisation de l'activité des réseaux neuronaux par les interneurons..	70
c)	Les synapses GABAergiques et l'épileptogénèse	72
C)	La plasticité homéostatique	73
1.	Définition	73
2.	Mise en évidence de la plasticité homéostatique	75
a)	Mise en évidence au niveau de synapses excitatrices	75
b)	Mise en évidence au niveau de synapses inhibitrices	76
c)	Mise en évidence au niveau d'un réseau neuronal.....	78
	<i>Objectifs du travail.....</i>	<i>81</i>

Matériels et Méthodes.....83

I.	Le patch des neurones sur tranche de cortex visuel	83
II.	Enregistrements électrophysiologiques.....	87
A)	Acquisition	87
B)	Enregistrement en mode courant imposé	87

C)	Enregistrement en mode voltage imposé	89
III.	Analyse de la réponse.....	92
A)	Paramètres liés à la technique d'enregistrement.	92
1.	Le potentiel de jonction de liquide.....	92
2.	La dérive du potentiel de l'électrode.....	93
3.	La résistance série	93
B)	Paramètres liés aux propriétés des neurones enregistrés.....	94
1.	Les caractéristiques intrinsèques du neurone	94
2.	La relation courant/voltage	94
C)	Décomposition de la réponse synaptique	95
1.	Principe de la décomposition	95
2.	Les paramètres de la décomposition	95
3.	La décomposition de la réponse synaptique	96
D)	Les paramètres caractérisant la réponse	101
1.	Les variations de conductance	101
2.	Détermination des latences	103
3.	La balance des conductances excitatrice et inhibitrice	103
4.	Reconstitution de la réponse en voltage.....	103
5.	Le facteur M.....	103
E)	Analyse statistique.....	105
IV.	Marquages immunocytochimiques	105

Résultats.....107

I.	Etude du contrôle homéostatique de la balance excitation/inhibition des neurones pyramidaux de couche 5 du cortex.....	107
A)	Position du problème.....	107
B)	Résultats	108
C)	Conclusions	121
II.	Etude de l'implication du système inhibiteur GABAergique dans le contrôle homéostatique de la balance excitation/inhibition des neurones pyramidaux de couche 5. ..	123
A)	Position du problème.....	123
B)	Résultats	124
1.	Implication des récepteurs GABA _A dans le contrôle homéostatique de la balance Excitation / Inhibition des neurones pyramidaux de couche 5 du cortex.....	124
2.	Marquages immunocytochimiques des récepteurs GABA _A contenant la sous-unité δ	151
3.	Rôle des récepteurs GABA _B dans la régulation de la balance E/I	153
4.	Rôle des récepteurs GABA _B dans la potentiation homéostatique	155
C)	Conclusions	157
1.	Le contrôle GABAergique de la balance E/I	157

2.	Le contrôle GABAergique de la potentiation homéostatique	157
3.	Les mécanismes du contrôle inhibiteur de l'activité corticale	158
III.	Etude du rôle des récepteurs NMDA dans l'induction de la plasticité homéostatique. .	160
A)	Position du problème.....	160
B)	Résultats	161
1.	Rôles des sous-unités NR2A et NR2B des récepteurs NMDA dans la potentiation homéostatique des afférences excitatrices et inhibitrices.	161
2.	Rôles des co-agonistes D-serine et glycine de la sous-unité NR1 des récepteurs NMDA dans la potentiation homéostatique des afférences excitatrices et inhibitrices.	189
C)	Conclusions	213
1.	Les récepteurs NMDA	213
2.	Les récepteurs glycinergiques	214
3.	Les gliotransmetteurs	214
IV.	Etude du rôle du monoxyde d'azote dans les processus corticaux.	215
A)	Position du problème.....	215
B)	Résultats	216
C)	Conclusions	231
1.	Le NO et la régulation de la balance E/I.....	231
2.	Le NO et la potentiation homéostatique des signaux excitateurs et inhibiteurs.....	231

Discussion - Perspectives.....233

I.	La régulation de la balance E/I.....	233
A)	Le contrôle inhibiteur de la balance E/I	234
B)	L'inhibition shuntante	234
II.	La plasticité homéostatique	236
A)	La potentiation homéostatique	236
1.	Les récepteurs NMDA et la potentiation homéostatique	236
2.	La synthèse de NO et la potentiation homéostatique	236
B)	La dépression homéostatique	237
1.	L'induction de la dépression homéostatique.....	237
2.	Les récepteurs NMDA et la dépression homéostatique	239
C)	Le contrôle de la plasticité homéostatique	240
1.	Le contrôle inhibiteur de la plasticité homéostatique	240
a)	Les récepteurs GABA _A et la potentiation homéostatique	240
b)	Les récepteurs GABA _B , glycinergiques et la potentiation homéostatique.....	241
2.	Le contrôle glial de la plasticité homéostatique.....	241
III.	Conclusions - Perspectives.....	242

Bibliographie.....245

Table des illustrations

- Figure 1** : Schéma d'une coupe sagittale de cerveau d'Homme et de rat (*P. 15*)
- Figure 2** : Schéma du transit des informations visuelles jusqu'au cortex visuel primaire dans le cerveau des mammifères (*P. 15*)
- Figure 3** : Schéma de l'organisation corticale (*P. 16*)
- Figure 4** : Projections cholinergiques et sérotoninergiques (*P. 18*)
- Figure 5** : Répartition des cellules excitatrices dans le cortex visuel de rat (*P. 20*)
- Figure 6** : Exemple de 5 classes d'interneurones inhibiteurs corticaux (*P. 22*)
- Figure 7** : Les interneurones GABAergiques corticaux (*P. 23*)
- Figure 8** : Les différents profils de décharge des interneurones GABAergiques corticaux (*P. 25*)
- Figure 9** : Expression des protéines liant le calcium et des neuropeptides dans les interneurones (*P. 28*)
- Figure 10** : Les connexions entre les neurones corticaux (*P. 30*)
- Figure 11** : La transmission synaptique chimique et électrique (*P. 32*)
- Figure 12** : Les différentes zones dendritiques d'un neurone pyramidal de couche 5 du cortex (*P. 34*)
- Figure 13** : Structure des récepteurs glutamatergiques (*P. 35*)
- Figure 14** : Structure des récepteurs GABAergiques (*P. 37*)
- Figure 15** : Structure des récepteurs glycinergiques (*P. 38*)
- Figure 16** : Rôle des signaux inhibiteurs dans la propagation du signal au niveau dendritique (*P. 39*)
- Figure 17** : Schéma de l'induction de la LTP (*P. 47*)
- Figure 18** : Variation de la concentration calcique le long de la dendrite apicale suite à l'application d'une stimulation à haute fréquence (*P. 48*)
- Figure 19** : Induction de la LTD au niveau des neurones pyramidaux de la région CA1 de l'hippocampe (*P. 54*)
- Figure 20** : Les principaux sites de phosphorylation des récepteurs AMPA (*P. 56*)
- Figure 21** : Schéma de l'induction différentielle des phénomènes de LTD ou de LTP (*P. 59*)
- Figure 22** : Structure des récepteurs NMDA (*P. 61*)
- Tableau 1** : Répertoire des gliotransmetteurs (*P. 64*)
- Figure 23** : La plasticité des synapses inhibitrices des neurones pyramidaux de l'hippocampe (*P. 66*)

Figure 24 : Contrôle homéostatique (P. 74)

Figure 25 : Régulation homéostatique de la transmission synaptique excitatrice des neurones pyramidaux corticaux (P. 77)

Figure 26 : Régulation homéostatique de l'activité des synapses excitatrices et inhibitrices d'un neurone pyramidal cortical (P. 80)

Figure 27 : Schéma des différentes étapes pour la réalisation d'enregistrements *in vitro* sur tranches de cortex visuel de rat (P. 84)

Figure 28 : Enregistrement par la technique de patch-clamp en configuration cellule entière d'un neurone pyramidal (P. 86)

Figure 29 : Protocole de stimulation en mode courant imposé et compensation de la résistance série (P. 88)

Figure 30 : Les profils de décharges des neurones pyramidaux et des interneurons (P. 90)

Figure 31 : Représentation schématique des différents circuits excitateurs et inhibiteurs activés par les stimulations en couche 2/3, 4 ou 6 (P. 91)

Figure 32 : Détermination de la conductance au repos et de la conductance synaptique (P. 97)

Figure 33 : Détermination des composantes excitatrice et inhibitrice de la réponse neuronale suite à une stimulation électrique d'une couche corticale (P. 98)

Figure 34 : Détermination des potentiels d'inversion de l'inhibition GABAergique et de l'excitation AMPA (P. 99)

Figure 35 : Evolution des changements de conductance d'un neurone pyramidal de couche 5 en réponse à une stimulation électrique et les valeurs du potentiels d'inversion synaptique associé (P. 100)

Figure 36 : Décomposition de la réponse synaptique en ses composantes excitatrice et inhibitrice (P. 102)

Figure 37 : Reconstitution de la réponse en voltage (P. 104)

Figure 38 : Marquage immunocytochimique des récepteurs GABA_A contenant la sous-unité δ (P. 152)

Figure 39 : Effets du blocage des récepteurs GABA_B sur la balance E/I des neurones pyramidaux de couche 5 (P. 154)

Figure 40 : Application d'un protocole de HFS en présence de 10 mM de CGP 52-432 (P. 156)

Liste des principales abréviations utilisées

AMPA : α -Amino-3-hydroxy-5-méthylisozazol-4-propionate

AP-5 : 2-amino-5-phosphonopentanoate

Balance E/I : balance Excitation/Inhibition

BDNF : facteur neurotrophique cérébral

CamKII : kinase calmoduline II

CCK : cholécystokinine

CNQX : 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione

CPSE : courant postsynaptique excitateur

CPSI : courant postsynaptique inhibiteur

Erest : « resting potential », potentiel de repos

GABA : acide gamma amino butyrique

GMPC : guanosine monophosphate cyclique

HFS : stimulation à haute fréquence

IntgE : Intégrale du changement de conductance excitatrice

IntgI : Intégrale du changement de conductance inhibitrice

IntgT : Intégrale du changement de conductance totale

LTD : « long term depression », dépression à long terme

LTDe : dépression à long terme de l'excitation

LTDi : dépression à long terme de l'inhibition

LTP : « long term potentiation », potentiation à long terme

LTPe : potentiation à long terme de l'excitation

LTPi : potentiation à long terme de l'inhibition

NMDA : N-méthyl-D-aspartate

NO : monoxyde d'azote

NOS : NO-synthase

PA : potentiel d'action

PKA : protéine kinase A

PP1 : protéine phosphatase 1

PPSE : potentiel postsynaptique excitateur

PPSI : potentiel postsynaptique inhibiteur

Récepteur mGlu : récepteur métabotrope glutamatergique

SNC : système nerveux central

TTX : tetrodotoxine

Introduction

Le cortex cérébral est une zone de traitement de l'ensemble des stimuli sensoriels perçus par un individu. La fonction corticale est assurée par des réseaux neuronaux spécialisés qui reçoivent, intègrent et stockent l'information. Leur fonction physiologique est de générer des signaux de sortie qui soient adaptés aux stimuli perçus. Le niveau d'activité basal (niveau d'excitabilité) des réseaux neuronaux est défini par la balance entre les entrées excitatrices et inhibitrices (balance E/I) reçues. Par conséquent, la régulation de la balance E/I est capitale pour le bon fonctionnement des processus corticaux. Un déséquilibre de la balance E/I est à l'origine de diverses pathologies neurologiques comme l'épilepsie, l'autisme ou encore la schizophrénie.

Toutefois, les réseaux corticaux doivent répondre à deux exigences : conserver un niveau d'activité fonctionnel c'est-à-dire maintenir une balance E/I stable mais être également capables d'intégrer de nouvelles informations. Cette fonction est assurée par des changements d'efficacité de la transmission synaptique des entrées excitatrices et/ou inhibitrices en réponse à des stimuli et traduit les phénomènes d'apprentissage et de mémorisation. Dans ces conditions, il est donc primordial de comprendre comment est réalisé le contrôle de la balance E/I des neurones corticaux et quels sont les différents mécanismes impliqués dans cette régulation.

Pour répondre à cette question, je me suis intéressé au contrôle de la balance E/I des neurones pyramidaux de couche 5 du cortex visuel de rat. Ces neurones élaborent les signaux de sortie du cortex et leur niveau d'excitabilité dépend des différents signaux excitateurs et inhibiteurs qui leur sont transmis par les réseaux neuronaux corticaux en amont. De nombreux travaux ont pour objet la régulation de la balance E/I, mais seules les études « computationnelles » ont modélisé cette balance en tenant compte des interactions fonctionnelles réciproques entre les composantes excitatrice et inhibitrice. Les études expérimentales ont pour la plupart été faites en utilisant des bloquants pharmacologiques d'une composante afin d'étudier la régulation de l'autre composante, perdant du même coup les interactions régulatrices réciproques. Pour étudier la balance E/I tout en préservant les interactions entre réseaux excitateurs et inhibiteurs, une méthode d'analyse de la réponse enregistrée dans un neurone pyramidal de couche 5 à la suite de la stimulation d'une couche corticale a été mise au point. Cette méthode permet de déterminer le poids des composantes excitatrice et inhibitrice d'une réponse synaptique.

Mes travaux m'ont permis de mettre en évidence une régulation homéostatique de la balance E/I des neurones pyramidaux de couche 5 du cortex visuel de rat qui permet à ces neurones de

contrôler leur niveau d'excitabilité. Cette régulation homéostatique dépend à la fois de l'organisation récurrente des circuits corticaux excitateurs et inhibiteurs et à la fois de mécanismes de régulation de l'intégration de ces signaux au niveau des neurones pyramidaux. Je commencerai par conséquent par présenter l'organisation du cortex visuel et l'état des connaissances sur les mécanismes d'intégration de l'information reçue par les neurones pyramidaux qui permettent de réguler leur balance E/I. Je discuterai ensuite l'importance de la plasticité homéostatique qui permet d'expliquer comment les réseaux neuronaux sont capables d'intégrer de nouvelles informations sans pour autant entraîner de changements de l'excitabilité corticale globale.

I. Le cortex cérébral

Le cortex cérébral humain ([figure 1](#)) est composé de différentes aires spécifiques (visuelles, auditives...) qui contrôlent des fonctions particulières comme la somesthésie, le mouvement ou encore l'apprentissage. Le cortex visuel a fait l'objet de nombreuses études qui ont permis sa caractérisation morpho-fonctionnelle.

A) Organisation du cortex visuel

Le traitement de l'information visuelle commence au niveau de la rétine où l'image perçue est décomposée à travers des filtres visuels pour élaborer un « signal visuel ». Chez les mammifères, ce message visuel est ensuite transmis aux noyaux géniculés latéraux du thalamus (LGN). Finalement, l'information est relayée au niveau du cortex visuel primaire (V1, [figures 1 et 2](#)) à partir duquel des connexions sont réalisées avec les autres structures visuelles corticales et sous-corticales.

1. Organisation morphologique

Le cortex possède une organisation laminaire (organisation horizontale) en 6 couches distinctes ([figure 3](#)) :

1. couche moléculaire: contient essentiellement des fibres (axones et dendrites).
2. couche granulaire externe: neurones granulaires (couche réceptrice).
3. couche pyramidale externe : cellules pyramidales (couche effectrice).
4. couche granulaire interne (couche réceptrice).
5. couche pyramidale interne (couche effectrice).
6. couche polymorphe (couche réceptrice).

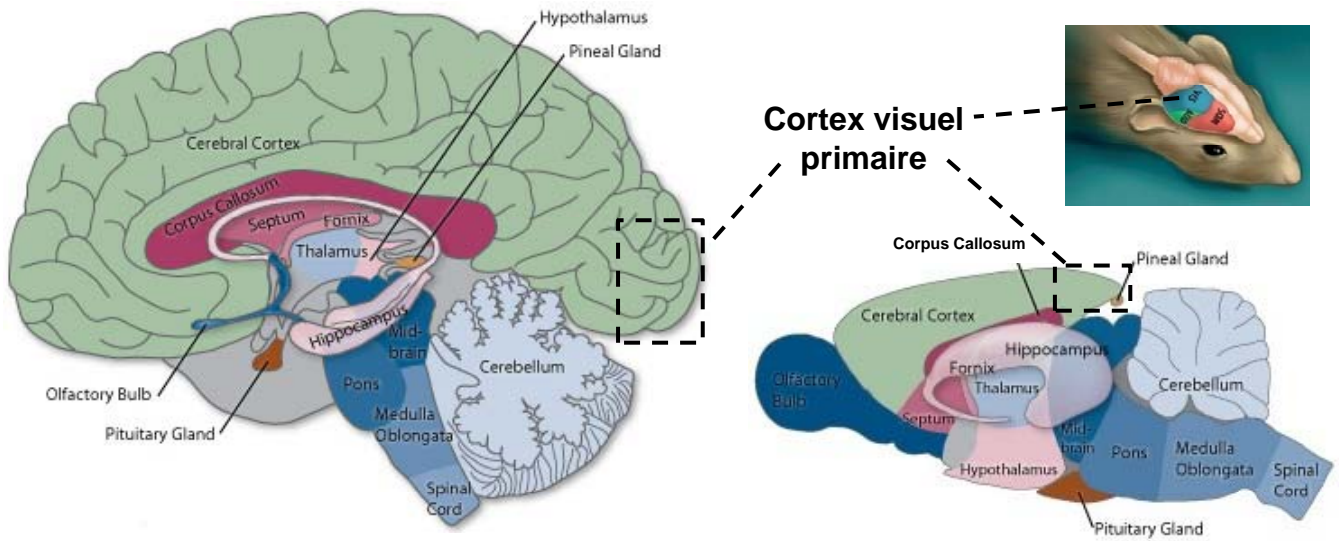


Figure 1. Schéma d'une coupe sagittale de cerveau d'Homme et de rat.

Localisation des principales structures cérébrales et du cortex visuel primaire chez l'Homme et le rat.

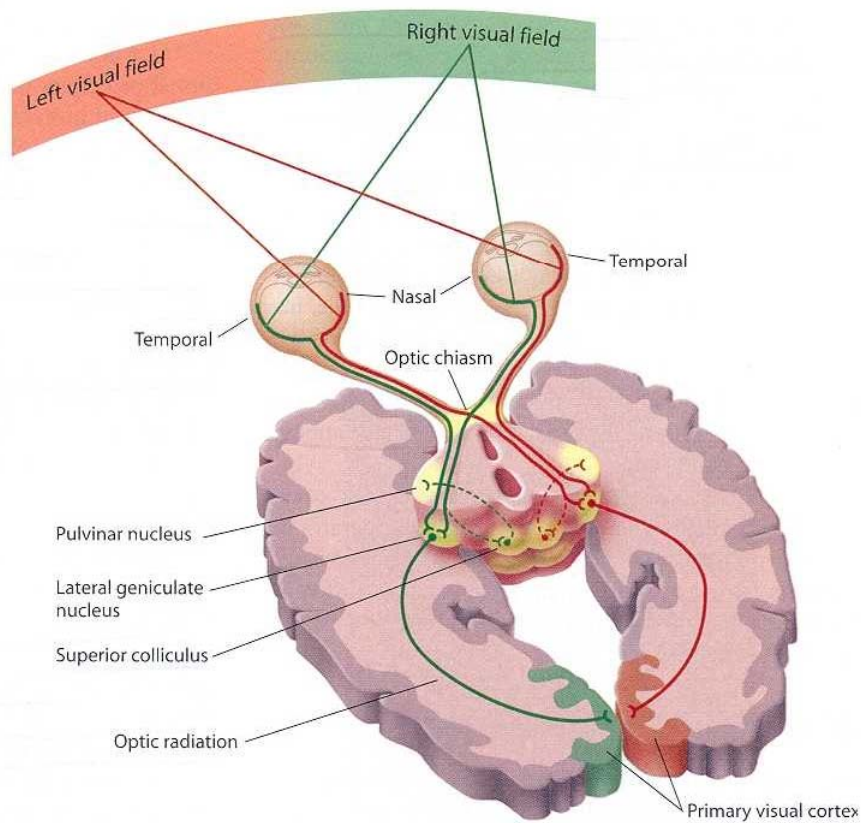


Figure 2. Schéma du transit des informations visuelles jusqu'au cortex visuel primaire dans le cerveau de mammifères.

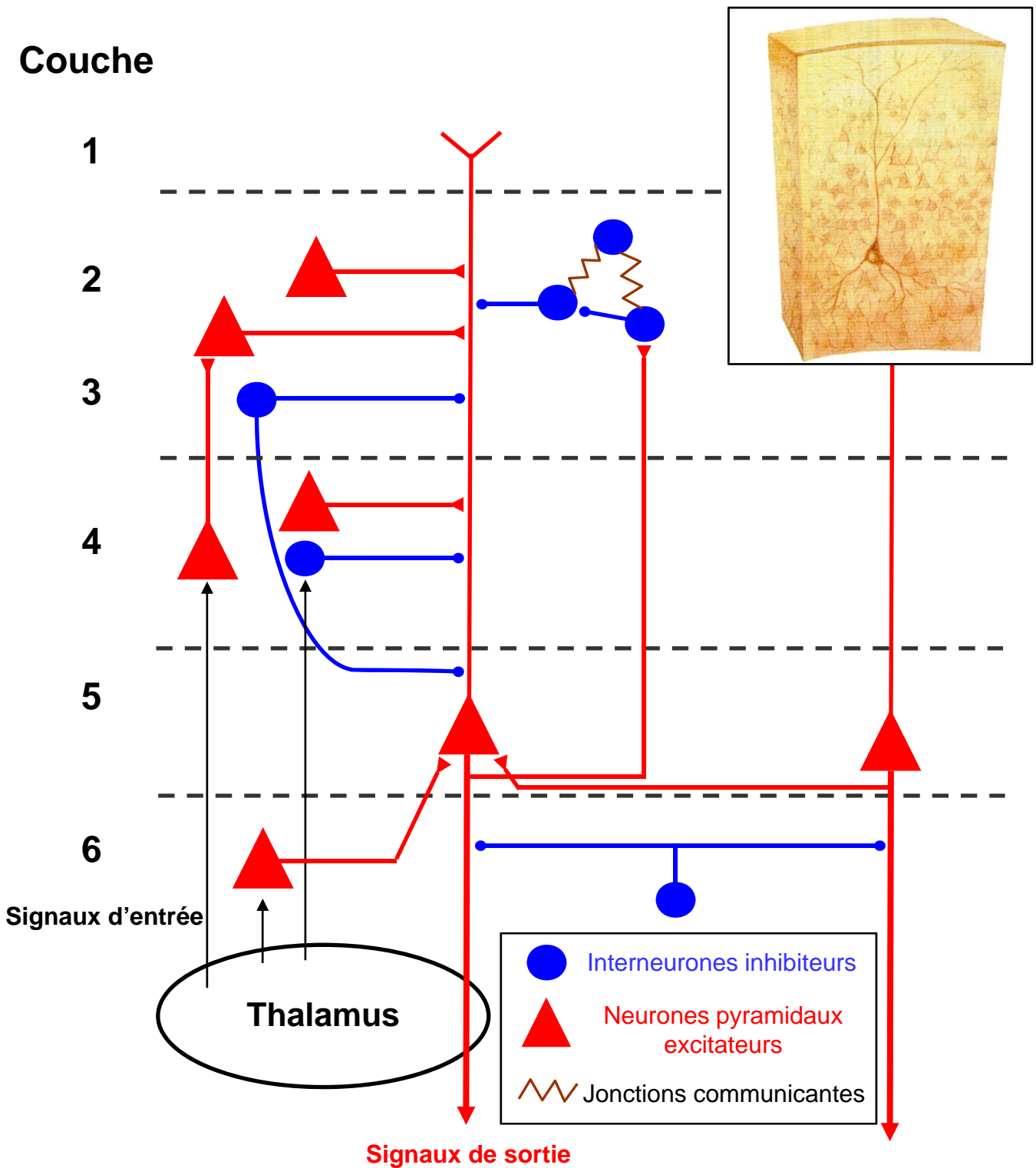


Figure 3. Schéma de l'organisation corticale.

Les entrées thalamiques innervent le cortex visuel en couche 6 et 4. Les neurones de la couche 4 activés vont notamment innervent les réseaux neuronaux excitateurs et inhibiteurs de couche 2/3. Les neurones pyramidaux de couche 5 sont connectés entre eux et reçoivent le long de leur dendrite apicale des signaux excitateurs et inhibiteurs provenant des différentes couches corticales.

L'unité fonctionnelle corticale de traitement des informations transmises par le thalamus est appelée « colonne » (Rockland, 1998). Une « colonne » corticale est centrée autour d'un neurone pyramidal de couche 5 qui possède une longue dendrite apicale qui projette jusqu'en couche 1 et qui confère une organisation verticale au cortex.

Néanmoins, le cortex possède également une « organisation horizontale » due à la répartition des différentes populations neuronales.

2. Traitement de l'information

Un certain nombre de circuits neuronaux excitateurs et inhibiteurs sont activés au niveau de couches corticales spécifiques (4, 6 et/ou 2/3) (Thomson & Bannister, 2003 ; Silberberg et al., 2005) en réponse à l'arrivée des afférences thalamiques. Les signaux excitateurs et/ou inhibiteurs générés au niveau des circuits de couche 4 sont principalement transmis en couche 2/3 (figure 4). Les signaux excitateurs et inhibiteurs résultants sont alors transmis aux neurones pyramidaux de couche 5 par contacts synaptiques au niveau dendritique, somatique et/ou axonal (Gilbert, 1993 ; Bannister, 2005 ; Silberberg et al., 2005). Le neurone pyramidal intègre à son tour ces signaux pour élaborer un signal de sortie dirigé vers les aires visuelles associatives.

Les signaux sensoriels peuvent être modulés à plusieurs niveaux :

- par l'organisation des réseaux neuronaux excitateurs et inhibiteurs qui établissent des connexions récurrentes (Maffei et al., 2004 ; Bannister, 2005).
- par des afférences provenant d'autres aires corticales. Le cortex visuel reçoit par exemple des rétro-projections en couche 1 des aires visuelles associatives (Rockland & Drash, 1996).
- par la libération par les cellules corticales de neuropeptides spécifiques (Gallopín et al., 2006).
- par des systèmes neuromodulateurs spécifiques. Le cortex visuel reçoit de nombreuses fibres provenant de régions localisées libérant des neuromédiateurs particuliers comme, par exemple, des fibres sérotoninergiques provenant du raphé ou des fibres cholinergiques provenant du noyau basal magnocellulaire (figure 4).

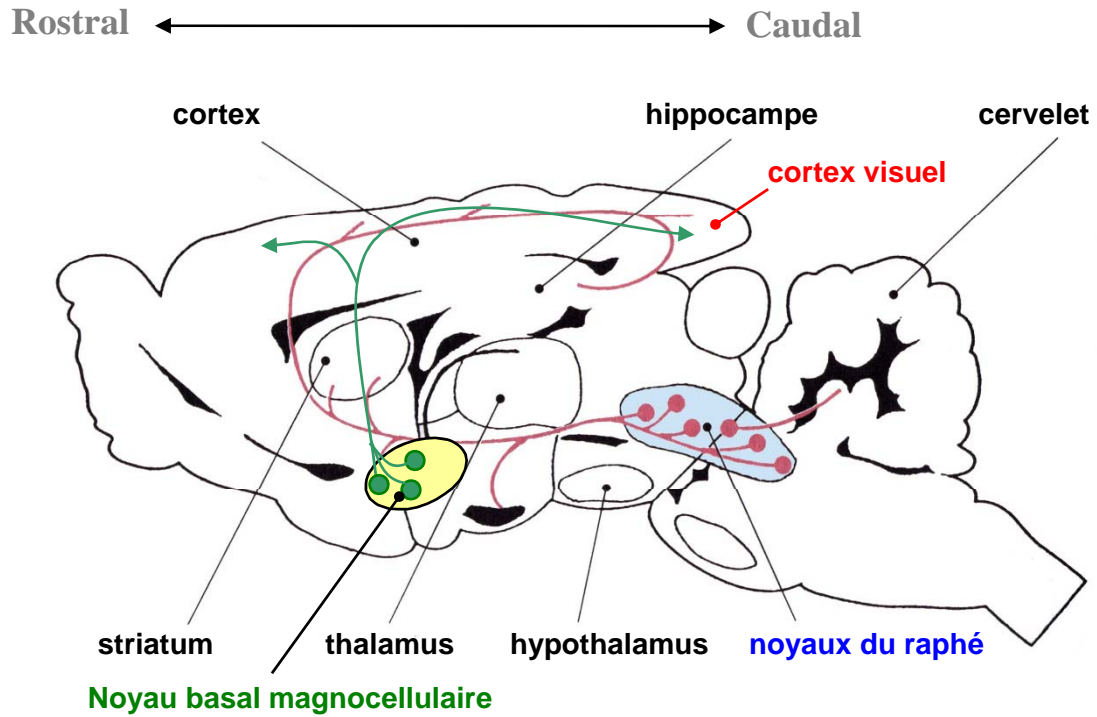


Figure 4. Projections cholinergiques et sérotoninergiques.

Projections des fibres cholinergiques (vert) des noyaux magnocellulaires et des fibres sérotoninergiques (rouge) des noyaux du raphé au niveau du cortex visuel de rat.

B) Les réseaux neuronaux corticaux

Le cortex est composé essentiellement de deux populations de neurones : les neurones excitateurs glutamatergiques qui représentent environ 80 % de la population neuronale totale (Peters & Kara, 1985b) et les interneurons inhibiteurs GABAergiques qui représentent les 20 % restants (Peters & Kara, 1985a).

Les neurones excitateurs sont interconnectés entre eux par des synapses chimiques, les interneurons inhibiteurs d'un même type sont interconnectés entre eux par des synapses chimiques et/ou électriques. On parle de microcircuits excitateurs et inhibiteurs. Un microcircuit est défini comme une entité composée d'un nombre minimum de neurones partageant des propriétés communes, interagissant entre eux et qui peuvent collectivement produire un signal fonctionnel (Silberberg et al., 2005).

Ainsi, au niveau du cortex, le signal visuel est traité par des circuits neuronaux spécifiques et transite par des voies spécialisées qui dépendent de la nature des connexions neuronales.

1. Les réseaux excitateurs corticaux

a) Les neurones excitateurs

Bien qu'il soit relativement admis que les neurones excitateurs forment une population homogène, il faut distinguer deux types de cellules excitatrices, les cellules pyramidales et les cellules étoilées (figure 5).

Les neurones pyramidaux sont distribués dans les couches 2 à 6, ils sont caractérisés par un corps cellulaire en forme de pyramide dont la taille varie selon leur localisation, des dendrites proximales ramifiées et une longue dendrite apicale qui projette le plus souvent verticalement en direction de la couche 1 et qui reçoit des afférences des couches superficielles (Figure 5, Bannister, 2005).

Les cellules étoilées se trouvent exclusivement en couche 4 (Bannister, 2005) et, contrairement aux cellules pyramidales ne possèdent pas de dendrite apicale.

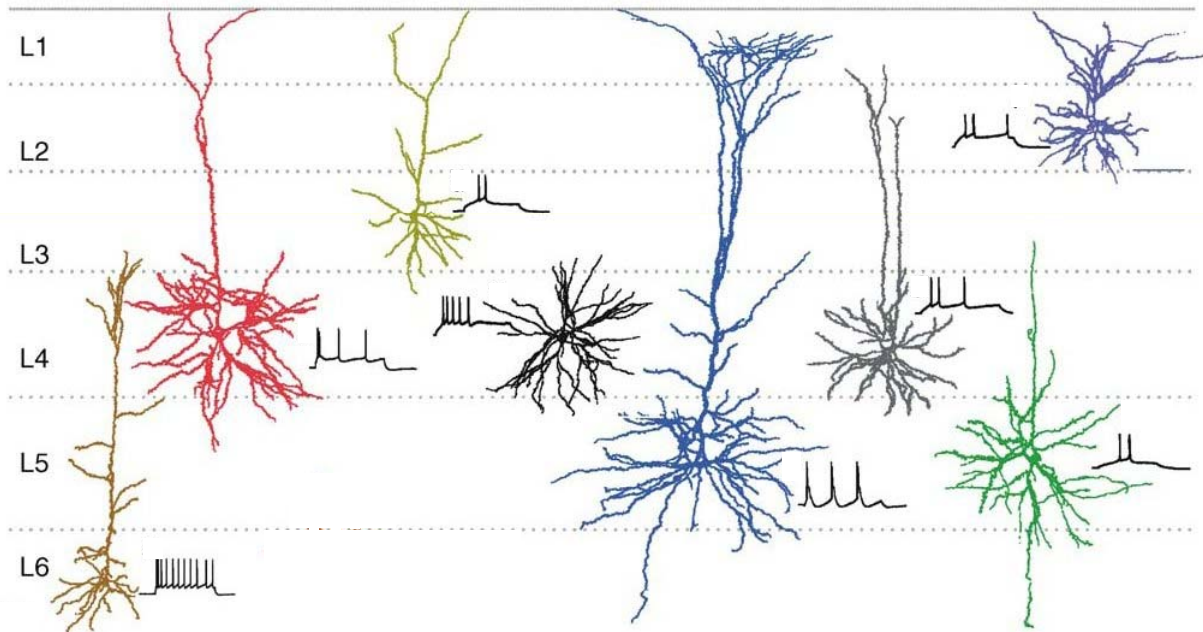


Figure 5. Répartition et morphologie des cellules excitatrices dans le cortex visuel de rat.

Arborisation dendritique des neurones excitateurs des couches 2 à 6 et profils de décharge associés.

Les neurones pyramidaux sont présents dans toutes les couches corticales alors que les cellules étoilées qui ne possèdent pas de dendrite apicale ne sont présentes qu'en couche 4.

D'après Bannister 2005, *Neuroscience research*.

b) Les projections excitatrices interlaminaires corticales :

- Les cellules étoilées de couche 4 projettent majoritairement en couche 3 (Anderson et al., 1994). Les neurones pyramidaux de couche 4 projettent également en couche 3 mais aussi en couche 6 (Lund, 1988).
- Les neurones pyramidaux de couche 3 projettent au niveau des couches 2/3 et 5.
- Les neurones pyramidaux de couche 5 innervent toutes les couches corticales et particulièrement la couche 2/3 (Keller, 1993 ; Thomson & Bannister, 2003). Ils projettent également sur les neurones pyramidaux de couche 5 des colonnes voisines ainsi que sur les aires associatives (projections cortico-corticales) ou en-dehors du cortex (projections extra-corticales).
- Les neurones pyramidaux de couche 6 ciblent la couche 4 (Gilbert & Wiesel, 1979).

2. Les réseaux inhibiteurs corticaux

Les interneurones GABAergiques forment la principale source d'inhibition dans le cortex. Ces neurones libèrent un neurotransmetteur spécifique, le GABA (acide gamma aminobutyrique). Bien que ne constituant qu'une faible fraction des neurones corticaux (15 à 30 % de la population neuronale) (Peters & Kara, 1985a), ils jouent des rôles cruciaux dans les fonctions cérébrales (McBain & Fisahn, 2001). Les axones des interneurones sont relativement courts, ils n'innervent que les régions corticales avoisinantes et forment des circuits locaux.

Il existe une grande diversité d'interneurones que ce soit d'un point de vue morphologique, neurochimique ou électrophysiologique ce qui a donné lieu à plusieurs classifications (DeFelipe, 1997 ; Cauli et al., 1997 ; Kawaguchi & Kubota, 1997 ; Cauli et al., 2000 ; Gupta et al., 2000 ; McBain & Fisahn, 2001 ; Kawaguchi & Kondo, 2002 ; Freund, 2003 ; Markram et al., 2004 ; Flames & Marin, 2005).

a) D'un point de vue anatomique

Les études histologiques ont permis de distinguer différentes populations d'interneurones (Ramon y Cajal, 1952 ; DeFelipe, 1997 ; Somogyi et al., 1998 ; Gupta et al., 2000 ; Markram et al., 2004) (figures 6 et 7) :

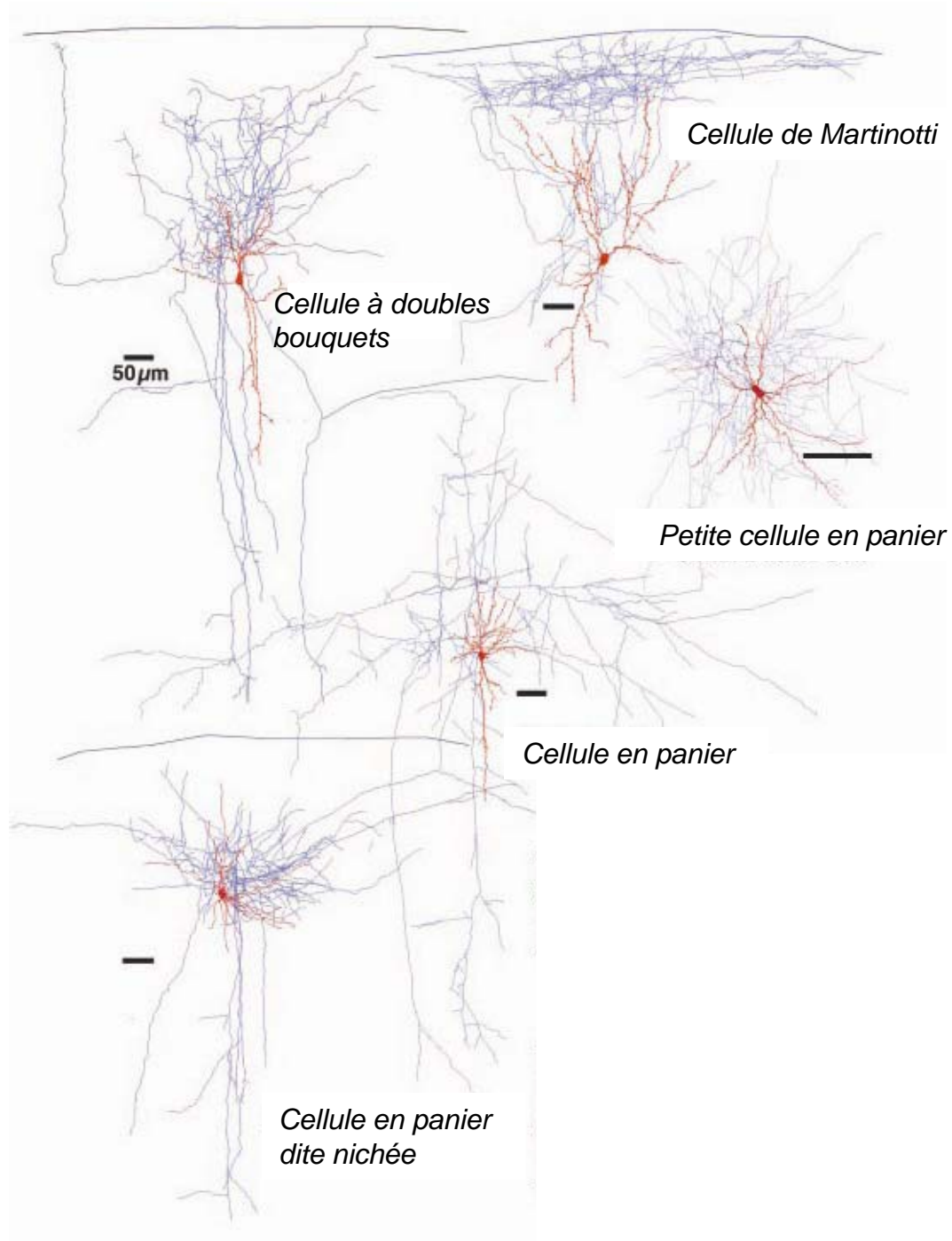


Figure 6. Cinq classes d'interneurones inhibiteurs corticaux.

Reconstitution anatomique de 5 classes d'interneurones corticaux. En rouge, le soma et l'arborisation dendritique et en bleu l'arborisation axonale.

D'après Gupta et al 2000, *Science*.

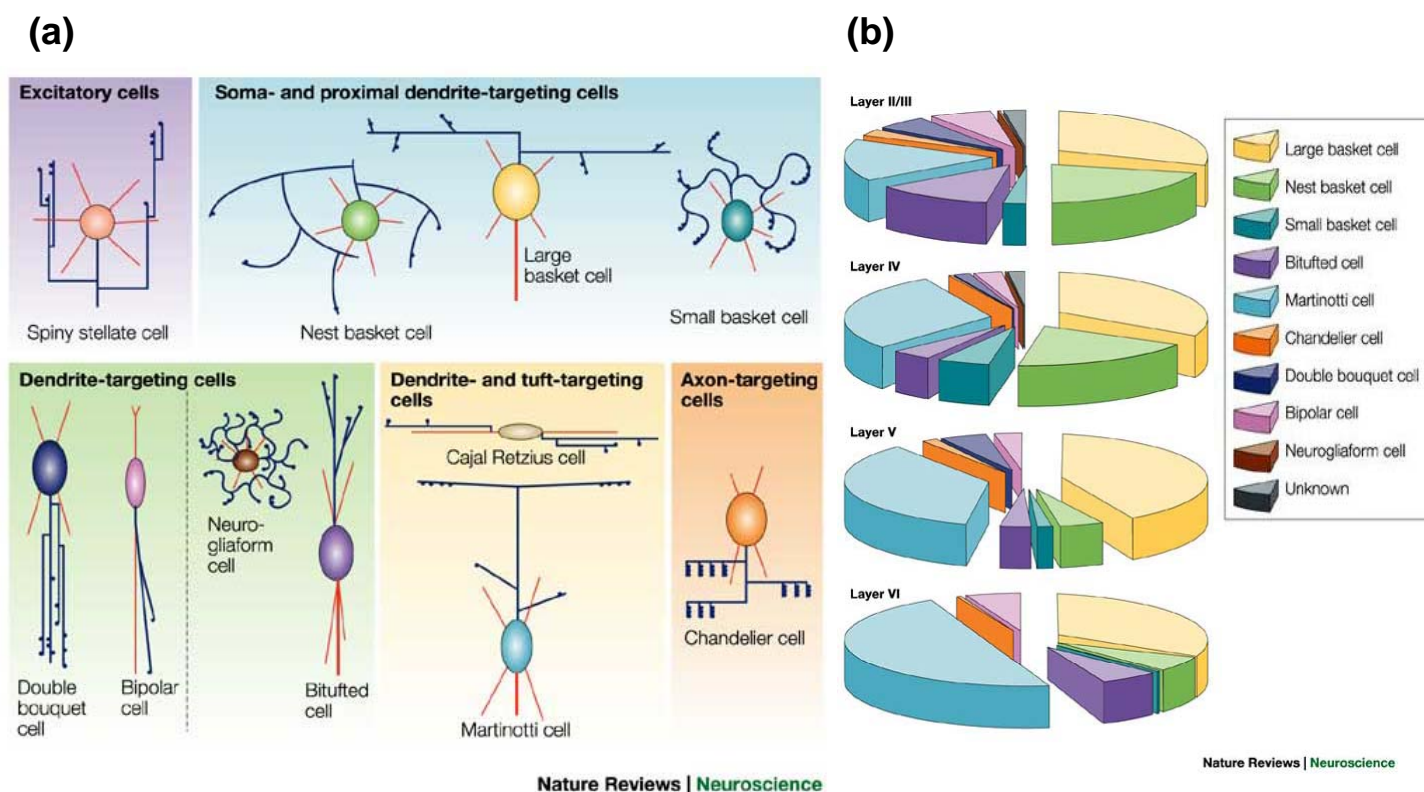


Figure 7. Les interneurons GABAergiques corticaux.

(a) Schéma résumant les principales caractéristiques anatomiques des interneurons. Les interneurons sont classés selon la structure de leur arborisation axonale et selon leur domaine d'innervation (axonal, somatique ou dendritique) sur leurs cellules cibles.

(b) Répartition des différents types d'interneurons corticaux chez le rat selon les différentes couches.

D'après Markram *et al* 2004, *Nature Reviews Neuroscience*.

- les cellules en panier (« basket cells ») qui représentent environ 50 % des interneurones. Ces cellules possèdent des morphologies très différentes : certaines sont de grandes cellules avec de longs axones, d'autres des cellules de très petite taille avec de courtes arborisations dendritiques et de courtes ramifications axonales. Toutes deux innervent préférentiellement le soma et les dendrites proximales des cellules pyramidales (Somogyi et al., 1998).
- les cellules en chandelier (« chandelier cells ») qui font partie des neurones les plus fréquents dans toutes les couches corticales (couche 2-6) (Lewis & Lund, 1990 ; DeFelipe & Farinas, 1992 ; Kawaguchi & Kubota, 1997).
- les cellules à double bouquets (« double bouquet cells ») qui se situent au niveau des couches 2 à 4 et qui possèdent des axones collatéraux ascendants et parfois descendants.
- les cellules de Martinotti (« Martinotti cells ») sont des petits neurones multipolaires ou bipolaires qui sont définies par une arborisation axonale ascendante. Ces cellules sont pour la plupart situées dans les couches profondes bien que certaines aient été répertoriées en couche 3 (Wang et al., 2004).
- les interneurones épineux étoilés (« spiny stellate cells ») qui sont présents en couches 2-3 et 5. Ces cellules sont excitatrices et possèdent un arbre dendritique de grande taille (Thomson et al., 1995).
- Les cellules « neurogliaform » ou cellules en toile d'araignée qui sont caractérisées par des arbres dendritiques très petits et très denses ainsi que par des ramifications axonales (Ramon y Cajal, 1952).

b) D'un point de vue électrophysiologique

Il est possible de distinguer différents types d'interneurones selon leur profil de décharge (figure 8) :

Les profils de décharges sont déterminés par application d'un saut de courant dépolarisant. La classification la plus courante utilise les termes de « fast spiking » (neurones qui présentent un profil de décharge rapide), « bursting » (profil de décharge sous forme de salves) et « regular spiking » (profil de décharge régulier) (Connors & Gutnick, 1990). Cependant, cette classification reste vague comparée à la diversité des réponses émises par les interneurones. Une première classification a été proposée par Kawaguchi (1993) et Cauli et al. (1997). Une autre classification plus détaillée a ensuite été proposée par Gupta et al. (2000) puis modifiée par Markram et al. (2004) (figure 8). Les interneurones sont regroupés en cinq groupes principaux :

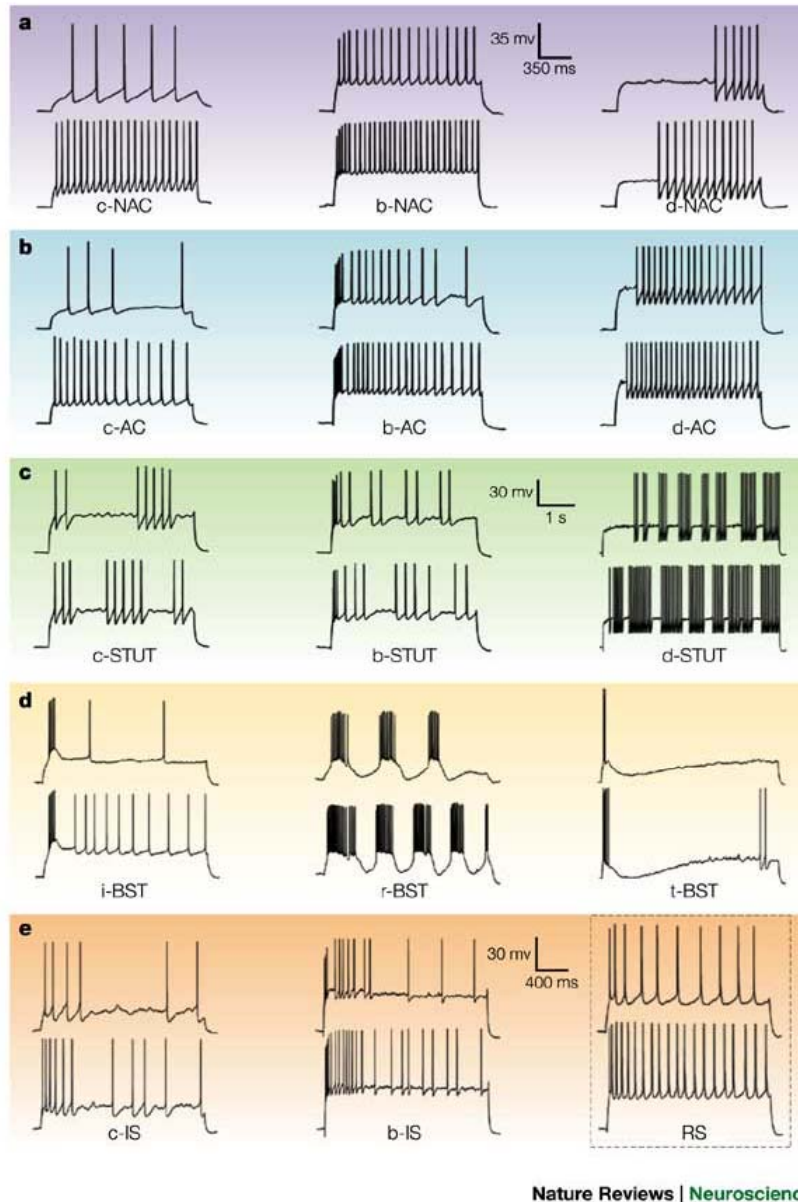


Figure 8. Les différents profils de décharge des interneurones GABAergiques corticaux.

5 profils de décharge ont été décrits : a) les « non accommodating » (NAC), b) les « accommodating » (AC), c) les « stuttering » (STUT), d) les « bursting » (BST) et e) les « irregular spiking » (IS).

D'après Markram *et al* 2004, *Nature Reviews Neuroscience*.

- les « accommodating » (AC) ou « regular-spiking » qui émettent des trains de potentiels d'action répétitifs et dont la fréquence d'émission des potentiels d'action s'adapte en fonction de l'amplitude du courant injecté.
- les « non-accommodating » (NAC) ou « fast-spiking » qui émettent des trains de potentiels d'action répétitifs et réguliers et dont les intervalles de temps entre les potentiels d'action ne dépendent pas de l'amplitude du courant injecté.
- les « stuttering » (STUT) qui présentent un profil de décharge sous forme de groupes de potentiels d'action irréguliers, à haute fréquence, entrecoupés d'intervalles sans potentiel d'action.
- les « irregular-spiking » (IS) qui émettent des potentiels d'action isolés de manière aléatoire.
- les « bursting » (BST) qui émettent des groupes de trois à cinq potentiels d'action qui sont suivis d'une période d'hyperpolarisation plus ou moins longue.

Les quatre premiers groupes sont subdivisés en trois sous-groupes selon la forme que présente leur réponse à l'instant où le saut de dépolarisation est appliqué : début de réponse sous forme de « burst » (b-NAC, b-AC, b-STUT, b-IS), réponse avec un certain délai (d-NAC, d-AC, d-STUT) ou début de réponse ne présentant ni burst ni délai qui est qualifié de classique (c-NAC, c-AC, c-STUT, c-IS).

Le groupe d'interneurones dit « bursting » est subdivisé en trois types : « repetitive » (r), « initial » (i) et « transient » (t) ([figure 8](#)).

c) D'un point de vue neurochimique

Les interneurones peuvent aussi être classés selon les protéines qu'ils expriment : les protéines liant le calcium comme la parvalbumine, la calbindine, la calrétinine, ou différents neuropeptides comme le VIP (peptide intestinal vasoactif), le neuropeptide Y ou encore la cholécystokinine (CCK).

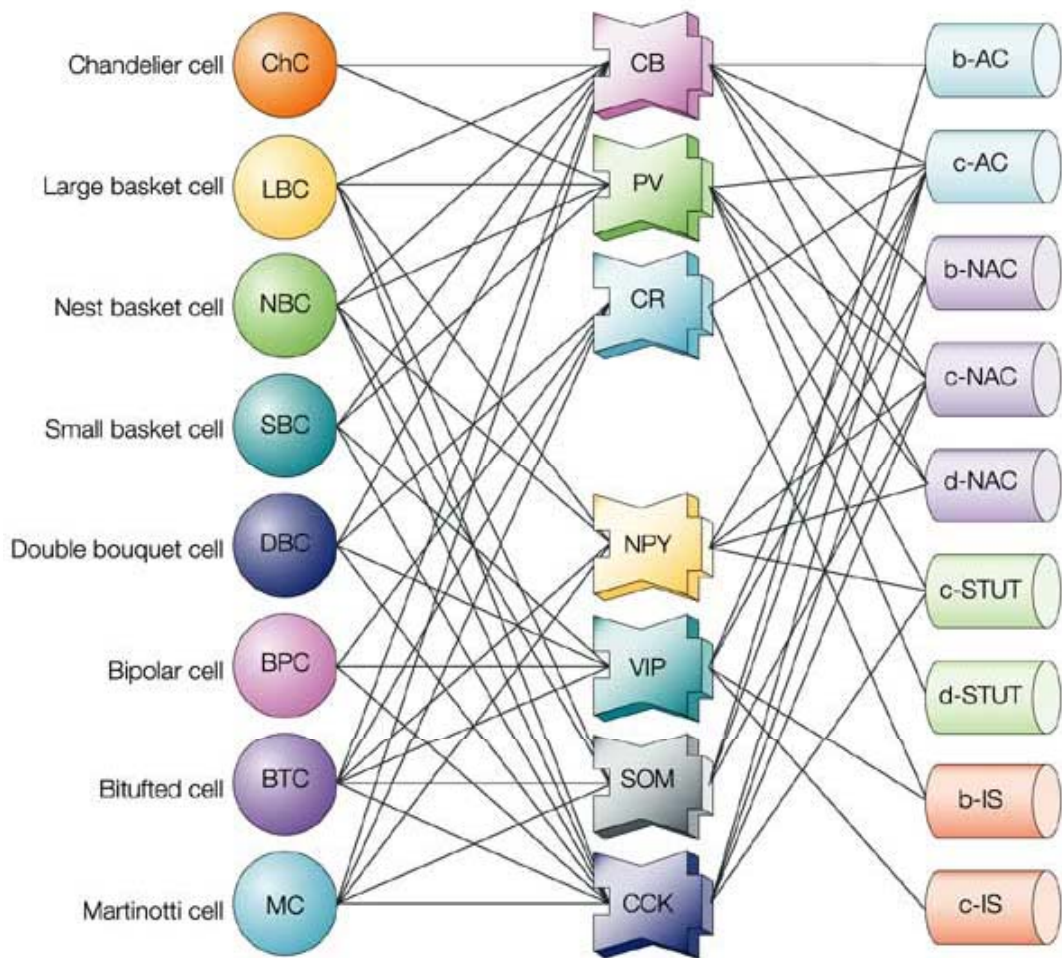
La parvalbumine est exprimée par les cellules en chandelier et des cellules en panier qui ont un profil de décharge rapide ([Kawaguchi & Kubota, 1997](#)). La CCK est exprimée par des cellules en panier présentant un profil de décharge régulier ([Kawaguchi & Kubota, 1997](#)). La calbindine est exprimée par les cellules à double bouquet, par certains interneurones épineux

ou encore par des cellules de Martinotti (DeFelipe & Jones, 1992 ; Gabbott et al., 1997 ; Kawaguchi & Kubota, 1997). La calrétinine et le VIP ont été détectés dans des cellules à double bouquet (DeFelipe & Jones, 1992 ; Kawaguchi & Kubota, 1997 ; Peters & Sethares, 1997). Certains interneurons épineux et des cellules de Martinotti expriment la somatostatine (Gabbott et al., 1997 ; Kawaguchi & Kubota, 1997). Les propriétés neurochimiques des interneurons sont résumées sur la [figure 9](#).

d) D'un point de vue fonctionnel

La grande diversité des interneurons leur confère une spécialisation fonctionnelle dans le contrôle de l'activité des neurones pyramidaux de couche 5 qui dépend de leur site d'innervation (DeFelipe, 1997 ; Kawaguchi & Kubota, 1997 ; Somogyi et al., 1998 ; Markram et al., 2004) :

- Les cellules en chandelier ciblent le segment initial de l'axone des neurones pyramidaux et ont par conséquent une position préférentielle dans le contrôle de l'édition des signaux de sortie, ainsi que dans la synchronisation de ces signaux (Zhu et al., 2004). Ces neurones sont probablement excitateurs.
- Les cellules en panier ciblent le soma des neurones pyramidaux et ont pour fonction de contrôler le gain (l'amplitude de la réponse neuronale pour un stimulus donné) et par conséquent la fréquence de décharge du neurone cible (Buhl et al., 1995 ; Miles et al., 1996 ; Wang et al., 2002). Ces neurones sont aussi impliqués dans la synchronisation de l'activité neuronale (Cobb et al., 1995 ; Tarcy-Hornoch et al., 1998 ; Pouille & Scanziani, 2001).
- Les interneurons épineux, « neurogliaform », les cellules à double bouquet et les cellules de Martinotti ciblent les dendrites des neurones pyramidaux (DeFelipe, 1997 ; Kawaguchi & Kubota, 1997). Ces neurones peuvent modifier les processus d'intégration des entrées synaptiques notamment par la filtration des entrées excitatrices par un mécanisme d'inhibition shuntante (Tamas et al., 2000 ; Xiang et al., 2002 ; Monier et al., 2003).



Nature Reviews | Neuroscience

Figure 9. Expression des protéines liant le calcium et des neuropeptides dans les interneurones.

Schéma présentant l'expression des protéines liant le calcium: calbindine (CB), parvalbumine (PV) et calretinine (CR) et les neuropeptides: neuropeptide Y (NPY), peptide vasoactif intestinal (VIP), somatostatine (SOM) et cholecystokinine (CCK) en fonction des différentes classes morphologiques et électrophysiologiques d'interneurones (AC, accommodating; b, burst ; c, classic ; d, delay ; IS, irregular spiking; NAC, non-accomodating; STUT, stuttering).

D'après Markram *et al* 2004, *Nature Reviews Neuroscience*.

3. Les connexions corticales

Un schéma récapitulatif des connexions entre neurones pyramidaux et interneurons est présenté sur la [figure 10](#).

a) Les connexions interlaminaires entre les couches 3 et 5.

Les neurones pyramidaux de couche 5 sont innervés par les neurones pyramidaux de couche 3 ([Thomson & Bannister, 1998](#)). Inversement, les neurones pyramidaux de couche 5 n'établissent pas de contact avec les neurones pyramidaux de couche 3 ([Thomson & Bannister, 1998](#)) mais peuvent par contre innerver les interneurons de couche 3 ([Dantzker & Callaway, 2000](#)).

b) Les connexions interlaminaires entre les couches 3 et 4.

Les neurones pyramidaux de couche 4 innervent « massivement » les neurones pyramidaux de couche 3. Par contre les neurones pyramidaux de couche 3 n'innervent pas ceux de couche 4 qui semblent recevoir uniquement des informations provenant du thalamus ([Thomson & Bannister, 2003](#)).

De nombreuses interactions réciproques s'établissent entre les neurones pyramidaux de couche 3 et différents interneurons de couche 4.

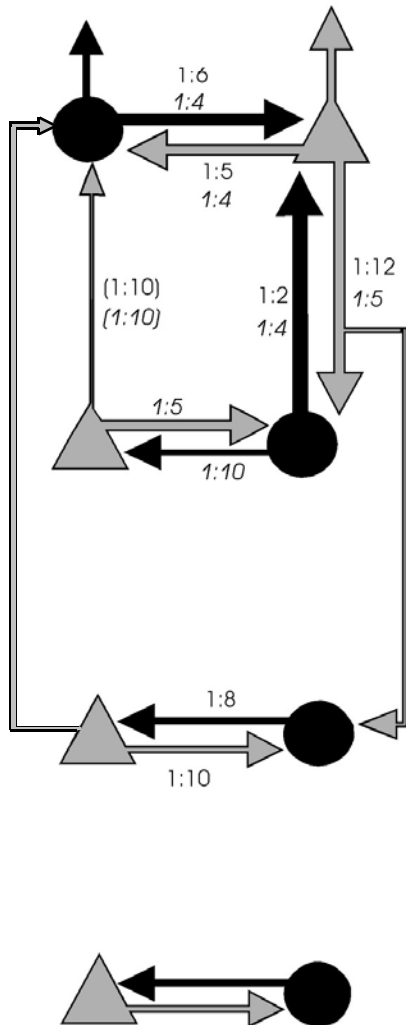
Enfin, les neurones pyramidaux de couche 4 ciblent de manière spécifique les interneurons de couche 3 qui expriment la parvalbumine ([Thomson & Bannister, 2003](#)).

c) Les connexions interlaminaires entre les couches 4 et 6.

Elles s'établissent entre les neurones pyramidaux des couches 4 et 6 ([Tarczy-Hornoch et al., 1999](#)).

En résumé, les principales connexions excitatrices antérogrades sont établies entre les couches 3-4 et les couches 3-5 qui innervent aussi bien des neurones pyramidaux que des interneurons spécifiques. Alors que les connexions rétrogrades sont établies entre les couches 4-3 et les couches 5-3 où elles innervent des interneurons spécifiques ([Thomson et al., 1996](#), [Callaway, 2002](#)).

Connections between Excitatory and Inhibitory Neurones



Connections between Excitatory Neurones

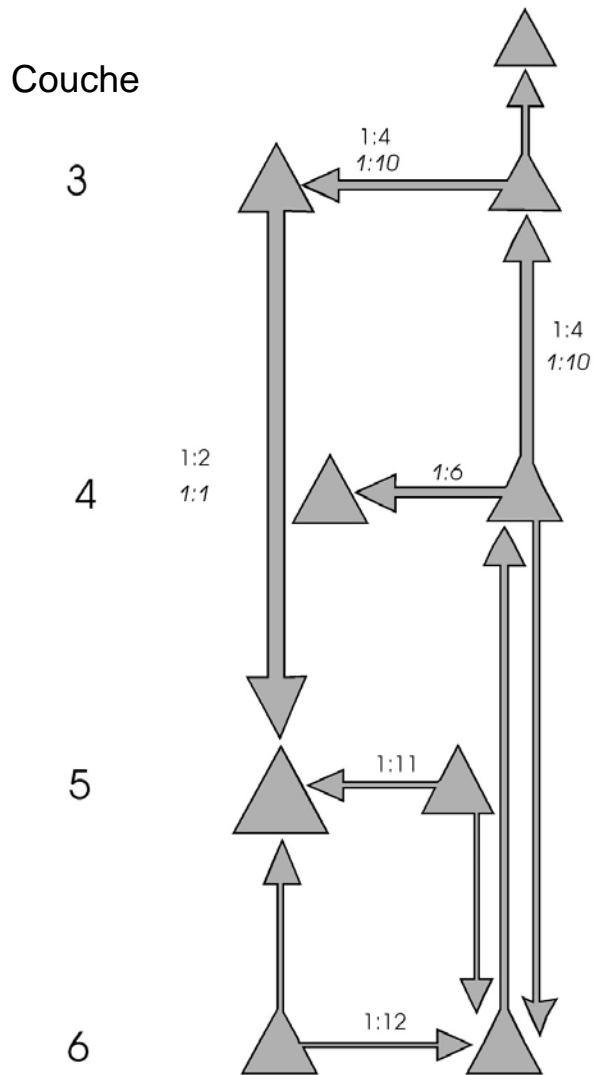


Figure 10. Les connexions entre les neurones corticaux.

Schéma résumant les connexions entre les neurones corticaux des couches 3 à 6. Les neurones excitateurs sont représentés par des triangles gris et les interneurons inhibiteurs par des cercles noirs. Les rapports indiquent la probabilité d'enregistrement d'une connexion de ce type (nombre de connexions enregistrées divisées par le nombre de paires de neurones testés) sur tranches de cortex de rat (plein) et de chat (italique).

D'après Thomson et Bannister 2003, *Cerebral Cortex*.

II. L'intégration corticale.

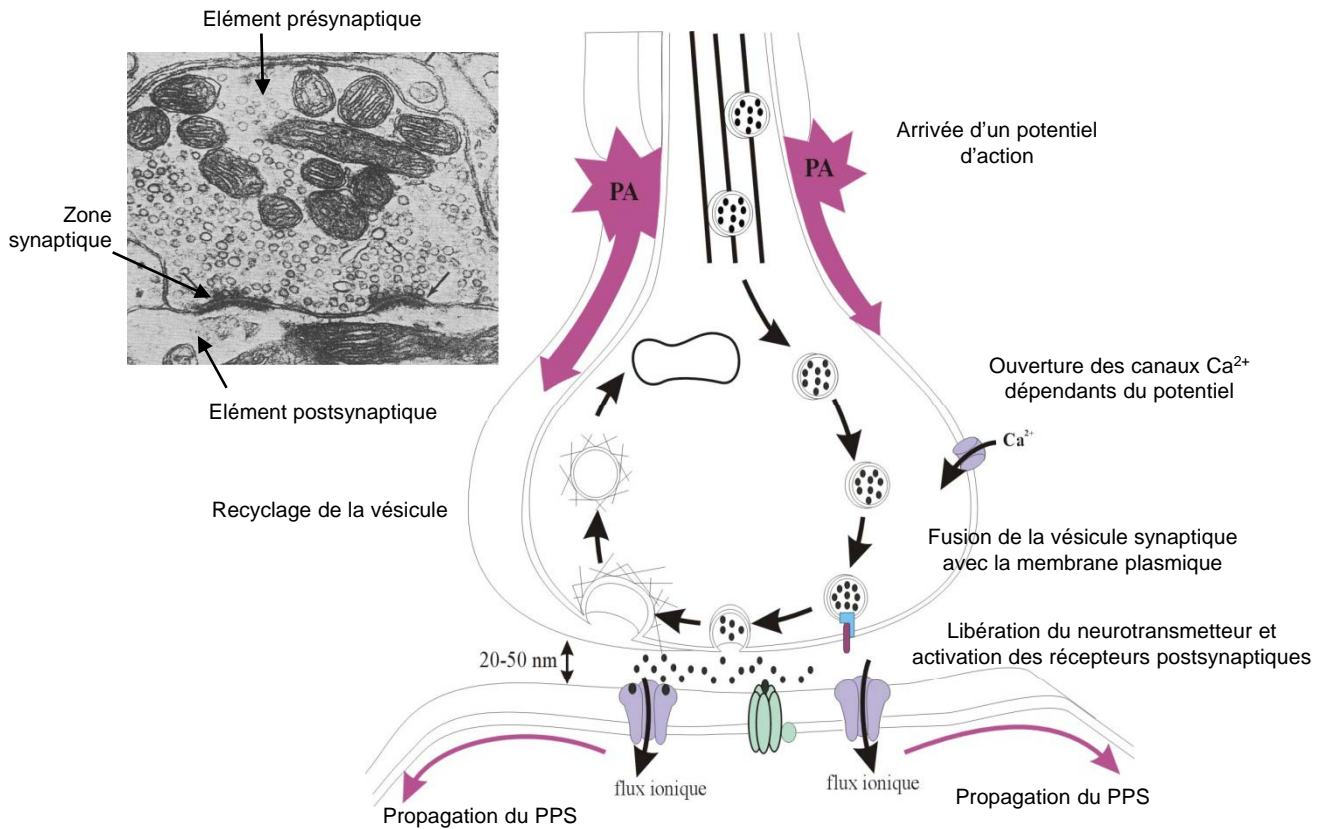
Les signaux excitateurs et inhibiteurs générés en réponse aux stimuli sensoriels sont transmis aux neurones pyramidaux de couche 5 du cortex visuel par des contacts synaptiques, et intégrés avant de se propager jusqu'au soma. Les différents signaux sont sommés à ce niveau pour donner un signal résultant global. Si le signal résultant est capable d'atteindre le seuil de dépolarisation du neurone pyramidal alors une réponse sous forme de trains de potentiels d'action (PAs) est générée au niveau du segment initial de l'axone. Cette réponse est ensuite propagée par l'axone vers les aires visuelles associatives. Cette organisation particulière offre plusieurs points de contrôle: lors de la réception des signaux par les neurones pyramidaux et lors du transit de ces signaux vers le soma.

A) La transmission synaptique

Pour mémoire, je rappellerai brièvement les principes de base de la transmission synaptique. D'un point de vue morphologique, la synapse se caractérise par la présence d'un élément présynaptique et d'un élément postsynaptique séparés par une fente synaptique.

L'arrivée des informations sous forme de potentiels d'action au niveau présynaptique entraîne l'activation de canaux calciques sensibles au potentiel. L'influx de Ca^{2+} résultant provoque la libération d'un neurotransmetteur qui une fois libéré se fixe sur ses récepteurs spécifiques (ionotropiques ou métabotropiques) au niveau postsynaptique. L'activation de ces récepteurs entraîne l'ouverture de canaux perméants à des ions spécifiques qui peuvent générer un changement transitoire de potentiel au niveau de l'élément postsynaptique appelé potentiel postsynaptique (PPS, [figure 11](#)). La transmission synaptique est une première zone de modulation des signaux reçus. En effet, différents paramètres comme la quantité de neurotransmetteur libérée, le temps de demi-vie de ces neurotransmetteurs dans la fente synaptique, le nombre et l'affinité des récepteurs postsynaptiques pour le neurotransmetteur peuvent être modulés par différents facteurs comme des neuromodulateurs ou encore des neuropeptides aboutissant à une modification de l'efficacité de la transmission synaptique.

La synapse chimique



La synapse électrique

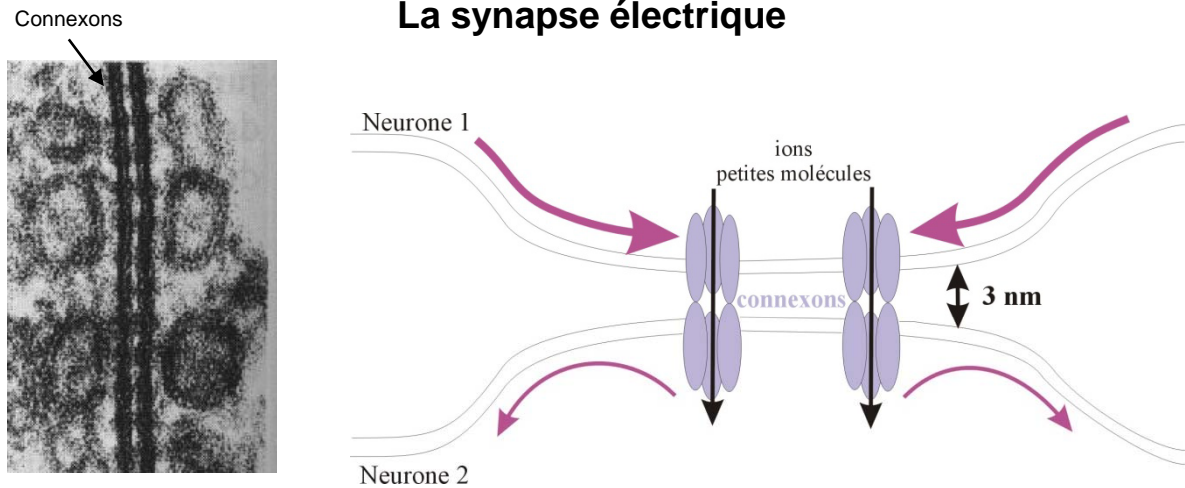


Figure 11. La transmission synaptique chimique et électrique.

Rappel du principe des transmissions synaptiques chimique et électrique.
En encart, coupe histologique des synapses.

Il est à noter qu'en plus des synapses chimiques, les neurones peuvent également communiquer par des synapses électriques qui se caractérisent par des jonctions membranaires étroites entre deux cellules appelées « gap-jonctions » ou jonctions communicantes (figure 11). Ces jonctions communicantes sont formées par un assemblage de protéines spécifiques, les connexines qui forment un pore membranaire entre deux neurones. En conséquence, les signaux électriques sont directement transmis d'une cellule à l'autre par un flux d'ions, sans intermédiaire chimique. Ces synapses ont été plus particulièrement caractérisées au niveau des réseaux neuronaux inhibiteurs (Galarreta & Hestrin, 1998 ; Gibson et al., 1999 ; Tamas et al., 2000).

B) intégration dendritique

Les neurones pyramidaux de couche 5 possèdent trois zones dendritiques distinctes d'un point de vue anatomique et fonctionnel (Figure 12) (Larkum et al., 2001). On distingue ainsi la partie distale de la dendrite apicale qui présente une forte arborisation au niveau des couches 1 et 2 (zone A) et qui est une zone de réception des signaux thalamiques, la dendrite apicale (zone B) qui est une zone de propagation des signaux et l'arborisation basale autour du soma du neurone pyramidal en couche 5 (zone C) qui est une zone de réception des signaux intracorticaux.

1. La partie distale de la dendrite apicale

La zone dendritique distale est la principale zone de réception des signaux générés en couche 2/3 et 4 par l'arrivée des stimuli visuels. A ce niveau, les neurones pyramidaux reçoivent deux types de signaux, des signaux excitateurs et des signaux inhibiteurs.

a) Les signaux excitateurs

Les signaux excitateurs proviennent de l'activation par le glutamate de récepteurs spécifiques : les récepteurs ionotropiques AMPA/kainate, NMDA et les récepteurs métabotropiques mGlu (figure 13 ; pour revue Kew & Kemp, 2005).

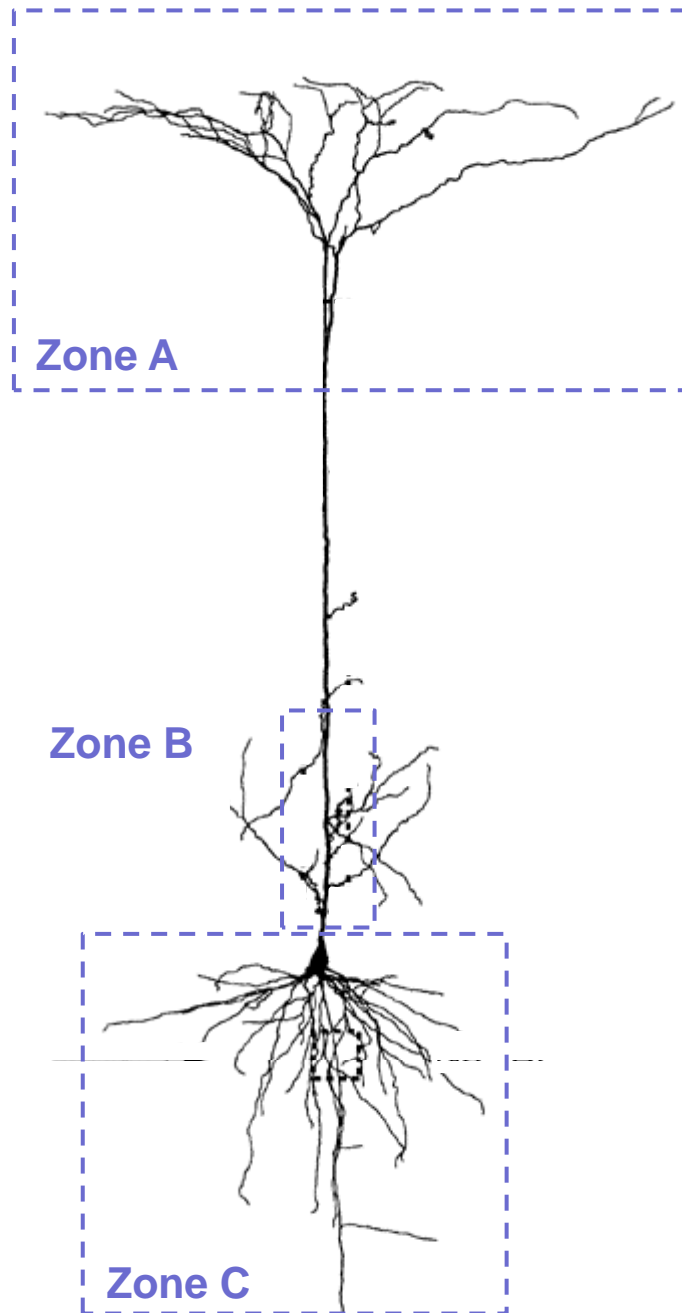


Figure 12. Les différentes zones dendritiques d'un neurone pyramidal de couche 5 du cortex.

Trois zones dendritiques peuvent être distinguées d'un point de vue anatomique et fonctionnelle:

- L'arborisation dendritique distale, zone A.
- La partie proximale de la zone apicale, zone B.
- Et l'arborisation proximale, zone C.

Modifié d'après Larkum et al., 2001; *J Physiol (Lond)*.

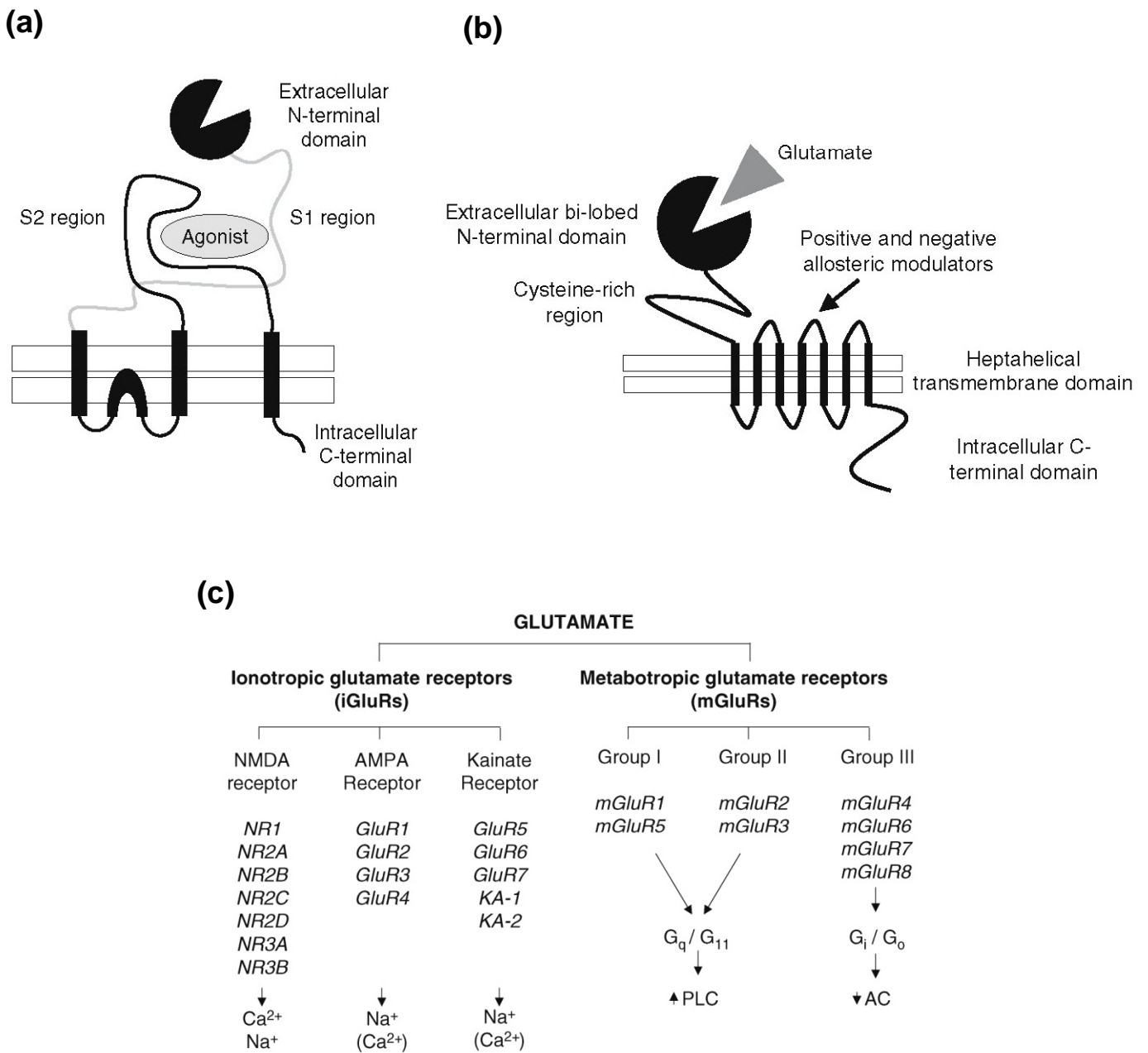


Figure 13. Structure des récepteurs glutamatergiques.

- (a) Structure d'un récepteur ionotrope au glutamate.
 (b) Structure des récepteurs métabotropiques au glutamate.
 (c) Les différentes sous-unités qui composent les récepteurs au glutamate. Les perméabilités des différents récepteur ionotropiques sont indiquées ainsi que les différentes protéines G activées par les récepteurs métabotropiques.

D'après Kew et Kemp, 2005; *Psychopharmacology*.

L'activation des récepteurs AMPA/kainate provoque l'ouverture d'une perméabilité cationique (plus particulièrement aux ions Na^+/K^+). Les récepteurs ionotropiques de type NMDA sont physiologiquement bloqués par les ions Mg^{2+} pour des potentiels hyperpolarisés mais, lorsque cette inhibition est levée (par une dépolarisation généralement consécutive à l'activation des récepteurs AMPA/Kainate), ces récepteurs deviennent perméables aux ions Na^+/K^+ et Ca^{2+} . Les récepteurs métabotropiques du glutamate comprennent 8 sous-types de récepteurs répartis en trois classes (I, II et III) qui modulent des canaux de types cationiques. L'activation des récepteurs ionotropiques par le glutamate aboutit à une entrée de charges positives dans la cellule postsynaptique donnant naissance à un potentiel postsynaptique excitateur (PPSE). Un neurone peut recevoir de nombreux signaux excitateurs au même instant et tout le long de sa dendrite, il réalise alors une sommation spatiale des PPSEs générés en même temps et une sommation temporelle à condition que les PPSEs se succèdent à intervalles de 5 à 15 ms les uns des autres.

b) Les signaux inhibiteurs

Les signaux inhibiteurs proviennent de l'activation par le GABA de récepteurs GABAergiques (GABA_A ou GABA_B ; [figure 14](#)) ou de l'activation par la glycine de récepteurs glycinergiques ([figure 15](#)).

Les récepteurs métabotropiques, GABA_B ([Bowery et al., 1980](#)), sont des récepteurs liés à une protéine G activatrice de canaux perméables aux ions K^+ . L'activation de ces récepteurs entraîne une sortie d'ions K^+ et la création d'un potentiel postsynaptique inhibiteur (PPSI) au niveau postsynaptique.

L'activation des récepteurs-canaux ionotropiques GABA_A ou glycinergiques entraîne l'ouverture d'un canal perméant aux ions Cl^- . Deux types d'inhibition, dépendant du potentiel de membrane, ont été rapportés à la suite de l'activation des récepteurs GABA_A ([figure 16](#)) : une inhibition hyperpolarisante et une inhibition shuntante. L'inhibition hyperpolarisante est majoritairement due à des synapses inhibitrices localisées au niveau du soma et des parties proximales des dendrites. L'inhibition shuntante a été décrite comme résultant principalement de l'activation des récepteurs GABA_A extrasynaptiques ([Petrini et al., 2004](#), [Mody, 2005](#)) localisés au niveau proximal de la dendrite apicale du neurone pyramidal. De par cette localisation spécifique, ces « récepteurs-canaux » sont capables de « filtrer » les signaux distaux.

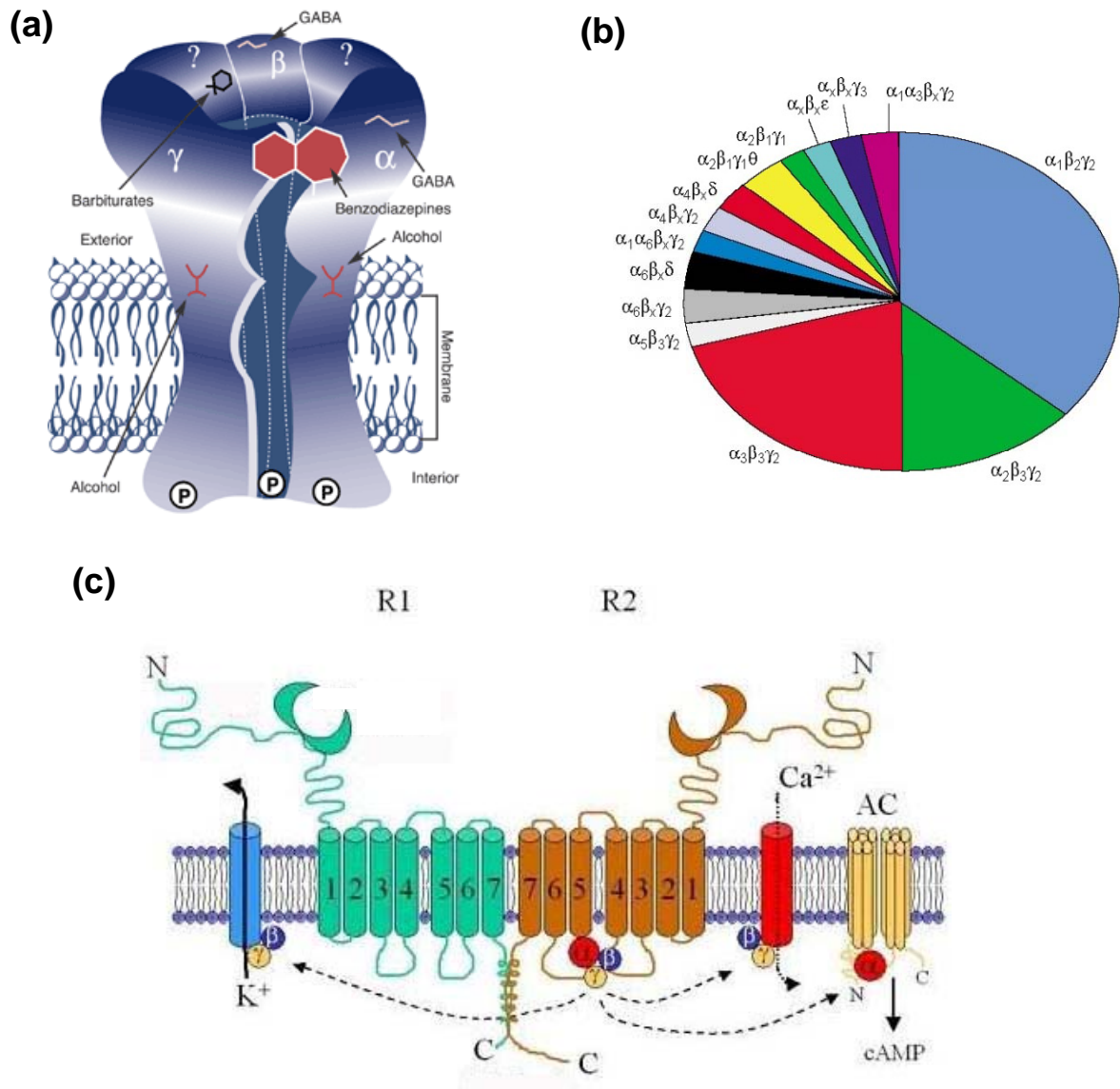


Figure 14. Structure des récepteurs GABAergiques.

- (a) Structure d'un récepteur ionotrope $GABA_A$. Les principaux sites de phosphorylation (P) et de fixation des agonistes sont représentés.
- (b) Représentation schématique de la répartition des différents types de récepteur $GABA_A$ dans le cerveau de mammifère.
- (c) Structure d'un récepteur métabotrope $GABA_B$. Ces récepteurs sont des dimères composés d'une sous-unité R1 et d'une sous-unité R2. Ces récepteurs peuvent ensuite activer des protéines G qui pourront activer ou inhiber leurs cibles spécifiques comme des canaux K^+ , des canaux Ca^{2+} ou l'adénylate cyclase.

D'après Wafford, 2005; *Curr Opin Pharmacol*.

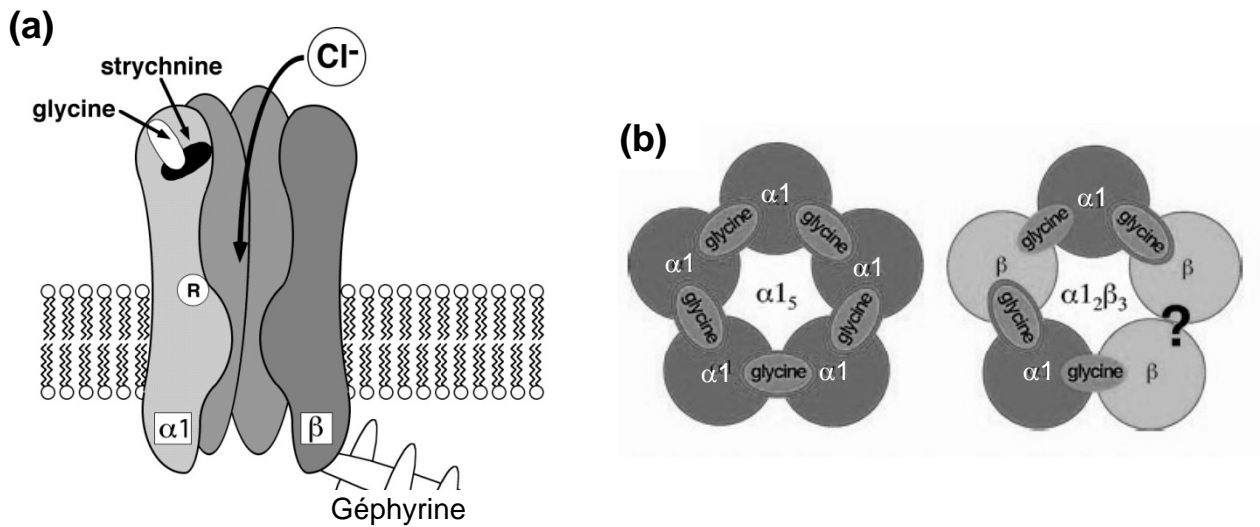


Figure 15. Structure des récepteurs glycinergiques.

- (a) Structure d'un récepteur glycinergique (R: arginine).
- (b) Les récepteurs glycinergiques peuvent être des homomères composés uniquement de sous-unités $\alpha 1$ ou des hétérodimères composés de sous-unités $\alpha 1$ et β .

D'après Betz et Laube, 2006; *J Neurochem*.

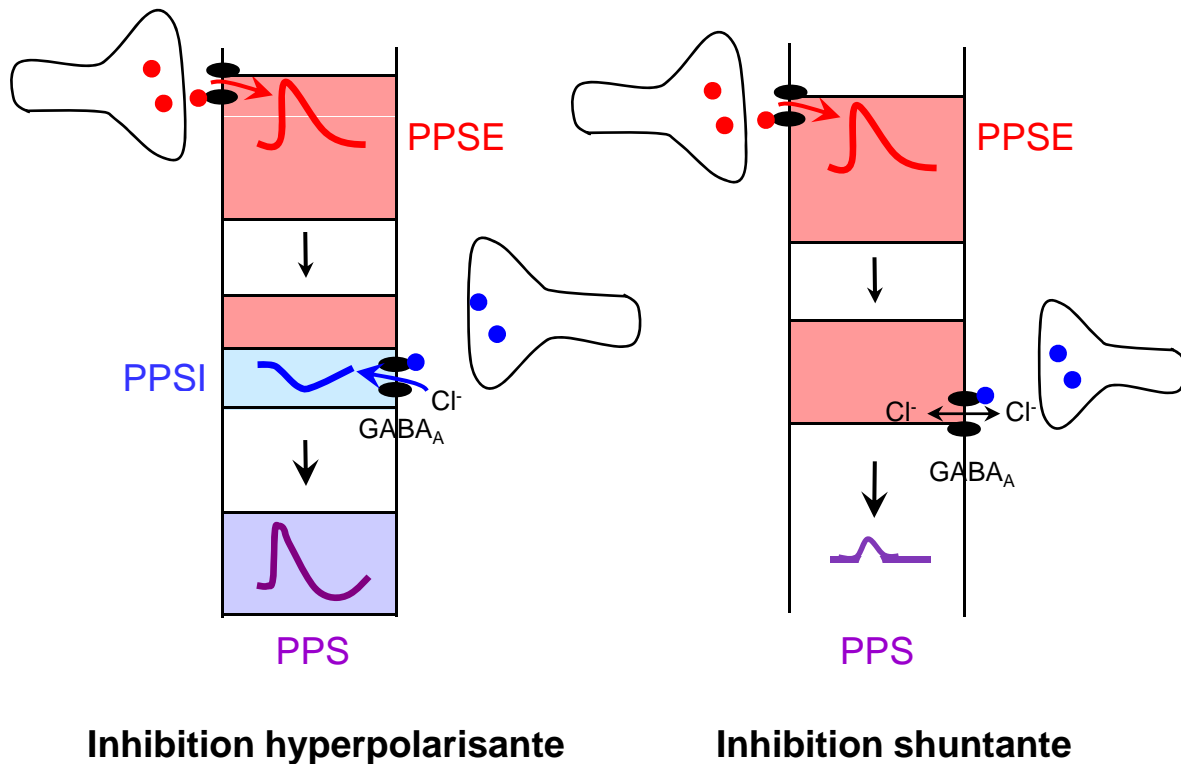


Figure 16. Rôle des signaux inhibiteurs dans la propagation du signal au niveau dendritique.

La synapse excitatrice génère un PPSE (trace rouge) qui se propage sous forme d'une onde dépolarisante dans la dendrite.

Partie gauche, inhibition hyperpolarisante due à une entrée d'ions Cl^- par les récepteurs GABA_A activés (trace bleue). Les PPSE et les PPSI peuvent être sommés aboutissant à un PPS global dont un exemple est présenté ci-dessus (violet).

Partie droite, inhibition shuntante due à l'absence de gradient électrochimique pour les ions Cl^- . La diminution locale de résistance membranaire induite par l'activation des récepteurs GABA_A provoque le shunt de l'onde dépolarisante pouvant conduire à sa suppression. Le PPS global sera par conséquent réduit.

Ce processus de filtration résulte de l'ouverture des canaux perméants aux ions Cl^- . Le potentiel d'équilibre des ions Cl^- (- 80 mV) étant très proche du potentiel de repos du neurone pyramidal (- 80 à - 75 mV), il n'y a pas passage d'ions à travers la membrane neuronale, et donc pas de courant ionique détectable. Toutefois, l'ouverture des canaux diminue la résistance membranaire locale ce qui aboutit au shunt, c'est-à-dire à l'atténuation des signaux distaux (Andersen et al., 1980). L'inhibition shuntante résultant de l'activation d'une perméabilité aux ions Cl^- associée à l'activation de récepteurs glycinergiques est aussi possible sans avoir pour autant été rapportée. Le rôle de l'inhibition shuntante dans le contrôle de l'excitabilité des neurones est supposé important sans avoir été clairement caractérisé (Mody, 2005).

2. La propagation des signaux le long de la dendrite apicale

Les réponses synaptiques générées au niveau de la partie distale de la dendrite apicale sont propagées le long de la dendrite avant de parvenir au soma. D'après la théorie des câbles, le signal est déformé lors de sa propagation par les propriétés intrinsèques des dendrites, à savoir, leur résistance membranaire, la capacité membranaire, la longueur de la dendrite et le rapport entre la conductance dans les dendrites et la conductance dans le soma (Rall, 1969).

a) Rôle des canaux dendritiques sensibles au potentiel

D'après la théorie des câbles, à force égale, les signaux distaux auraient moins d'impact que les signaux proximaux sur l'induction d'une réponse neuronale. Cependant, des études récentes ont démontré que même des signaux distaux de faible amplitude peuvent augmenter l'excitabilité des neurones pyramidaux du cortex ou de l'hippocampe (Larkum et al., 2004). En effet, les dendrites apicales de ces neurones expriment des canaux Ca^{2+} et/ou Na^+ sensibles au potentiel (Schiller et al., 1997 ; Schwindt & Crill, 1997 ; Magee, 1999 ; Larkum et al., 2001) qui permettent de propager voire d'amplifier un signal dépolarisant (Larkum et al., 2004). Cette propagation n'est possible que si l'amplitude des signaux dépolarisants est capable d'induire une dépolarisation membranaire suffisamment importante pour atteindre le seuil d'activation de ces canaux. Si l'amplitude des signaux n'entraîne pas de dépolarisation membranaire capable d'activer les canaux Ca^{2+} et/ou Na^+ , alors le signal ne sera plus soutenu mais propagé passivement le long de la dendrite en s'atténuant.

La répartition de ces canaux est relativement homogène le long de la dendrite apicale. Les canaux Na^+ sont uniformément exprimés du segment initial de l'axone jusqu'au trois quart de la partie distale de la dendrite apicale (Magee & Johnston, 1995 ; Colbert & Johnston, 1996 ; Mickus et al., 1999 ; Colbert & Pan, 2002 ; Gasparini & Magee, 2002). Alors que la densité des canaux Ca^{2+} apparaît uniforme, la distribution des différents sous-types de canaux Ca^{2+} est par contre hétérogène. Les canaux calciques de type L et N sont plus abondants au niveau somatique et proximal, alors que les canaux calciques de type R et T sont plus nombreux au niveau des dendrites distales (Magee et al., 1995 ; Sabatini & Svoboda, 2000).

b) Les différents signaux dépolarisants

Deux types de signaux dépolarisants sont propagés le long de la dendrite apicale des neurones pyramidaux :

- les PPSEs qui transitent des parties distales où ils sont générés vers le soma, on parle de propagation antérograde. La propagation des PPSEs dépend principalement de l'activation des canaux Ca^{2+} sensibles au potentiel (Johnston et al., 2003).

- et les PAs générés au niveau du segment initial de l'axone en réponse aux signaux dépolarisants et qui peuvent se propager de manière rétrograde le long de la dendrite apicale vers les sites synaptiques distaux (Stuart & Sakmann, 1994 ; Spruston et al., 1995 ; Stuart et al., 1997). La propagation des PAs rétrogrades dépend préférentiellement de l'activation des canaux Na^+ sensibles au potentiel.

c) Le contrôle dendritique de l'amplitude des signaux

Si la dendrite apicale permet la propagation de signaux dépolarisants, elle a aussi pour fonction, au niveau de sa partie proximale (zone B, [figure 12](#)) d'éditer ces signaux ; c'est-à-dire de modifier leur amplitude afin de ne pas engendrer de changements trop importants de l'excitabilité neuronale (Larkum et al., 2001). Les mécanismes à l'origine de cette modulation ne sont pas clairement définis. Plusieurs hypothèses ont été émises, dont notamment l'implication de l'inhibition shuntante d'origine GABAergique (Mody, 2005). En effet, l'inhibition shuntante est supposée provenir de l'activation de récepteurs GABA_A extrasynaptiques présents au niveau de cette zone (Gulyas et al., 1993 ; Cipolloni et al., 1998). De plus, il a été montré que l'activation d'interneurones particuliers ciblant la zone proximale

de la dendrite apicale, comme par exemple les interneurons de couche 5 du cortex qui expriment la parvalbumine et qui ont un profil de décharge rapide, sont capables de modifier l'amplitude des signaux dendritiques (Xiang et al., 2002).

Un autre mécanisme d'édition des signaux dendritiques a été mis en évidence dans l'hippocampe, où l'activation de canaux potassiques situés sur la partie proximale de la dendrite des neurones pyramidaux est capable de diminuer l'amplitude des courants synaptiques transitoires (Hoffman et al., 1997 ; Schwindt & Crill, 1997 ; Bekkers, 2000 ; Korngreen & Sakmann, 2000 ; Johnston et al., 2003).

L'amplitude des signaux qui transitent le long de la dendrite apicale peut aussi être modulée par la coïncidence entre les PAs rétrogrades et les PPS antérogrades. En effet, l'activation des canaux sensibles au potentiel par les PAs rétrogrades entraîne une dépolarisation membranaire qui peut amplifier les signaux antérogrades coïncidant ce qui aboutit à la formation de signaux à haute fréquence ayant d'importantes conséquences physiologiques, notamment dans les processus d'apprentissage et de mémorisation (Schiller et al., 1997 ; Schwindt & Crill, 1997 ; Larkum et al., 1999 ; Linden, 1999 ; Magee & Carruth, 1999 ; Williams & Stuart, 1999 ; Häusser et al., 2001 ; Johnston et al., 2003).

3. La partie basale proximale de la dendrite apicale

L'arborisation dendritique basale proximale (zone C, figure 12), reçoit principalement des afférences intra-corticales. Les processus intégratifs de cette région sont peu connus car les dendrites basales sont étroites ce qui rend les enregistrements électrophysiologiques très difficiles à l'heure actuelle. Néanmoins, des études récentes ont montré par imagerie infrarouge que la propagation des signaux à ce niveau dépend de l'activation de canaux sodiques et de récepteurs NMDA et non de canaux calciques comme c'est le cas pour la dendrite apicale (Nevian et al, 2007). Il semble que les dendrites basales aient majoritairement un rôle dans la sommation spatio-temporelle des différents signaux synaptiques reçus (Kampa et al., 2006 ; Nevian et al., 2007).

III. Balance Excitation / Inhibition

L'estimation de la balance Excitation/Inhibition à un instant donné au niveau du soma d'un neurone pyramidal reflète l'état d'activation de ses conductances excitatrices et inhibitrices qui déterminent son niveau d'activité basal.

A) La balance E/I au cours du développement des connexions corticales.

Le maintien d'un niveau d'activité basal efficace nécessite une coordination entre les signaux excitateurs et inhibiteurs reçus par un neurone. Des expériences *in vivo* ont montré qu'au cours du développement, les signaux visuels perçus par la rétine définissent l'orientation et l'efficacité des connexions excitatrices et inhibitrices entre le thalamus et le cortex visuel de manière synchrone (Anderson et al., 2000 ; Martinez et al., 2002 ; Monier et al., 2003 ; Hirsch et al., 2003 ; Marino et al., 2005). De la même façon, l'efficacité des afférences excitatrices et inhibitrices du cortex auditif sont définies de manière concomitante par les mêmes stimuli. Ainsi, un stimulus auditif particulier induit une réponse corticale présentant une composante excitatrice particulière et sa composante inhibitrice associée (Wher & Zador, 2003 ; Zhang et al., 2003 ; Tan et al., 2004).

Par conséquent, les réponses excitatrices et inhibitrices induites par des stimuli sensoriels sont à la fois synchronisées (Wher & Zador, 2003 ; Zhang et al., 2003) et proportionnelles (Shu et al., 2003 ; Liu, 2004) afin de définir et de maintenir un niveau d'activité basal stable (Shadlen & Newsome, 1998 ; van Wreeswijk & Sompolinsky, 1998 ; Durstewitz et al., 2000 ; Wang, 2001 ; Compte et al., 2003 ; Shu et al., 2003). Cette coordination entre signaux excitateurs et inhibiteurs pourraient être à la base de divers processus physiologiques comme la mémorisation à court-terme (Durstewitz et al., 2000 ; Brunel & Wang, 2001 ; Egorov et al., 2002), la régulation de l'excitabilité neuronale (Chance et al., 2002 ; Hahnloser et al., 2002) et la génération d'une activité spontanée pendant les phases du sommeil (Steriade et al., 1993 ; ; Cowan & Wilson, 1994 ; Contreras et al., 1996 ; Sanchez-Vives et McCormick, 2000 ; Steriade, 2001 ; Compte et al., 2003).

B) Importance physiologique de la balance E/I

A l'inverse, un déséquilibre de la balance E/I est à l'origine de diverses pathologies neurologiques comme l'épilepsie (Cossart et al., 2005 ; Bausch et al., 2006), où le nombre et la force des entrées inhibitrices sont diminuées ce qui conduit à des activités oscillatoires entre des états d'activité « stables » et des états d'hyperexcitabilité qui se traduisent par des troubles convulsifs (Brenner, 2004). Un déséquilibre du nombre et de l'efficacité des connexions excitatrices et inhibitrices striato-thalamo-corticales mène à des altérations motrices et cognitives observées dans la maladie de Parkinson (Llinas et al., 1999). Un déséquilibre de la balance E/I a aussi été impliqué dans d'autres pathologies, comme l'autisme (Rubenstein & Merzenich, 2003), le syndrome de Rett (Dani et al., 2005), le syndrome de Tourette (Singer & Minzer, 2003) et la schizophrénie (Wassef et al., 2003). Lors du processus de sénescence, l'activité inhibitrice du cortex visuel est diminuée et ce phénomène est à l'origine d'une réduction de l'acuité visuelle mesurée chez le singe (Leventhal et al., 2003). Dans ces conditions, l'utilisation d'agonistes GABAergiques est capable de restaurer partiellement l'acuité visuelle (Leventhal et al., 2003).

En résumé, le maintien d'une balance E/I stable est primordial pour le bon fonctionnement du système nerveux central (SNC) et requiert une proportionnalité entre les signaux excitateurs et inhibiteurs reçus par un neurone. Se pose alors la question de savoir comment ce niveau d'activité est maintenu lors de changements de la force des connexions excitatrices et/ou inhibitrices, qui sont à la base de l'intégration de nouvelles informations.

IV. La plasticité synaptique

Le cerveau possède la capacité de s'adapter et d'intégrer de nouvelles informations par des phénomènes de mémorisation et d'apprentissage (Bliss & Collingridge, 1993, Abraham & Bear, 1996). Ces phénomènes tout comme d'autres processus cérébraux font appel à la plasticité des synapses (Hebb 1949 ; Alkon & Nelson 1990 ; Kandel, 1997). La plasticité synaptique est le processus par lequel les synapses sont modifiées dans leur structure et dans leur fonctionnement en réponse à différents stimuli environnementaux. La majorité des travaux sur la plasticité synaptique est basée sur le postulat de Hebb (1949) qui a proposé que lorsqu'un neurone prend part de façon répétée à l'activation d'un autre neurone, l'efficacité

des connexions entre ces neurones est augmentée. Les premières évidences expérimentales de la « plasticité Hebbienne » proviennent des travaux de [Bliss & Lomo](#) en 1973 qui montrent que des changements brefs et répétitifs de l'activité des synapses excitatrices hippocampales provoquent une augmentation persistante de l'efficacité de la transmission synaptique appelée potentiation à long terme.

Au cours des 25 dernières années, de nombreux travaux se sont intéressés aux différentes formes de plasticité et aux mécanismes cellulaires à leur origine. Les modèles classiques d'étude de la plasticité synaptique sont la LTP et la LTD, qui représentent, respectivement une augmentation ou une diminution de l'efficacité de la transmission synaptique à long terme ([Bliss & Gardner-Medwin, 1973](#); [Bliss & Lomo, 1973](#) ; [Bear & Malenka, 1994](#)).

Cependant, on ne peut se limiter à l'utilisation de ces termes pour décrire la plasticité synaptique. En effet, il existe différentes formes de plasticité qui dépendent notamment de la zone cérébrale, du type de synapse impliqué, du circuit neuronal dans lequel se trouve la synapse et du type de stimulation utilisé pour produire ces changements d'efficacité ([Malenka & Bear, 2004](#)). Par conséquent, différentes formes de plasticité ont été observées. On peut par exemple distinguer la plasticité à court terme ([Zucker & Regehr, 2002](#)), à long terme dépendant de l'activation de récepteurs NMDA ([Bliss & Collingridge, 1993](#)), ou non ([Nicoll & Malenka, 1995](#)), dépendant des récepteurs glutamatergiques métabotropiques ([Oliet et al., 1997](#)) ou encore la plasticité de la plasticité synaptique (méta-plasticité) ([Abraham & Bear, 1996](#) ; [Philpot et al., 2007](#)).

Je me limiterai à la présentation des phénomènes de potentiation à long terme de plusieurs heures (LTP) et de dépression à long terme (LTD) dont l'induction résulte d'une courte période d'activité synaptique respectivement à haute ou à basse fréquence. La description de ces phénomènes a été plus particulièrement réalisée au niveau de la région CA1 de l'hippocampe ou du néocortex ([Kirkwood et al., 1993](#) ; [Kirkwood & Bear, 1994](#) ; [Bear, 1995](#) ; [Dodt et al., 1999](#) ; [Huemmeke et al., 2004](#)).

A) La plasticité des synapses excitatrices

La forme de plasticité la plus étudiée est la potentiation à long terme (LTP) des synapses excitatrices. La LTP est induite expérimentalement par deux types de stimulations, des stimulations téaniques à haute fréquence ou un protocole de « pairing » c'est-à-dire un protocole couplant des stimulations présynaptiques et postsynaptiques.

1. La potentiation à long terme (LTP)

Différents mécanismes soutiennent l'induction, l'expression et le maintien de la LTP.

a) Induction de la LTP

C'est à partir du milieu des années 80 que de nombreuses études ont mis en évidence plusieurs points caractéristiques de la LTP ([figure 17](#)). Au niveau de neurones pyramidaux de l'hippocampe ou du cortex : l'induction de la LTP par des stimulations à haute fréquence dépend de l'activation de récepteurs NMDA ([Collingridge et al., 1983](#)), d'une dépolarisation postsynaptique ([Malinow & Miller 1986](#) ; [Wigstrom et al., 1986](#)) et d'une augmentation de la concentration en Ca^{2+} dans la cellule postsynaptique ([Lynch et al., 1983](#) ; [Malenka et al., 1988](#)).

Pour l'exemple d'une synapse entre un neurone excitateur glutamatergique présynaptique et un neurone pyramidal, la libération massive de glutamate dans la fente synaptique induite par la dépolarisation de l'élément présynaptique permet l'activation des récepteurs glutamatergiques postsynaptiques AMPA et NMDA ce qui entraîne la formation de PPSEs. Ce signal dépolarisant permet d'engendrer des PAs au niveau du segment initial de l'axone qui vont se propager de façon « rétrograde » le long des dendrites vers la zone synaptique ([Magee & Johnston, 1997](#)). A ce niveau, la dépolarisation induite par les PAs rétrogrades permet d'une part, l'activation des canaux Ca^{2+} sensibles au potentiel ([Larkum et al., 2001](#)) et d'autre part, la levée de l'inhibition Mg^{2+} des récepteurs NMDA ([MacDermott et al., 1986](#) ; [Jahr & Stevens, 1987](#) ; [Ascher & Nowak, 1988](#)). Finalement, l'activation des récepteurs NMDA couplée à l'arrivée de PAs rétrogrades est à l'origine d'une importante augmentation transitoire de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire au niveau de la zone postsynaptique ([figure 18](#)) qui permet d'activer les mécanismes à la base de l'expression de la LTP ([Lynch et al., 1983](#) ; [Malenka et al., 1988](#)).

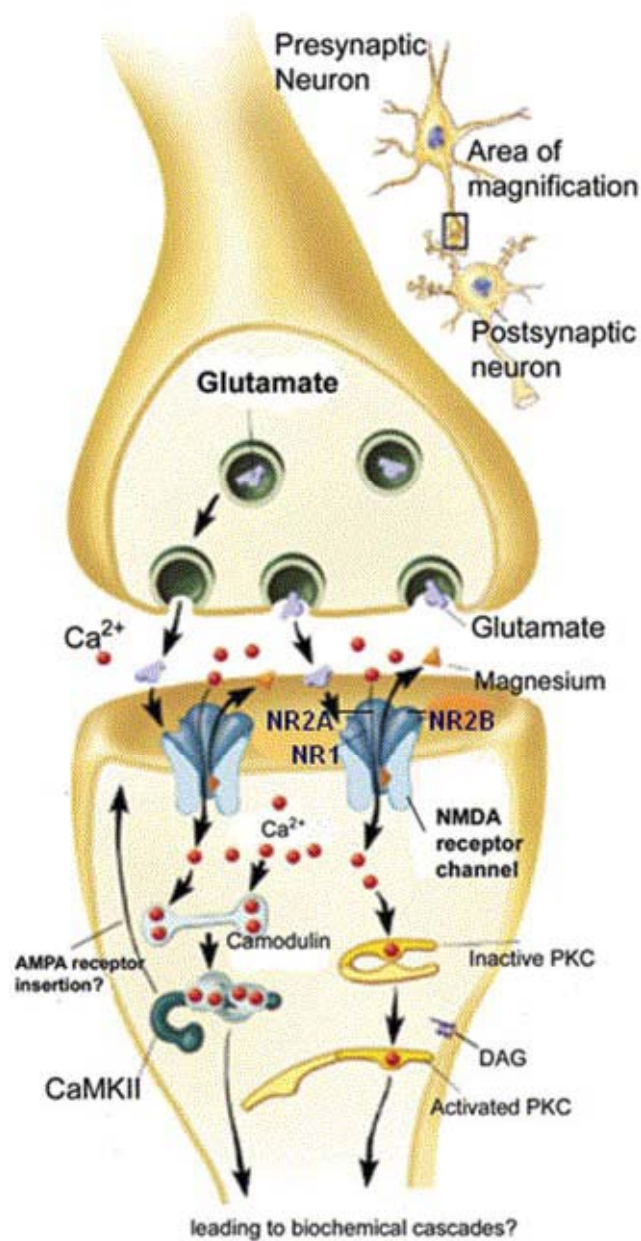


Figure 17. Schéma de l'induction de la LTP.

La libération de glutamate entraîne l'activation de récepteurs AMPA et NMDA au niveau postsynaptique. L'activation de ces récepteurs provoque une augmentation de la concentration en Ca²⁺ intracellulaire au niveau postsynaptique qui va permettre le recrutement de différentes kinases dont la Protéine Kinase C et la CalModuline Kinase II. L'activation de ces kinases permet l'expression de la LTP par l'insertion de nouveaux récepteurs AMPA à la synapse et permet le maintien de la LTP par l'activation de gènes spécifiques.

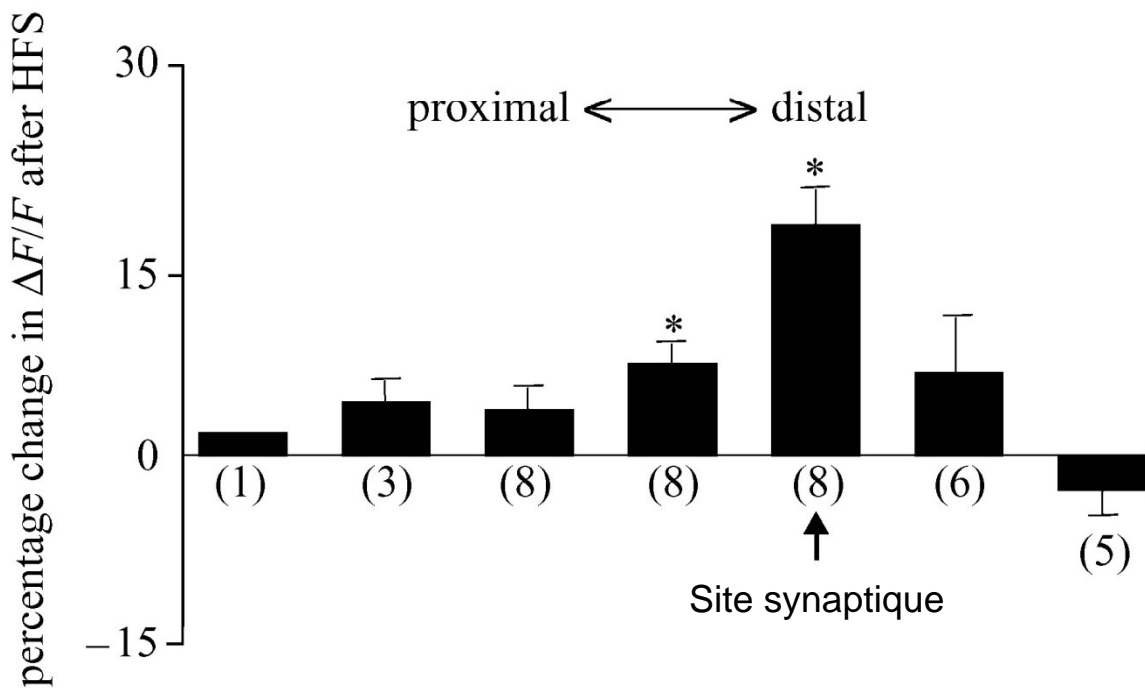


Figure 18. Variation de la concentration calcique le long de la dendrite apicale suite à l'application d'une stimulation à haute fréquence.

D'après Johnston et al., 2003; *Phil Trans R Soc Lond*

b) Expression de la LTP

De nombreux travaux se sont intéressés aux différentes voies de signalisation recrutées par l'augmentation intracellulaire de Ca^{2+} (Sanes & Lichtman, 1999). Mais malgré les efforts déployés, ces voies de signalisation restent mal connues.

Cependant, l'expression de la LTP est en fait une augmentation à long terme de l'efficacité de la transmission synaptique excitatrice AMPA. L'expression de ce changement d'efficacité est le fruit d'au moins trois mécanismes différents : des modifications postsynaptiques du nombre et des propriétés des récepteurs glutamatergiques AMPA, des modifications présynaptiques de la quantité de neurotransmetteur libéré ou des modifications du nombre de synapses fonctionnelles à travers des changements présynaptiques et/ou postsynaptiques.

i. Changements au niveau postsynaptique

L'un des mécanismes par lequel l'efficacité de la transmission synaptique AMPA est augmentée au cours de la LTP est l'augmentation du nombre de récepteurs à la synapse. Ce phénomène nécessite l'activation de mécanismes favorisant l'externalisation de « nouveaux » récepteurs AMPA au niveau de la membrane postsynaptique (Malenka & Nicoll, 1999 ; Malinow & Malenka, 2002 ; Song & Huganir, 2002 ; Bredt & Nicoll, 2003). L'induction de la LTP est un phénomène rapide qui pose par conséquent le problème de l'origine des récepteurs AMPA externalisés. Cette origine reste encore imprécise (pour revue : Malinow et al., 2000 ; Sheng & Hyung Lee, 2003), néanmoins deux pools de récepteurs AMPA ont été identifiés :

- un pool de récepteurs AMPA qui seraient présents dans des vésicules sous-synaptiques. Il a été montré en effet que le blocage de la fusion des vésicules membranaires par la toxine botulique prévient la LTP (Lledo et al., 1998), ce qui implique un mécanisme d'exocytose de ces récepteurs. Une forme d'exocytose dendritique dépendante de la CaMKII (la kinase calmoduline II) a aussi été observée sur des neurones d'hippocampe en culture (Maletic-Savatic et al., 1998).

- un pool de récepteurs AMPA membranaires, non synaptiques mais situé à proximité des synapses. Plusieurs études utilisant des techniques de microscopie ont montré que ces pools de récepteurs « extrasynaptiques » sont localisés au niveau de la membrane (Petralia & Wenthold, 1992 ; Martin et al., 1993 ; Molnar et al., 1993 ; Baude et al., 1995 ; Kharazia et

al., 1996 ; Nusser et al., 1998a; Takumi et al., 1999) et que la distance entre récepteurs extrasynaptiques et synaptiques n'est que de quelques microns, une distance qui peut être couverte en quelques secondes par des processus de transport membranaire. Ces données morphologiques ont été confirmées par une approche électrophysiologique utilisant l'expression de récepteurs AMPA recombinant (Hayashi et al., 2000).

Un autre mécanisme postsynaptique à l'origine de l'expression de la LTP est la phosphorylation des récepteurs AMPA (Benke et al., 1998 ; Malenka & Nicoll, 1999 ; Soderling & Derkach, 2000 ; Lee et al., 2003). Cette phosphorylation provoque des changements des propriétés biophysiques des récepteurs qui permettent d'augmenter leur affinité pour le glutamate (Malenka & Nicoll, 1999 ; Soderling & Derkach, 2000 ; Lisman et al., 2002). La CaMKII a été identifiée comme la kinase responsable de cette phosphorylation au niveau de la partie C-terminale de la sous-unité GluR1 des récepteurs AMPA (Barria et al., 1997 ; Mammen et al., 1997). De plus, il a été montré que l'activation de la CaMKII est suffisante à l'induction de la LTP confirmant ainsi son rôle clé dans l'induction de ce processus (Lledo et al., 1995 ; Lisman et al., 1997).

Cependant, d'autres kinases sont aussi impliquées dans l'expression de la LTP :

- La PKA (protéine kinase dépendante de l'AMP cyclique) est nécessaire à l'induction de la LTP au cours du développement postnatal précoce (Yasuda et al., 2003). Elle permet (par phosphorylation) de lever l'inhibition de la protéine phosphatase 1 (PP1) sur la CaMKII (Lisman, 1989 ; Blitzer et al., 1998 ; Brown et al., 2000).

- La PKC (protéine kinase C) est un autre médiateur de la LTP (Hu et al., 1987 ; Linden & Routtenberg, 1989 ; Malinow et al., 1989 ; Bliss & Collingridge, 1993 ; Malenka et Nicoll, 1999), et en particulier l'isoforme protéine kinase M zêta (PKM ζ) dont l'activation a été montrée comme nécessaire et même suffisante à l'expression de la LTP (Hrabetova & Sacktor, 1996 ; Ling et al., 2002).

- Plus récemment, la voie de signalisation des MAPK (protéines kinases activées par les facteurs mitogéniques) qui entraîne l'activation des kinases ERK (kinases régulées par des signaux extracellulaires) a aussi été impliquée dans l'expression de la LTP (Sweatt, 2004 ; Thomas & Huganir, 2004).

- La PI3 kinase dont le rôle dans le transport des récepteurs AMPA à la synapse a été mis en évidence sur des cultures de neurones d'hippocampe (Man et al., 2003) est un autre facteur nécessaire à l'expression de la LTP.

- Enfin, la tyrosine kinase Src peut entraîner une augmentation de l'activité des récepteurs NMDA (Salter & Kalia, 2004) et serait par conséquent un régulateur de l'efficacité de la transmission synaptique.

ii. Changements au niveau présynaptique

Des travaux récents ont montré que des modifications présynaptiques sont aussi impliqués dans l'expression de la LTP (Choi et al., 2000 ; Emptage et al., 2003 ; Zakharenko et al., 2003 ; Abidin et al., 2006). L'induction de la LTP peut ainsi entraîner, une augmentation du nombre de molécules de neurotransmetteurs par vésicule synaptique (Kullmann & Nicoll, 1992), ou une augmentation de la concentration des molécules d'adhésion vésiculaires à la membrane plasmique (Sudhof, 2001) favorisant la libération d'une plus grande quantité de neurotransmetteurs. Plusieurs hypothèses ont été émises quant aux molécules impliquées dans ces modifications présynaptiques, le BDNF synthétisé dans la terminaison présynaptique (Poo, 2001 ; Zakharenko et al., 2003) ou bien des messagers rétrogrades synthétisés au niveau postsynaptique. L'identité de ce(s) messenger(s) rétrograde(s) reste cependant ambiguë. L'acide arachidonique a été suspecté (Williams et al., 1989), mais le messenger qui a sans doute suscité le plus grand intérêt est le monoxyde d'azote (NO). En effet, la découverte du monoxyde d'azote (NO) en tant que molécule impliquée dans la neuromodulation (Garthwaite & Boulton, 1995) au niveau cérébral a complètement changé le concept de communication neuronale. Le NO présente des propriétés physico-chimiques particulières, c'est une molécule très réactive qui possède une demi-vie de quelques secondes, qui n'est pas stockée dans des vésicules et qui par conséquent est synthétisée « à la demande » par une enzyme spécifique la NO-synthase (NOS). Il existe trois types de NOS (neuronal, endothélial et inductible) qui sont à l'origine de la synthèse de NO à partir de L-arginine (Bredt & Snyder, 1992). Les NO-Synthase neuronales et endothéliales sont activées par une augmentation de la concentration intracellulaire en ions Ca^{2+} qui peut notamment provenir de l'activation des récepteurs NMDA observée lors du processus de LTP (Jaffrey & Snyder, 1995). De nombreuses études ont d'ailleurs considéré l'implication du NO dans l'induction et l'expression de la LTP (Malen & Chapman, 1997 ; Bon & Garthwaite, 2003 ; Hopper & Garthwaite, 2006 ; Haghikia et al., 2007) ainsi que dans l'induction de la LTD (Daniel et al., 1998). Le NO synthétisé à

deux types d'effets : au niveau postsynaptique, il active la guanylate cyclase ce qui augmente le taux de GMPc et recrute une protéine kinase G qui pourrait par phosphorylation provoquer l'augmentation du nombre de récepteurs au glutamate à la membrane (Ko & Kelly, 1999 ; Lu et al., 1999 ; Choï et al., 2000). Au niveau présynaptique, le NO agit en tant que messenger rétrograde afin d'augmenter la libération du glutamate (Larkman & Jack, 1995). Inversement, le NO est aussi impliqué dans la LTD (dépression à long terme) au cours de laquelle il diminue l'efficacité de la transmission synaptique, probablement en réduisant la sensibilité des récepteurs au glutamate (Daniel et al., 1998).

iii. Changements du nombre de synapses actives

Il existe au niveau du système nerveux central, des synapses « inactives » appelées synapses silencieuses, c'est-à-dire des synapses pour lesquelles des stimuli n'entraînent pas de courant postsynaptique excitateur (CPSE) mesurable. L'induction d'une LTP au niveau de ces synapses peut entraîner les modifications présynaptiques et postsynaptiques préalablement décrites. Ces modifications synaptiques auront pour conséquences de favoriser l'activation de ces synapses en réponse à des stimuli (Kauer et al., 1988 ; Muller & Lynch, 1988).

c) Maintien de la LTP

Le maintien de la LTP nécessite l'activation de gènes et la synthèse de nouvelles protéines (Abraham & Williams, 2003 ; Pittenger & Kandel, 2003 ; Lynch, 2004). Là encore, les voies de signalisation et les molécules impliquées restent très discutées. Le facteur de transcription CREB a été incriminé dans le maintien de la LTP suite à son activation par diverses kinases comme la PKA, la CaMKIV et la MAPK (Silva et al., 1998 ; Pittenger & Kandel, 2003 ; Abraham & Williams, 2003 ; Lynch, 2004). L'activation de nouveaux gènes conduira à un remodelage synaptique. Des changements morphologiques ont été rapportés suite à l'induction de la LTP, comme la croissance de nouvelles épines dendritiques (Matsuzaki et al., 2004) ou l'élargissement des sites postsynaptiques à forte densité en récepteurs (Yuste & Bonhoeffer, 2001 ; Abraham & Williams, 2003).

2. La dépression à long terme (LTD)

C'est à partir de 1992, avec la mise au point de protocoles de stimulation capables d'induire une dépression à long terme de l'efficacité de la transmission synaptique sur des tranches d'hippocampe (Dudek & Bear, 1992) que la caractérisation de la LTD s'est véritablement intensifiée. Il a été rapidement établi que la forme de LTD induite par des stimulations répétitives à faible fréquence ("Low Frequency of Stimulation", LFS de 0,5 et 3 Hz) nécessite l'activation des récepteurs NMDA (Dudek & Bear, 1992 ; Mulkey & Malenka, 1992) qui provoque une augmentation de la concentration en ions Ca^{2+} au niveau postsynaptique mais de moindre importance, comparée à l'augmentation en Ca^{2+} à l'origine de l'induction de la LTP (Mulkey & Malenka, 1992).

a) Induction de la LTD

L'induction d'une LTD persistante nécessite une stimulation présynaptique prolongée (*e.g.* 900 pulses) à basse fréquence (Dudek & Bear, 1992, 1993) qui permet la génération de PPSEs au niveau postsynaptique. Une dépolarisation de l'élément postsynaptique permettant la propagation de potentiels d'action rétrogrades le long de la dendrite apicale est également nécessaire. Seuls, les PPSEs ou les PAs rétrogrades ne peuvent induire de dépression à long terme (Figure 19) (Christie et al., 1996a).

Comme pour la LTP, la LTD dépend d'une augmentation transitoire de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire au niveau du neurone postsynaptique (Mulkey & Malenka, 1992). Ce signal calcique a plusieurs origines, il peut provenir d'un afflux de Ca^{2+} extracellulaire qui est la conséquence de l'activation de récepteurs NMDA. Il a été démontré que le blocage de ces récepteurs rend impossible l'induction de la LTD (Dudek & Bear, 1992 ; Mulkey & Malenka, 1992) alors que leur activation peut directement induire ce phénomène (Cummings et al., 1996 ; Kandler et al., 1998 ; Lee et al., 1998 ; Kamal et al., 1999 ; Li et al., 2004). L'afflux de Ca^{2+} extracellulaire à l'origine de l'induction de la LTD provient aussi de l'activation des canaux calciques dendritiques sensibles au potentiel puisque leur blocage empêche également l'induction de la LTD (Christie et al., 1996a, b).

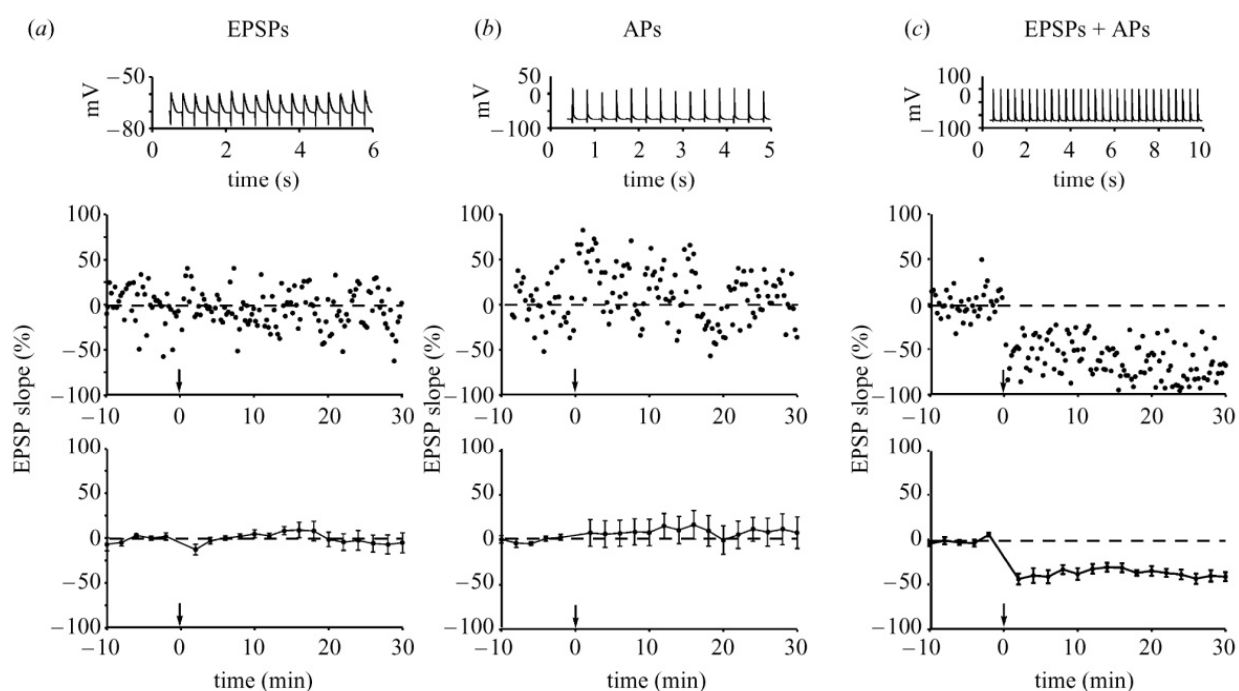


Figure 19. Induction de la LTD au niveau des neurones pyramidaux de la région CA1 de l'hippocampe.

- (a) La stimulation des collatérales de Schaeffer par un protocole de stimulation de 900 pulses à 3 Hz n'entraîne pas de modifications notoires de des PPSEs enregistrés au niveau d'un neurone pyramidal de la région CA1 de l'hippocampe.
- (b) Application d'un courant dépolarisant au niveau du soma du neurone pyramidal induisant des trains de PAs à une fréquence de 3 Hz. Aucun changement significatif de l'amplitude des PPSE n'est mesurée.
- (c) Couplage entre les stimulations pré et postsynaptique décrite en a et b. Dans ces conditions, une dépression à long terme des PPSE est induite.

D'après Johnston et al., 2003; *Phil Trans R Soc Lond*

En plus d'un afflux de Ca^{2+} extracellulaire, l'induction de la LTD pourrait aussi dépendre de la libération de Ca^{2+} des réserves intracellulaires. Les réserves calciques intracellulaires ont notamment été incriminées dans une forme de LTD hétérosynaptique, c'est-à-dire la propagation de la LTD induite au niveau d'une synapse aux synapses avoisinantes (Nishiyama et al., 2000). En effet, l'application d'un protocole de LTD au niveau d'une synapse, couplée à une libération de Ca^{2+} des stores intracellulaires (par blocage de la PI3 kinase), induit non seulement une dépression de l'efficacité de la transmission synaptique de cette synapse mais aussi des synapses avoisinantes par des mécanismes encore inconnus (Daw et al., 2002).

b) Expression de la LTD

L'expression de la LTD consiste en une diminution de l'efficacité de la transmission synaptique excitatrice glutamatergique qui, comme pour la LTP, est la conséquence de changements de l'état de phosphorylation des récepteurs AMPA (figure 20). La LTP est associée à la phosphorylation du résidu sérine 831 (ser-831) de la sous-unité GluR1 par la CaMKII, sans déphosphorylation de la sérine 845 (ser-845) (Barria et al., 1997 ; Lee et al., 2000). Inversement, la LTD est associée à la déphosphorylation sélective de la ser-845, sans changement de la ser-831 (Lee et al., 1998, 2000). La déphosphorylation de la ser-845 est partiellement responsable de la LTD car elle diminue la probabilité d'ouverture des récepteurs canaux AMPA (Banke et al., 2000) et il a été observé que l'induction de la LTD est impossible chez des souris dont les résidus sérine 845 et 831 ont été remplacés par des résidus alanine par mutagenèse dirigée (Lee et al., 2003). Parmi les kinases impliquées, la PKA semble avoir un rôle prépondérant dans la phosphorylation du résidu sérine 845 de la sous-unité GluR1 du récepteur AMPA (Barria et al., 1997 ; Lee et al., 2000). L'activation postsynaptique de cette kinase empêche l'induction de la LTD (Kameyama et al., 1998). De plus, des études biochimiques ont corrélé l'induction de la LTD avec une déphosphorylation des substrats de la PKA, ainsi que des substrats de la PKC sans modification notable des substrats de la CaMKII (Kameyama et al., 1998 ; Lee et al., 1998 ; Hrabetova & Sacktor, 2001 ; van Dam et al., 2002). La déphosphorylation des substrats de la PKA serait provoquée par l'activation de la protéine phosphatase 1 (PP1) (Morishita et al., 2001 ; Gomez et al., 2002). Ce rôle de la PP1 a été confirmé lors d'expériences où l'induction de la LTD est rendue impossible par l'introduction au niveau postsynaptique d'inhibiteurs de cette phosphatase (Mulkey et al., 1993 ; Kirkwood & Bear, 1994 ; Mulkey et al., 1994).

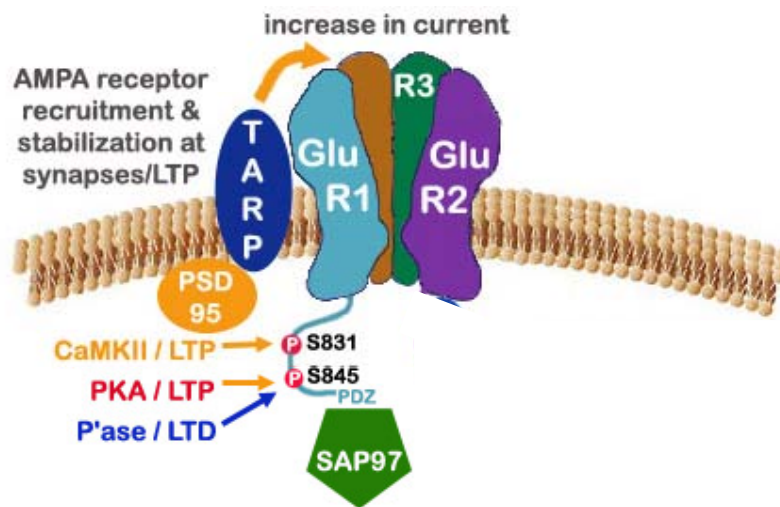


Figure 20. Les principaux sites de phosphorylation des récepteurs AMPA.

La phosphorylation des résidus sérine 831 et 845 par la CalModuline kinase II et la Protéine Kinase A favoriserait la LTP. La déphosphorylation de la sérine 845 par la Protéine Phosphatase 1 favoriserait la LTD.

(TARP: « Transmembrane AMPA Receptor Protein »; PSD 95: « Postsynaptic Density Protein 95 »; SAP 97: « Synapse Associated Protein 97 »)

D'après Smith et al., 2005; *CellsScience Reviews*.

La déphosphorylation du résidu sérine 845 par la PP1 aurait pour conséquence l'internalisation des récepteurs AMPA (Ehlers, 2000). Les changements de l'état de phosphorylation des récepteurs AMPA au cours de l'induction de la LTD provoqueraient l'internalisation de ces récepteurs par des mécanismes d'internalisation dépendant de la clathrine et de la dynamine (Carroll et al., 1999 ; Luthi et al., 1999 ; Beattie et al., 2000 ; Ehlers, 2000 ; Heynen et al., 2000 ; Lin et al., 2000 ; Man et al., 2000 ; Lee et al., 2002). Finalement, l'expression de la LTD se traduit par une diminution du nombre de récepteurs AMPA à la synapse (Lissin et al., 1998).

Pour généraliser, il apparaît probable que l'activation de la PKA et la phosphorylation du résidu sérine 845 qui en découle favorise l'expression de la LTP, alors que l'activation de la PP1 entraîne la déphosphorylation de ce même résidu et permet l'expression de la LTD.

c) Maintien de la LTD

D'après ces observations, il semble que l'efficacité de la transmission synaptique dépende en partie du « turnover » des récepteurs AMPA au niveau postsynaptique (Nishimune et al., 1998 ; Song et al., 1998 ; Lüscher et al., 1999 ; Shi et al., 2001). Le rôle des protéines d'ancrage des récepteurs AMPA à la synapse et plus particulièrement le rôle de la protéine PSD-95 (« postsynaptic density ») a fait l'objet de plusieurs investigations (Shi et al., 2001 ; Malinow & Malenka, 2002). La protéine PSD-95 est directement ancrée à la membrane synaptique par palmitoylation (El-Husseini Ael et al., 2002) et est localisée au niveau des synapses par des interactions entre son domaine de liaison protéique PDZ et son homologue cytoplasmique des récepteurs NMDA (Sheng, 2001). La PSD-95 est aussi capable de se lier avec la stargazine, une protéine qui escorte les récepteurs AMPA à la synapse (Chen et al., 2000 ; Schnell et al., 2002). Finalement, la sur-expression de la PSD-95 au niveau postsynaptique induit une augmentation du nombre de récepteurs AMPA à la synapse (Schnell et al., 2002) ; et inversement, le blocage de l'expression de la PSD-95 empêche la localisation synaptique des récepteurs AMPA (El-Husseini Ael et al., 2002). Il s'avère donc que cette protéine est à l'origine de la fixation des récepteurs AMPA au niveau des membranes synaptiques (Schnell et al., 2002) et que la régulation de son expression est un des mécanismes qui permet l'expression et le maintien des phénomènes de plasticité synaptique.

3. Induction différentielle de la LTP ou de la LTD au niveau des synapses excitatrices

a) La fréquence de stimulation

Il est possible d'induire des formes de LTD ou de LTP par des protocoles de « pairing » qui consistent à dépolariser à la fois l'élément présynaptique et l'élément postsynaptique (Johnston et al., 2003). Ainsi l'induction de PPSEs par une stimulation présynaptique à basse fréquence, couplée avec la génération de trains de PAs postsynaptiques de 1 à 3 Hz de fréquence obtenue par injection de courant au niveau du soma de la cellule postsynaptique, permet l'induction de la LTD. Alors que le couplage entre des stimulations présynaptiques à haute fréquence et la génération de PAs rétrograde dans une gamme de fréquence plus importante (de 30 à 200 Hz) entraîne l'induction de la LTP (Johnston et al., 2003).

La différence de fréquence à l'origine de l'induction de tel ou tel phénomène est aussi reliée à une différence d'amplitude de l'influx de Ca^{2+} généré au niveau postsynaptique (figure 21) (Lisman, 1989 ; Bliss & Collingridge, 1993 ; Yang et al., 1999).

b) La synchronisation des activités présynaptique et postsynaptique

Récemment, il a été mis en évidence que la différenciation entre LTP et LTD dépend aussi, de façon critique de l'ordre et de la synchronisation des activités présynaptique et postsynaptique (Markram et al., 1997 ; Bi & Poo, 1998 ; Debanne et al., 1998 ; Zhang et al., 1998a ; Egger et al., 1999 ; Feldman, 2000), ce phénomène est décrit sous le terme de « spike timing-dependent plasticity » (STDP) (Abbott & Nelson, 2000).

Pour des synapses excitatrices sur les neurones pyramidaux de couche 5 du cortex ou de l'hippocampe, la LTP est induite si les PPSEs (qui dépendent de l'activité présynaptique) se produisent avant les PAs postsynaptiques dans une fenêtre de temps de 10 ms alors que la LTD est induite si les PAs postsynaptiques sont générés avant les PPSEs (Markram et al., 1997 ; Bi & Poo, 1998 ; Debanne et al., 1998 ; Feldman, 2000 ; Sjostrom et al., 2001) (figure 21). Cette synchronisation dépend des signaux calciques produits par les PPSEs et les PAs rétrograde (Yuste & Denk, 1995 ; Magee & Johnston, 1997 ; Koester & Sakmann, 1998 ; Schiller et al., 1998).

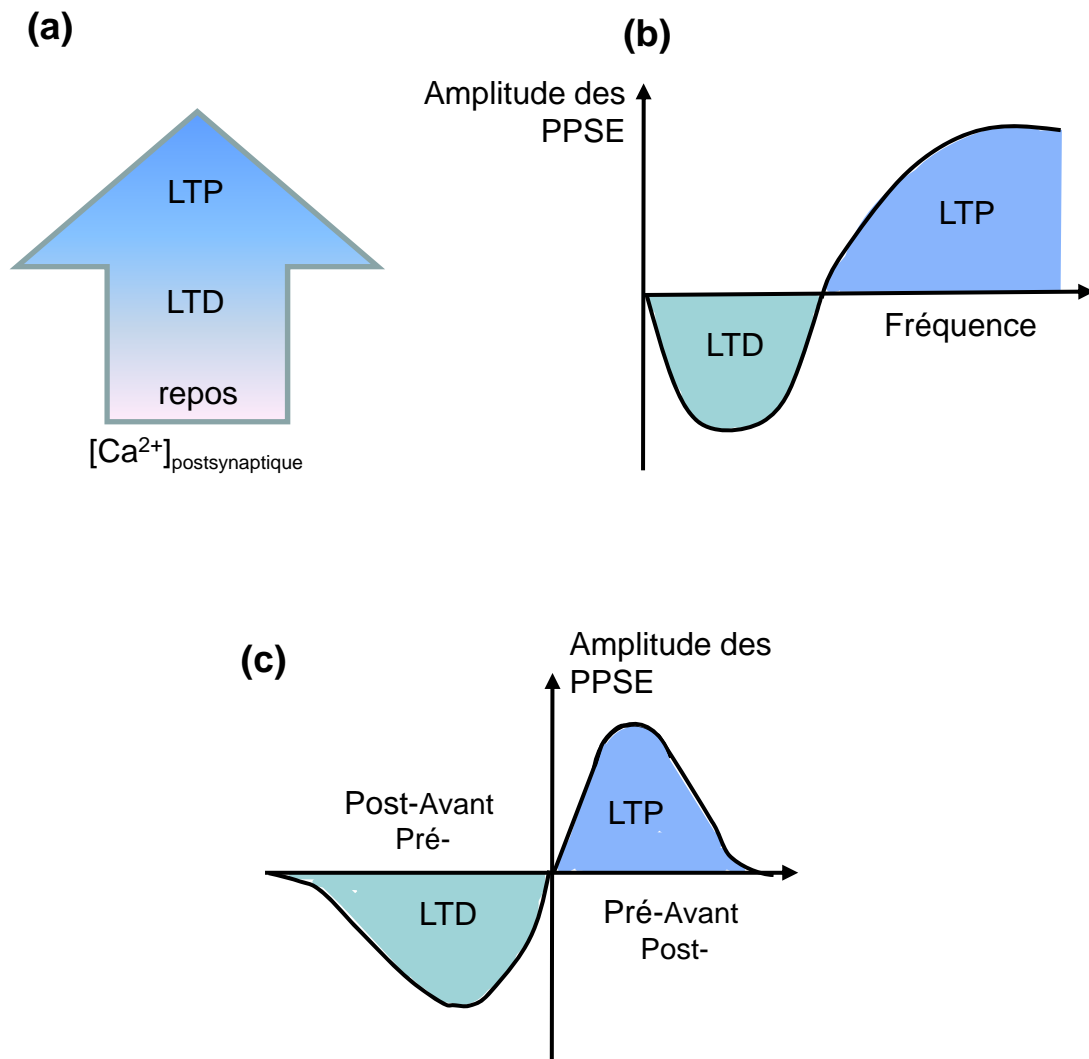


Figure 21. Schéma de l'induction différentielle des phénomènes de LTD ou de LTP.

- (a) En fonction de l'augmentation de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire.
- (b) En fonction de l'augmentation de la fréquence de stimulation.
- (c) En fonction de la coïncidence entre les dépolarisations des éléments pré- et post-synaptique.

Schéma modifié d'après Sjöström et Nelson, 2002; *Curr Opin Neurobiol*

c) L'hypothèse NMDA

Bien qu'il existe des formes de plasticité synaptiques indépendante des récepteurs NMDA, ce récepteur est à l'origine de la majorité des phénomènes de plasticité synaptique LTP ou LTD décrits (Malenka & Bear, 2004). Se pose alors le problème de savoir comment l'activation d'un même récepteur peut aboutir à deux processus différents. Cette dichotomie peut être liée à l'activation de différents sous-types de récepteurs NMDA.

i. *La structure des récepteurs NMDA*

Les récepteurs NMDA sont des complexes hétéromériques. Trois sous-unités ont été décrites : NR1, NR2 et NR3. Chaque sous-unité possède différentes isoformes, ainsi il existe huit formes différentes de sous-unité NR1 générées par épissage alternatif, quatre sous-unités NR2 différentes (A, B, C et D) (Forrest et al., 1994 ; Hollman & Heinemann, 1994) et deux sous-unités NR3 (A et B) (Ciabarra et al., 1995 ; Sucher et al., 1995 ; Chatterton et al., 2002 ; Matsuda et al., 2002). La plupart des récepteurs NMDA sont constitués de deux sous-unités NR1 et de deux sous-unités NR2 (figure 22). Cependant des formes trihétéromériques NR1/NR2/NR3 ont récemment été mises en évidence (Sasaki et al., 2002).

ii. *L'expression des sous-unités NR2*

La sous-unité NR2 est la sous-unité sur laquelle se fixe le glutamate et qui apparaît comme la sous-unité fonctionnelle déterminant la perméabilité du canal aux ions Ca^{2+} (Furukawa 2005 ; Chen & Wyllie, 2006). Le type de sous-unité NR2 caractérise les propriétés biophysiques et pharmacologiques des récepteurs NMDA (Cull-Candy et al., 2001) et notamment leur sensibilité aux ions Zn^{2+} , aux protons et aux polyamines, ainsi que leurs interactions avec les molécules de signalisation (Dingledine et al., 1999 ; Sheng & Kim, 2002 ; Cull-Candy & Leszkiewicz, 2004). Les sous-unités NR2A et NR2B sont les formes prédominantes dans le SNC, leur niveau d'expression varie au cours du développement (Monyer et al., 1994 ; Babb et al., 2005) et selon les régions cérébrales. Au niveau du cortex visuel, la sous-unité NR2B est exprimée à la naissance et est la sous-unité NR2 la plus exprimée jusqu'à la deuxième et la troisième semaine post-natale chez le rat (Kew et al., 1998 ; Tongiorgi et al., 2003 ; Babb et al., 2005). La sous-unité NR2A est faiblement exprimée à la naissance et son niveau d'expression augmente progressivement au cours du développement (Kew et al., 1998 ; Yoshimura et al., 2003 ; Liu et al., 2004a).

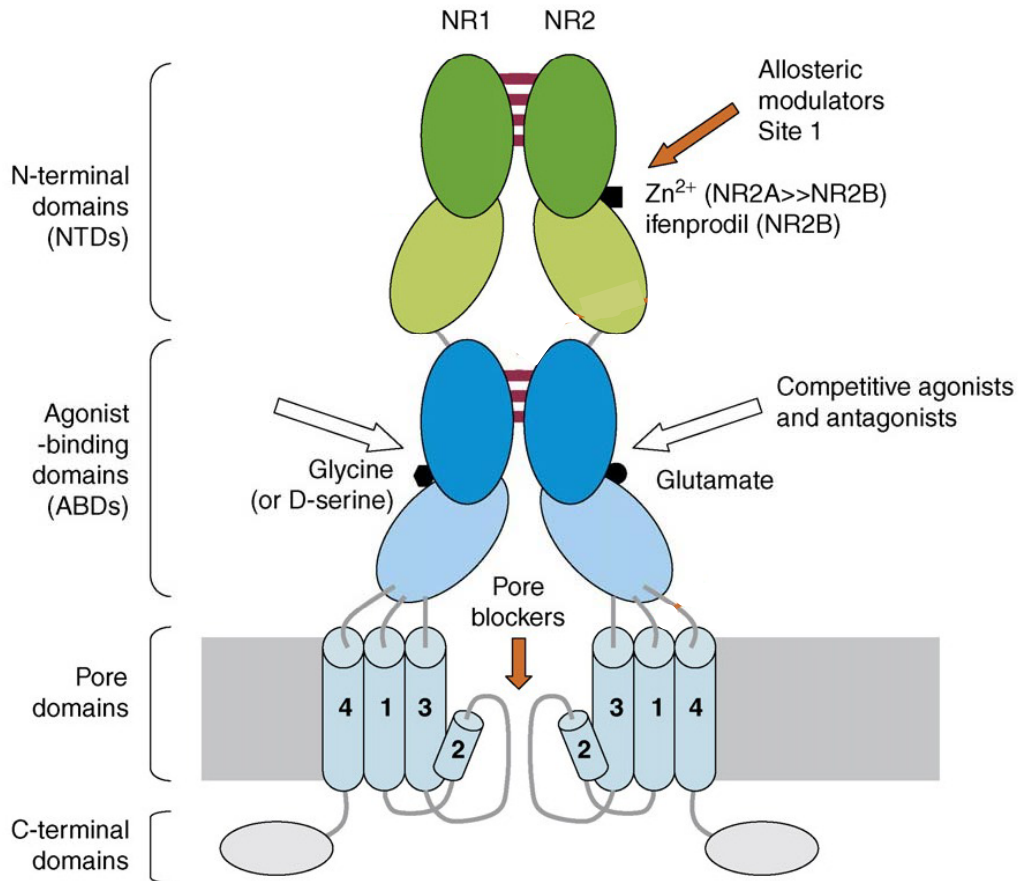


Figure 22. Structure des récepteurs NMDA.

Les récepteurs NMDA hétéromériques sont composés de deux sous-unités NR1, qui possèdent un site de liaison extracellulaire pour un co-agoniste (glycine ou D-sérine), reliées à deux sous-unités NR2 qui possèdent un site de fixation pour le glutamate.

D'après Paoletti et Neyton 2006, *Curr Opin Pharmacol*

iii. Les sous-unités NR2 et l'orientation de la plasticité synaptique

Différentes études soutiennent l'idée qu'il existe un rôle différentiel entre les sous-unités NR2A et NR2B dans l'induction des processus de LTP et de LTD (Tang et al., 1999 ; Hendricson et al., 2002 ; Liu et al., 2004b). Cependant, les résultats sont contradictoires, la sous-unité NR2A a été impliquée dans l'induction du phénomène de LTP alors que la sous-unité NR2B serait impliquée dans l'induction du phénomène de LTD (Liu et al., 2004b ; Massey et al., 2004), mais d'autres études ont montré que la sous-unité NR2B était nécessaire à l'induction de la LTP (Tang et al. 1999 ; Wong et al., 2002 ; Zhao et al., 2005). D'autre part, des résultats récents ont remis en cause l'existence d'un rôle différentiel de NR2A et de NR2B dans ces processus (Berberich et al., 2005 ; Toyoda et al., 2005 ; Weitlauf et al., 2005).

iv. La sous-unité NR1 et l'orientation de la plasticité synaptique

Une étude récente a également mis en évidence l'importance de la fixation des co-agonistes du glutamate (D-sérine et/ou glycine ; figure 22), sur la sous-unité NR1 des récepteurs NMDA, dans l'orientation (LTP ou LTD) de la plasticité synaptique. Il a en effet été montré que l'application d'un protocole de LTP capable d'induire une augmentation à long terme de l'efficacité de la transmission synaptique des synapses glutamatergiques de la région CA1 de l'hippocampe devient, en présence d'un bloqueur du site de fixation des co-agonistes (appelé site de « liaison à la glycine »), incapable d'induire cette LTP, mais induit au contraire une LTD de ces synapses (Krasteniakov et al., 2005).

4. Modulateurs de la plasticité

Un grand nombre de facteurs sont impliqués dans la modulation de la plasticité synaptique. Au niveau du cortex visuel, un rôle modulateur des principaux neuromédiateurs, acétylcholine, sérotonine, noradrénaline ou encore dopamine a été mis en évidence (Kirkwood et al 1999 ; Kuczewski et al., 2005 ; Kim et al., 2006 ; Origlia et al., 2006 ; Chen et al., 2007).

Il semble également important de citer le rôle des astrocytes dans la régulation de l'efficacité de la transmission synaptique qui fait actuellement l'objet de nombreuses études (Volterra & Meldolesi, 2005 ; Haydon & Carmignoto, 2006 ; Halassa et al., 2007). Les astrocytes sont des cellules gliales qui entourent les synapses et qui peuvent être activés par la libération de neurotransmetteurs à ce niveau. Selon leur niveau d'activation, les astrocytes peuvent en

réponse libérer des molécules chimiques spécifiques, les gliotransmetteurs, tels que le glutamate (Araque et al., 1998), la D-sérine (Bergeron et al., 1998 ; Danysz & Parsons, 1998 ; Panatier et al., 2006), la taurine (Deleuze et al., 2005) ou encore l'ATP (Newman et al., 2003) qui sont capables d'ajuster l'efficacité de la transmission synaptique (tableau 1).

B) La plasticité des synapses inhibitrices

Depuis le postulat de Hebb, les études sur la plasticité synaptique se sont pour la plus grande part focalisées sur les synapses excitatrices. L'activité corticale dépend également de l'activité de circuits inhibiteurs et de la plasticité des synapses inhibitrices (GABAergiques et glycinergiques), peu étudiée jusqu'à présent mais qui fait l'objet de plus en plus de travaux (pour revue : Gaiarsa et al., 2002 ; Gaiarsa, 2004 ; Mendoza et al., 2006). Les deux formes de plasticité synaptique, la LTP (Xie et al., 1995 ; Komatsu, 1996 ; Maccaferri & McBain, 1996 ; McLean et al., 1996 ; Caillard et al., 1999a ; Ouardouz & Sastry, 2000 ; Shew et al., 2000 ; Patenaude et al., 2003) et la LTD (McLean et al., 1996 ; Morishita & Sastry, 1996 ; Kotak & Sanes, 2000 ; Lu et al., 2000 ; Chevaleyre & Castillo, 2003) de la transmission synaptique inhibitrice ont été observées dans différentes régions cérébrales des mammifères (l'hippocampe, le cortex, le cervelet). Malgré le nombre limité de ces études, différents mécanismes ont été proposés sans pour autant définir de règles précises (Pitler & Alger, 1992, 1994 ; Komatsu, 1994 ; Kano, 1995 ; Zilberter, 2000 ; Kreitzer & Regehr, 2001; Wilson & Nicoll, 2001 ; Kilman et al., 2002 ; Maffei et al., 2006).

1. Induction de la plasticité des synapses inhibitrices

La plasticité des synapses inhibitrices a été essentiellement étudiée par mesure de courants ou de potentiels postsynaptiques inhibiteurs (CPSI ou PPSI) isolés pharmacologiquement sur des neurones pyramidaux excitateurs suite à la stimulation de fibres inhibitrices afférentes (Korn et al., 1992 ; Komatsu, 1994 ; Glaum & Brooks, 1996 ; McLean et al., 1996 ; Caillard et al., 1999a ; Grabauskas & Bradley, 1999 ; Kotak & Sanes, 2000), ainsi que par mesure de CPSIs unitaires induits par la stimulation directe d'interneurones spécifiques (Charpier et al., 1995 ; Hashimoto et al., 1996 ; Kang et al., 1998 ; Holmgren & Zilberter, 2001).

Gliotransmetteur	Signaux de libération	Sites d'action	Cellules cibles (et effets)
glutamate	Glutamate, GABA, ATP, TNF- α , activité	Récepteurs au glutamate	Astrocytes, neurones (excitateur)
ATP	ATP, glutamate	Récepteurs à l'ATP P2X, P2Y	Astrocytes, neurones, vaisseaux sanguins ? (excitateur)
adénosine	ATP, glutamate	Récepteurs à l'adénosine	Neurones (inhibiteur)
D-sérine	glutamate	Site glycine des récepteurs NMDA	Neurones (excitateur)
Taurine	glutamate	Récepteurs à la glycine et au GABA	Neurones (inhibiteur)
Cytokines (TNF- α)	SDF1 α	Récepteurs au TNF- α	Astrocytes, neurones (excitateur)
Protéines et peptides (AchBP, ANP)	Ach, ???	Les récepteurs à l'Ach et aux différents peptides	Neurones (inhibiteur)

Tableau 1. Répertoire des gliotransmetteurs.

Tableau récapitulatif présentant les signaux à l'origine de la libération des principaux gliotransmetteurs, leurs sites d'action et leurs effets (excitateur ou inhibiteur) sur leurs cellules cibles.

(TNF: « Tumor Necrosis Factor »; SDF: « Stromal-Derived Factor », une chimiokine; AchBP: « Acetylcholine-Binding Protein »; ANP: « Atrial Natriuretic Peptide »)

Modifié d'après Volterra et Meldolesi 2005, *Nature Reviews Neuroscience*.

Comme pour les synapses excitatrices, l'induction de changements d'efficacité à long terme de la transmission synaptique inhibitrice dépend : de la fréquence des stimuli, d'une dépolarisation postsynaptique ainsi que d'un signal Ca^{2+} postsynaptique.

a) La fréquence de stimulation

Contrairement aux synapses excitatrices, des stimulations à haute fréquence sont capables d'induire une dépression à long terme de la transmission inhibitrice sur les cellules pyramidales de la région CA3 de l'hippocampe (McLean et al., 1996) et sur les cellules pyramidales de couche 5 du cortex visuel (Komatsu & Iwakiri, 1993).

A l'inverse, au niveau des noyaux profonds du cervelet, la potentiation à long terme de la transmission synaptique inhibitrice est induite suite à des stimulations à haute fréquence (2 trains de 20 stimuli à 100 Hz) (Ouardouz & Sastry, 2000), alors qu'une stimulation à 10 Hz induit une dépression à long terme de ces mêmes synapses (Morishita et Sastry, 1996 ; Holmgren & Zilberter, 2001).

b) La dépolarisation postsynaptique

La synchronisation entre une dépolarisation présynaptique et une dépolarisation postsynaptique apparaît nécessaire à l'induction de la plasticité des synapses inhibitrices. Cependant, l'activation de synapses inhibitrices est par définition, incapable d'induire une dépolarisation de l'élément postsynaptique. Par conséquent des changements d'efficacité de la transmission synaptique inhibitrice nécessitent également l'arrivée sur le neurone postsynaptique de signaux excitateurs coïncidents, capables de provoquer une dépolarisation du neurone postsynaptique (Holmgren & Zilberter, 2001 ; Woodin et al., 2003).

Il est important de noter qu'au cours du développement précoce, les synapses GABAergiques et glycinergiques peuvent être excitatrices et ainsi induire elles-mêmes la dépolarisation postsynaptique nécessaire à l'induction de la potentiation (figure 23 ; Ben-Ari, 2002). Pour des cerveaux encore immatures (P0-P5), l'activation des récepteurs GABAergiques et glycinergiques induit un signal excitateur car la concentration intracellulaire en ions Cl^- est supérieure à la concentration extracellulaire (Ben-Ari, 2002).

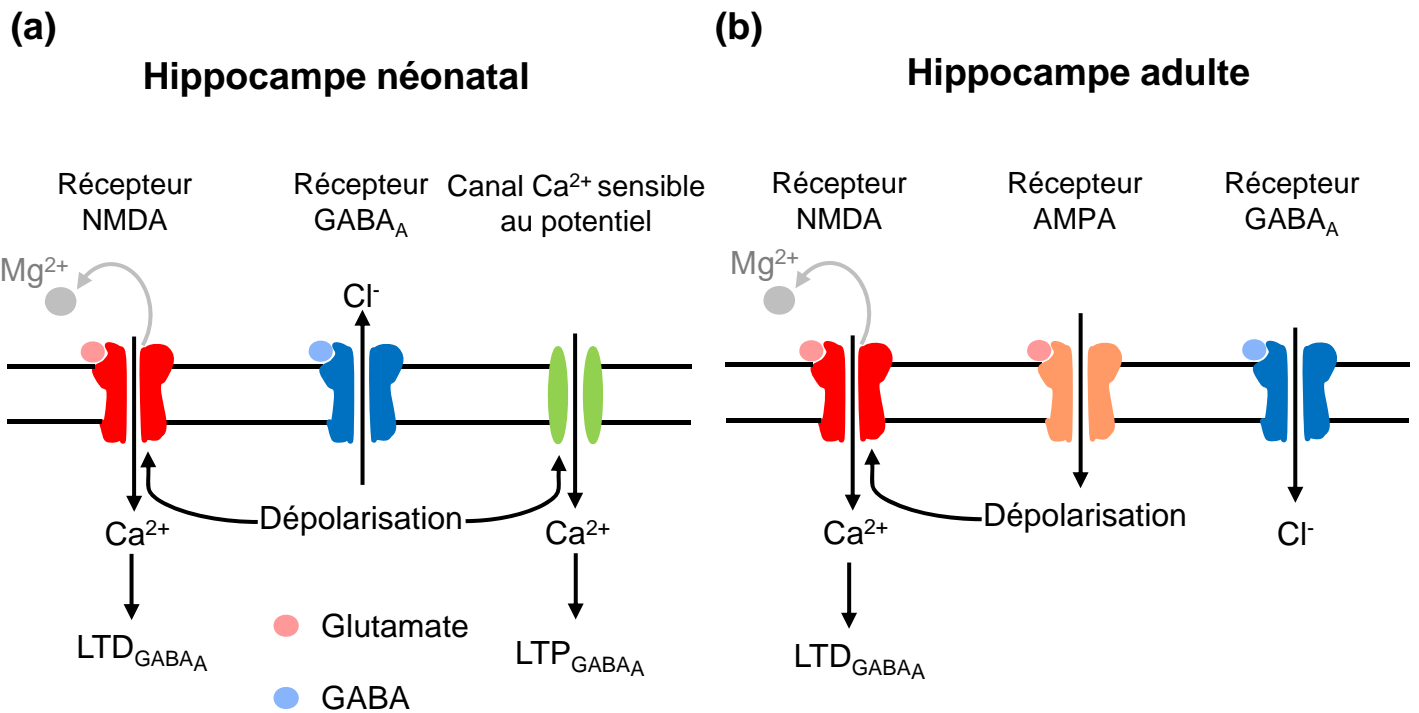


Figure 23. La plasticité des synapses inhibitrices des neurones pyramidaux de l'hippocampe.

- (a) Au cours de la période précoce de développement (P0-P5). L'activation des récepteurs GABA_A provoque une sortie de Cl⁻ et entraîne une dépolarisation de l'élément postsynaptique. Cette dépolarisation active des canaux Ca²⁺ sensibles au potentiel et l'influx de Ca²⁺ qui en découle entraîne une LTP des synapses GABAergiques. La dépolarisation permet également de lever l'inhibition Mg²⁺ des récepteurs NMDA et l'influx de Ca²⁺ qui en résulte permet l'induction d'une LTD des synapses GABAergiques.
- (b) Pour des animaux adultes, l'activation des récepteurs NMDA entraînent une LTD des synapses GABAergiques. Dans ces conditions, c'est la dépolarisation induite par l'activation des récepteurs AMPA qui permet la levée de l'inhibition Mg²⁺ des récepteurs NMDA.

D'après Gaiarsa 2002, *Trends Neurosci*

c) Le signal calcique

La plasticité des synapses inhibitrices entre un interneurone présynaptique et une cellule pyramidale nécessite également un signal Ca^{2+} postsynaptique (Kano et al, 1992 ; Komatsu & Iwakiri, 1993 ; Komatsu, 1996 ; McLean et al., 1996 ; Morishita & Sastry, 1996 ; Aizenman et al., 1998 ; Caillard et al., 1999a ; Ouardouz & Sastry, 2000). L'augmentation de la concentration en Ca^{2+} peut avoir plusieurs origines :

- L'activation de récepteurs NMDA postsynaptiques induit un signal Ca^{2+} à l'origine de l'induction d'une LTD des synapses inhibitrices au niveau du cortex visuel (Komatsu & Iwakiri, 1993 ; Komatsu, 1994, 1996), de la région CA3 de l'hippocampe (figure 23) (McLean et al., 1996 ; Caillard et al., 1999b ; Gubellini et al., 2001) ou encore au niveau des noyaux profonds du cervelet (Morishita & Sastry, 1996 ; Aizenman et al., 1998 ; Ouardouz & Sastry, 2000).

- L'activation de canaux Ca^{2+} postsynaptiques sensibles au potentiel engendre un signal Ca^{2+} qui permet l'induction d'une LTP ou d'une LTD des synapses inhibitrices au niveau des noyaux profonds du cervelet (Kano et al., 1992 ; Hashimoto et al., 1996 ; Kano et al., 1996) ou encore au niveau des synapses GABAergiques d'hippocampe juvénile (P0-P8) (Caillard et al, 1999b).

- Enfin, l'augmentation intracellulaire de la concentration de Ca^{2+} postsynaptique peut également provenir de la libération de Ca^{2+} de stores intracellulaires et être à l'origine de l'induction d'une LTP au niveau du cortex visuel (Komatsu, 1996) ou des cellules de Purkinje du cervelet (Hashimoto et al., 1996).

2. Mécanismes cellulaires à la base de l'induction de la plasticité des synapses inhibitrices

Il existe peu de données concernant les mécanismes cellulaires à l'origine des modifications de l'efficacité de la transmission synaptique inhibitrice.

a) La potentiation à long terme

Dans le gyrus denté, il a été montré que l'insertion de nouveaux récepteurs GABA_A est à la base de l'augmentation d'amplitude des CPSIs unitaires et donc de la LTP des synapses

inhibitrices (Nusser et al., 1998b). Par ailleurs, le blocage de l'endocytose dépendante de la clathrine des récepteurs GABA_A entraîne une augmentation de la libération de la quantité de neurotransmetteurs pour des neurones hippocampaux en culture (Kittler et al., 2000), ce qui indique l'existence de messagers rétrogrades. Une LTP des synapses inhibitrices a aussi été observée dans le cervelet (Kano et al., 1996) où son induction nécessite une activité phosphatase postsynaptique (Morishita & Sastry, 1996).

b) La dépression à long terme

Dans la région CA1 de l'hippocampe adulte, des stimulations à haute fréquence produisent une dépression à long terme des synapses inhibitrices (entre un interneurone et une cellule pyramidale) qui requiert un signal Ca²⁺ postsynaptique dépendant de l'activation de récepteurs NMDA (Wang & Stelzer, 1996 ; Lu et al., 2000). Les mêmes auteurs ont suggéré que la diminution d'efficacité des récepteurs GABA_A est provoquée par l'activation d'une phosphatase sensible à la concentration en ions Ca²⁺ : la calcineurine.

Il a également été observé que la libération de glutamate résultant de la stimulation répétitive à haute fréquence des collatérales de Schaeffer active des récepteurs glutamatergiques métabotropiques du groupe 1 des cellules pyramidales. L'activation de ces récepteurs provoque la synthèse par le neurone pyramidal d'endocannabinoïdes qui seraient capables de rétroagir au niveau des synapses GABAergiques avoisinantes entraînant une réduction persistante de libération de GABA au niveau de l'hippocampe (Chevalyere & Castillo, 2003). Le rôle des endocannabinoïdes a aussi été mis en évidence au niveau du cortex (Hill et al., 2007).

3. Induction différentielle de la LTP ou de la LTD au niveau des synapses inhibitrices

Comme pour les synapses excitatrices du néocortex, la synchronisation entre les PPSIs qui proviennent de l'activation de l'interneurone présynaptique et les PAs rétrogrades de la cellule pyramidale postsynaptique, peut induire soit le phénomène de LTP soit le phénomène de LTD selon la coïncidence de ces événements (Holmgren & Zilberter, 2001). La propagation des PAs rétrogrades au niveau de la cellule pyramidale provoque l'ouverture des canaux Ca²⁺ dépendants du potentiel à proximité des synapses inhibitrices. Il apparaît que cet influx de Ca²⁺ est prépondérant dans l'induction différentielle de la LTP ou de la LTD. Ainsi,

si le délai entre les PPSIs générés par l'activation de synapses inhibitrices et le début du train de PAs est inférieur à 300 ms, une LTD des PPSIs sera induite. Au contraire, si le délai entre les PPSIs et le début du train de PAs est supérieur à 400 ms, alors une LTP des synapses inhibitrices sera générée. Seuls, les trains de PAs rétrogrades sont incapables d'induire une LTP ou une LTD des synapses inhibitrices (Holmgren & Zilberter, 2001).

Des données contradictoires ont été obtenues pour des enregistrements effectués au niveau de neurones pyramidaux sur tranches d'hippocampe ; un délai de ± 20 ms entre les PAs rétrogrades et les PPSIs serait à l'origine d'une LTP alors que l'absence de synchronisation induirait une LTD (Woodin et al., 2003).

4. Importance fonctionnelle des synapses inhibitrices

Comme pour la plasticité des synapses excitatrices, les changements à long terme de l'efficacité des connexions synaptiques inhibitrices peuvent contribuer aux phénomènes de mémorisation (Bradler & Barrionuevo, 1989 ; Hollrigel et al., 1998 ; Paulsen & Moser, 1998 ; Steele & Maulk, 1999 ; Stelzer et al., 1994). Les connexions inhibitrices sont aussi à l'origine de nombreuses autres fonctions essentielles.

a) Les connexions inhibitrices et le modelage des réponses neuronales

Au cours de la formation des circuits neuronaux, l'activité corticale dépend de l'efficacité des connexions entre les neurones qui composent le cortex. L'organisation et l'efficacité des connexions synaptiques sont définies tout au long du développement, mais des expériences de privation sensorielle, par suture d'un œil, ont montré que la maturation de l'efficacité des connexions des neurones du cortex visuel est réalisée au cours d'une brève période postnatale appelée période critique (Gordon et al., 1997 ; Berardi et al., 2003 ; Hensch, 2004, 2005 ; Jiang et al., 2005). Au cours de cette période, l'efficacité des connexions neuronales excitatrices est particulièrement sensible à l'intensité des signaux reçus. C'est d'ailleurs pourquoi la plupart des études sur les phénomènes de plasticité synaptique sont réalisées à ce stade.

Les mécanismes qui contraignent les changements d'efficacité de la transmission synaptique au cours de cette période sont mal connus (Berardi et al., 2003 ; Hensch, 2004). Néanmoins, pour toutes les espèces étudiées, les études histologiques (Blue & Parnavelas, 1983 ; Gao et

al., 2000 ; Guo et al., 1997 ; Micheva & Beaulieu, 1997 ; Mower & Guo, 2001 ; Murphy et al., 2005) et physiologiques (Luhmann & Prince, 1991 ; Benevento et al., 1992 ; Thomson et al., 1996 ; Angulo et al., 1999a ; Angulo et al., 1999b) montrent que dans le néocortex la maturation des synapses inhibitrices se produit après la maturation des synapses excitatrices. Par conséquent, il existe une période au cours de laquelle l'efficacité des connexions excitatrices peut être « modelée » sans être contrôlée par les connexions inhibitrices qui sont à ce stade, immatures (Kirkwood & Bear, 1995 ; Huang et al., 1999). Il semble donc que la maturation plus tardive des connexions synaptiques des circuits inhibiteurs GABAergiques permette de définir la fenêtre temporelle qui correspond à la période critique (Kirkwood & Bear, 1995 ; Miles et al., 1996 ; Freund & Gulyas, 1997 ; Hensch et al., 1998 ; Huang et al., 1999 ; Larkum et al., 1999 ; Zilberter, 2000 ; Jiang et al., 2005).

b) La synchronisation de l'activité des réseaux neuronaux par les interneurons

Tout au long de la vie postnatale, les circuits neuronaux inhibiteurs sont importants pour la synchronisation de l'activité corticale (Gupta et al., 2000 ; Tamas et al., 2000 ; Freund, 2003).

i) *Importance de la synchronisation de l'activité*

Le cerveau est organisé en aires cérébrales dans lesquelles des réseaux de neurones sont formés et organisés afin de coder une information sensorielle spécifique (Schillen & König, 1994 ; Sakurai, 1996). En réponse à un stimulus visuel, différents signaux sont générés au niveau de différentes aires cérébrales. Ces signaux sont ensuite réassociés afin d'émettre une réponse cognitive adaptée. Se pose alors la question de savoir comment des signaux de différentes aires corticales provenant d'un même stimulus sensoriel sont ensuite réassociés spécifiquement ?

La synchronisation de l'activité des réseaux neuronaux permet de répondre à cette question. En effet, il a été observé que les signaux générés au niveau de différentes aires cérébrales sont émis à une même fréquence qui permettra leur réassociation ultérieure (König et al., 1996).

La synchronisation des activités neuronales peut être décrite par des fluctuations rythmiques du potentiel de membrane des neurones sur une large échelle de fréquences (Gray & Singer, 1989 ; Eeckman & Freeman, 1990 ; Steriade et al., 1991a ; Steriade et al., 1991b ; Buzsaki et al., 1992 ; Murthy & Fetz, 1992 ; Siapas & Wilson, 1998 ; Zhang et al., 1998b ; Bragin et al.,

1999). Dans le cortex cérébral, les rythmes les plus fréquents sont des oscillations de fréquences theta (4-12 Hz) et gamma (30-80 Hz) qui représentent des profils de décharges synchrones pouvant être exprimés par des neurones pyramidaux (Steriade et al., 1978 ; Chrobak & Buzsaki, 1994 ; Bragin et al., 1995 ; Wespatat et al., 2004).

Le rôle des oscillations gamma a été particulièrement étudié, notamment dans le néocortex *in vivo* (Eckhorn et al., 1988 ; Bressler et al., 1993), où il a été observé que ce type d'oscillation est dominant lorsque le cerveau est dans un état activé (pendant l'éveil ou pendant la phase de sommeil paradoxal (Steriade et al., 1993 ; Steriade & Amzica, 1996 ; Steriade et al., 1996)). La synchronisation de l'activité neuronale à cette fréquence est aussi supposée essentielle à l'association d'images sensorielles spécifiques avec une perception cohérente (Eckhorn et al., 1988 ; Gray & Singer, 1989 ; Singer, 1993 ; Engel & Singer, 2001 ; Ward, 2003). Par exemple, l'intégration corticale de différents aspects (comme la texture, la forme et l'orientation) d'une expérience visuelle est réalisée dans des régions spécifiques et les signaux qui en résulte présentent le même rythme d'activité gamma qui permettrait leur réassociation en une réponse globale (Maunsell & Newsome, 1987 ; DeYoe & Van Essen, 1988).

Les oscillations gamma sont également supposées jouer un rôle important dans l'induction de la plasticité synaptique en permettant la synchronisation entre les événements pré- et postsynaptiques (Paulsen & Sejnowski, 2000 ; Buzsaki & Draguhn, 2004). Les rythmes gamma sont aussi importants pour les processus de mémorisation à court et long terme (Wespatat et al., 2004). Il a été rapporté que des signaux émis à des fréquences inférieures à 15 Hz semblent impliqués dans la consolidation de la mémoire (Crochet et al., 2005), alors que des signaux à haute fréquences peuvent engendrer un déséquilibre de la balance Excitation/Inhibition conduisant à des manifestations de types épileptique (Fritschy & Brünig, 2003). Il a été également associé, par mesure magnéto-encéphalographique, une rupture de rythme gamma avec l'expression de pathologies neurodégénératives dans lesquelles les processus de mémorisation sont détériorés, comme la maladie d'Alzheimer (Ribary et al., 1991).

ii) Le contrôle inhibiteur de la synchronisation de l'activité

La synchronisation de l'activité serait principalement due aux interneurones inhibiteurs (Buzsaki et al., 1992 ; Bragin et al., 1995 ; Cobb et al., 1995 ; Ylinen et al., 1995 ; McBain et Fisahn 2001 ; Jedlicka & Backus, 2006). Il a été montré que des afférences inhibitrices ciblant

le segment initial de l'axone de neurones pyramidaux sont capables de modifier la fréquence d'émission des trains de potentiels d'action de ce neurone (Zhu et al., 2004).

De façon basique, deux mécanismes synaptiques de synchronisation de l'activité des réseaux sont possibles : la synchronisation par des synapses chimiques et/ou la synchronisation par des synapses électriques. En tenant compte des deux types de cellules qui composent les circuits neuronaux (les neurones excitateurs et les interneurons inhibiteurs), trois types de synchronisation par les synapses chimiques peuvent exister : l'excitation récurrente entre les cellules excitatrices, l'inhibition réciproque entre les interneurons et les boucles rétrogrades entre des sous-populations de neurones excitateurs et inhibiteurs. Toutefois, les études « computationnelles » et expérimentales ont montré que la synchronisation rythmique de l'activité dans les réseaux corticaux dépend principalement de l'inhibition synaptique et/ou des boucles rétrogrades entre excitation et inhibition (Wang & Rinzl, 1993 ; Whittington et al., 1995 ; Wang & Buzsaki, 1996 ; Fisahn et al., 1998 ; Fischer & Dürr, 2003). Des données expérimentales indiquent que les PPSIs sont capables de limiter tant dans l'espace que dans le temps la génération de potentiels d'action pour l'ensemble d'une population de neurones pyramidaux interconnectés (Fisahn et al., 1998). Les synapses électriques entre interneurons (*via* des jonctions communicantes) permettent de synchroniser l'activité de populations d'interneurons (Hestrin & Galarreta, 2005) et de promouvoir de manière plus générale la synchronisation des activités oscillatoires des réseaux neuronaux (Bennett & Zukin, 2004 ; Kopell & Ermentrout, 2004).

c) Les synapses GABAergiques et l'épileptogénèse

La plasticité nécessaire au développement et à la fonction du système nerveux central peut potentiellement être à la base de phénomènes épileptiques (Kullmann et al., 2000). La dépression à long terme des synapses GABAergiques peut contribuer au moins en partie à la génération d'une forme d'activité épileptique (Miles & Wong, 1987 ; Stelzer et al., 1987).

De manière plus générale, au niveau du SNC, une dérégulation du système inhibiteur GABAergique peut engendrer des manifestations de types épileptiques. Des attaques cérébrales prolongées peuvent être à l'origine d'une dérégulation de l'inhibition qui engendre une hyperexcitabilité neuronale (Sloviter, 1987; Bekenstein & Lothman, 1993). A l'inverse, il a aussi été observé qu'une sur-régulation de l'inhibition peut produire des modèles d'épilepsie chronique (Jefferys & Traub, 1998).

C) La plasticité homéostatique

La recherche sur les mécanismes d'apprentissage et de mémorisation s'est concentrée sur les changements d'efficacité de synapses individuelles : la plasticité Hebbienne. Les études récentes s'intéressent maintenant à la régulation d'efficacité de l'ensemble des synapses d'un neurone et conduisent à définir une nouvelle forme de plasticité synaptique appelée plasticité homéostatique.

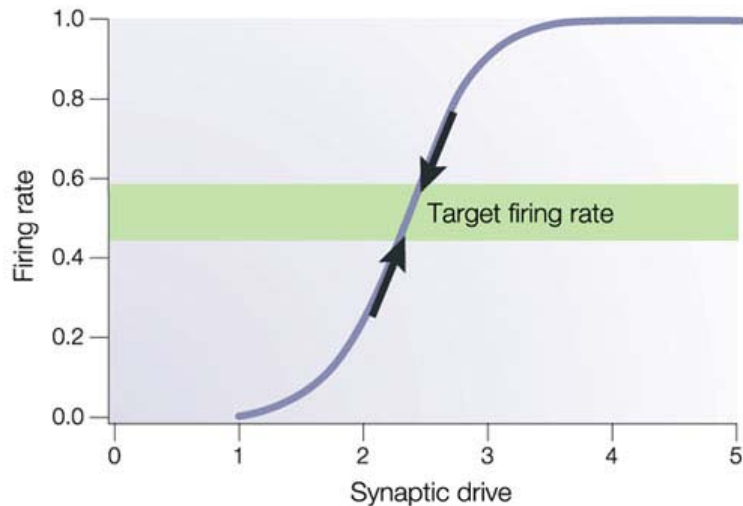
1. Définition

Au niveau central, l'homéostasie est l'idée par laquelle le cerveau conserve un niveau d'activité moyen (Turrigiano & Nelson, 2004). Plusieurs critères doivent être remplis pour parler de contrôle homéostatique d'un système :

- Un système homéostatique possède un domaine d'activité fonctionnel qui définit précisément le niveau de sa réponse. Ce domaine d'activité est centré autour d'un niveau d'activité contrôle (ou « set point ») (figure 24a).
- Tous les systèmes homéostatiques possèdent des détecteurs qui décèlent toute perturbation de l'activité normale. Ces détecteurs reportent la différence entre le niveau contrôle et le niveau actuel du système afin de générer un signal d'erreur en cas de différence trop importante (figure 24b).
- Un système homéostatique possède des mécanismes régulateurs (mécanismes de rétrocontrôle) qui permettent de « corriger » l'erreur de manière précise (figure 24b).

Au niveau du système nerveux central, la plasticité homéostatique consiste à réguler l'efficacité globale de la transmission de toutes les synapses sur un neurone afin de maintenir son niveau d'excitabilité dans une gamme fonctionnelle (Davis & Goodman, 1998 ; Turrigiano & Nelson, 2000 ; Marder & Prinz, 2002 ; Burrone & Murthy, 2003 ; Turrigiano & Nelson, 2004). Lorsque l'activité d'une ou de plusieurs synapses d'un neurone est modifiée de façon trop importante, le neurone est capable d'activer des mécanismes compensateurs afin de contrebalancer ces changements. Cette régulation résulte de changements d'efficacité des connexions synaptiques excitatrices ou inhibitrices qui compensent les changements préalables (Burrone & Murthy, 2003 ; Turrigiano & Nelson, 2004 ; Davis, 2006).

(a)



Nature Reviews | Neuroscience

(b)

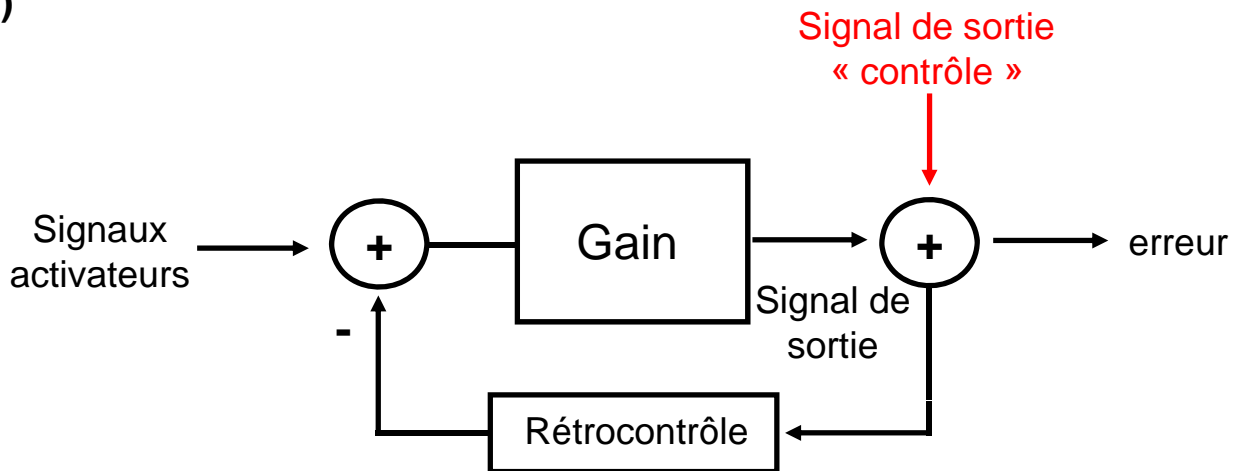


Figure 24. Contrôle homéostatique.

(a) Schéma représentant la relation entre la force des entrées synaptiques globale d'un neurone (synaptic drive) et la fréquence de décharge (firing rate) de sa réponse. En vert est représenté le domaine fonctionnel. Les flèches représentent les mécanismes homéostatiques qui permettent de maintenir la réponse dans le domaine fonctionnel suite à une augmentation ou une diminution trop importante de la force des entrées synaptiques globale.

D'après Turrigiano et Nelson 2004, *Nature Reviews Neuroscience*.

(b) Schéma représentant le processus homéostatique. Des signaux activateurs entraînent un signal de sortie hors norme comparé au signal « contrôle », ce qui entraîne l'activation de mécanismes de rétrocontrôle activateur.

Schéma modifié d'après Davis 2006, *Annual Review of Neuroscience*.

La plasticité homéostatique apparaît par conséquent comme un processus adaptatif chargé de contraindre la plasticité neuronale pour normaliser le niveau d'excitabilité d'un neurone (Davis & Goodman, 1998 ; Turrigiano et al., 1998 ; Turrigiano & Nelson, 2000 ; Davis & Bezprozvanny, 2001 ; Marder & Prinz, 2002 ; Burrone & Murthy, 2003). Elle a aussi été décrite sous le terme de « synaptic scaling » ou rééchelonnement synaptique (Turrigiano et al., 1998).

2. Mise en évidence de la plasticité homéostatique

La plasticité homéostatique n'a été que récemment décrite à partir de données provenant de la jonction neuromusculaire (Davis & Goodman 1998a, 1998b) et de réseaux de neurones centraux en culture (Rao & Craig, 1997, Lissin et al., 1998 ; O'Brien et al., 1998 ; Turrigiano et al., 1998 ; Watt et al., 2000 ; Leslie et al., 2001).

Les connexions entre les neurones excitateurs et inhibiteurs sont mises en place au cours du développement pour définir la balance Excitation/Inhibition de ces neurones. La force des afférences excitatrices et inhibitrices est ensuite affinée au cours du développement plus tardif selon la fréquence des signaux perçus (dans le cas du cortex visuel de l'intensité des stimuli visuels) (Katz & Shatz, 1996 ; Desai et al., 1999 ; Sanes & Lichtman, 1999). Des expériences de privation sensorielle, par suture d'un œil, montrent en effet que la baisse d'acuité visuelle qui en résulte provoque de profondes modifications de l'organisation et de l'efficacité des circuits neuronaux excitateurs et inhibiteurs du cortex visuel (Hubel & Wiesel, 1970 ; Daw et al., 1992 ; Fox, 1992 ; Desai et al., 1999, 2002 ; Maffei et al., 2006).

a) Mise en évidence au niveau de synapses excitatrices

Plusieurs groupes travaillant sur des cultures de neurones glutamatergiques du néocortex (O'Brien et al., 1998 ; Turrigiano et al., 1998 ; Leslie et al., 2001), de l'hippocampe (Rao & Craig, 1997 ; Lissin et al., 1998) ou de la moelle épinière (O'Brien et al., 1998), ont mis en évidence des mécanismes de régulation homéostatique du niveau d'excitation d'un neurone suite à la réduction ou au blocage de l'activité neuronale à l'aide de tétrodotoxine (TTX, bloqueur des canaux sodiques dépendants du potentiel) ou de CNQX (bloqueur des récepteurs glutamatergiques excitateurs de type AMPA). Après 24 à 48 heures de traitement, une augmentation de l'amplitude des CPSEs enregistrés dans des neurones pyramidaux a lieu (figure 25) (Rutherford et al., 1998 ; Turrigiano et al., 1998 ; Watt et al., 2000). Une

augmentation d'amplitude des CPSEs des neurones pyramidaux a également été observée sur des tranches de cortex visuel d'animaux ayant été privés de stimuli sensoriels (par privation de lumière ou suture des yeux) (Desai et al., 2002).

Ces expériences mettent en évidence un phénomène compensateur qui est dû au niveau postsynaptique à une augmentation du nombre de récepteurs glutamatergiques (figure 25) (Turrigiano et al., 1998 ; Wierenga et al., 2005).

Inversement, une augmentation d'activité des neurones en culture peut être réalisée en bloquant les synapses inhibitrices à l'aide d'antagonistes spécifiques des récepteurs inhibiteurs GABA_A (bicuculline, gabazine (GBZ)) ou en dépolarisant les neurones par augmentation de la concentration en ions K⁺ dans le milieu extracellulaire (Moulder et al., 2006). Dans ces conditions, il a été observé sur des cultures de neurones pyramidaux du cortex ou d'hippocampe, une diminution compensatrice de l'amplitude des CPSEs 24 à 48 heures après le blocage de la transmission GABAergique (figure 25) (Lissin et al., 1998 ; Turrigiano et al., 1998). La diminution d'amplitude des courants excitateurs enregistrés au niveau des neurones pyramidaux est associée à une diminution de la taille du pool de vésicules sécrétrices et à une diminution de la quantité de neurotransmetteur libéré (Murthy et al., 2001 ; Atwood & Karunanithi, 2002 ; Burrone et al., 2002 ; Moulder et al., 2004).

b) Mise en évidence au niveau de synapses inhibitrices

La plupart des études ont été réalisées sur des tranches de cortex visuel dont l'activité a été diminué pharmacologiquement (TTX) ou par privation sensorielle (Morales et al., 2002 ; Gianfranceschi et al., 2003 ; Chattopadhyaya et al., 2004 ; Maffei et al., 2004). Une diminution de l'amplitude des CPSIs a été observée. La réduction des courants inhibiteurs est associée à des changements du nombre de récepteurs GABA_A au niveau postsynaptique (Kilman et al., 2002 ; Turrigiano & Nelson, 2004 ; Davis, 2006), et à des changements d'expression du transporteur du GABA au niveau présynaptique, conduisant à une diminution de l'efficacité des synapses inhibitrices (De Gois et al., 2005 ; Erickson et al., 2006). Inversement, le blocage pharmacologique de l'inhibition entraîne une augmentation compensatrice du taux de GABA afin de réguler l'activité (Erickson et al., 2006).

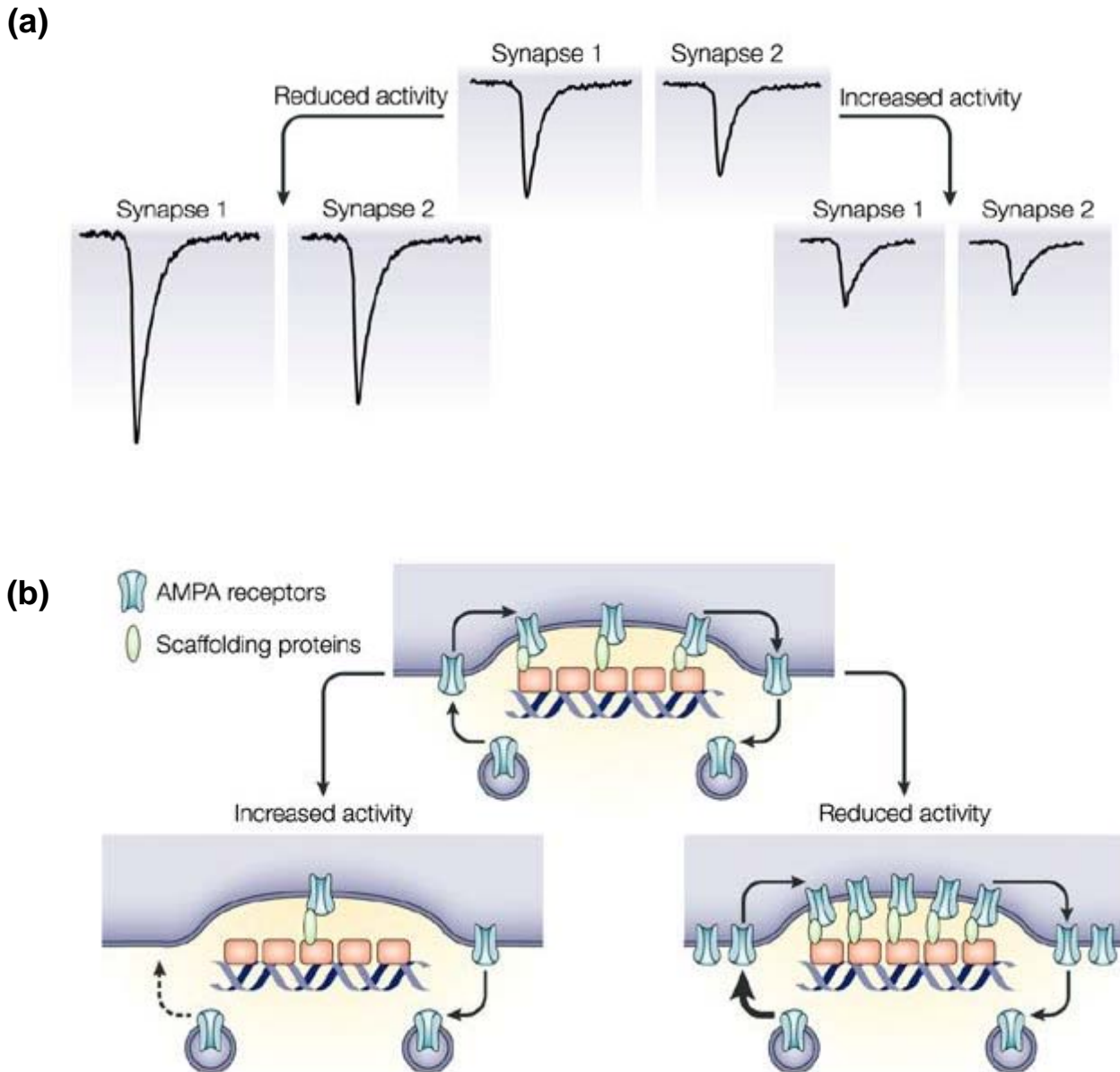


Figure 25. Régulation homéostatique de la transmission synaptique excitatrice des neurones pyramidaux corticaux.

- a) L'augmentation d'activité induite par une réduction de l'inhibition diminue après 24h l'amplitude des CPSEs postsynaptiques. L'amplitude des CPSEs est au contraire augmentée suite à une réduction d'activité par induite par un blocage partiel de l'excitation.
- b) Selon que l'activité est augmentée ou diminuée, le nombre des récepteurs AMPA postsynaptiques est alors diminué ou augmenté pour compenser ces modifications.

D'après Turrigiano et Nelson 2004, *Nature Reviews Neuroscience*.

c) Mise en évidence au niveau d'un réseau neuronal

La suppression de l'activité d'un neurone dans un réseau a été réalisée (Burrone et al., 2002) sur des cultures de neurones hippocampaux par surexpression d'un canal potassique rectifiant entrant (Kir). Au cours de ces expériences, un neurone en culture est transfecté avec une construction génique codant pour la protéine Kir2.1 couplée avec la GFP (green fluorescent protein) afin de localiser le neurone transfecté. Après 24 heures, la surexpression de Kir2.1 entraîne une hyperpolarisation du neurone. Le niveau d'activité de ce neurone est par conséquent réduit. La transfection du neurone a été réalisée, soit après 2 jours de culture (avant l'établissement des connexions neuronales) soit après 11 jours de culture (après l'établissement de ces connexions neuronales). Les auteurs ont également quantifié le nombre de synapses activées en utilisant un marqueur fluorescent des vésicules synaptiques de recapture. Ce marqueur ne pénètre qu'au niveau d'éléments présynaptiques dont le système de recapture a été activé suite à la libération de neurotransmetteurs.

- Après réduction de l'activité d'un neurone avant la formation des synapses, une diminution du nombre de synapses actives sur ce neurone a été observée par rapport à des neurones non transfectés.

- Après réduction de l'activité d'un neurone dont les connexions synaptiques étaient déjà établies avec les autres neurones, les auteurs ont observé une augmentation des CPSEs enregistrés sur ce neurone et une augmentation du nombre de synapses actives. Ainsi, au niveau d'un réseau neuronal, si les connexions synaptiques s'établissent préférentiellement entre des neurones dont l'activité est « normale », un neurone pré-existant dont l'activité est perturbée (comme par exemple lors de la surexpression de la protéine Kir) verra l'efficacité des connexions qu'il reçoit changer afin de compenser cette perturbation (Burrone et al., 2002).

La régulation homéostatique de l'activité des réseaux neuronaux a aussi été mise en évidence au cours du processus de neurogénèse chez l'adulte.

La neurogénèse est bénéfique au système nerveux central, dans le sens où l'intégration de nouveaux neurones dans les réseaux neuronaux au niveau de l'hippocampe permet de renforcer certaines synapses et peut engendrer moins de perte d'efficacité de la transmission synaptique comparée à des systèmes sans renouvellement (Meir & Domany, 1987 ; Becker, 2005 ; Doetsch & Hen, 2005), ce qui favorise ainsi le stockage de l'information.

La neurogénèse peut aussi avoir des effets néfastes lorsque l'intégration de neurones entraîne des dérèglements de l'activité des réseaux aboutissant à des manifestations de type épileptique (Nadler, 2003 ; Scharfman et al., 2003).

L'insertion de nouveaux neurones peut entraîner des changements dans la structure du réseau afin de garder un niveau d'activité fonctionnel. Ainsi, les changements d'activité induits par l'insertion d'un nouveau neurone excitateur peuvent être compensés par une augmentation de l'efficacité de connexions inhibitrices ou par une diminution d'efficacité de connexions excitatrices pré-existantes (Lissin et al., 1998 ; Turrigiano et al., 1998 ; Desai et al., 1999 ; Golowasch et al., 1999 ; Brickley et al., 2001 ; Turrigiano & Nelson, 2004 ; Wierenga et al., 2005). Cette compensation peut aussi s'effectuer par l'insertion de nouveaux interneurons inhibiteurs (Liu et al., 2003), par un changement de phénotype de certains neurones : par exemple des cellules granulaires excitatrices de l'hippocampe sont capables de changer de phénotype pour devenir des cellules inhibitrices GABAergiques (Gomez-Lira et al., 2005), voire même par la mort de certains neurones (Meltzer et al., 2005).

Ces expériences montrent que la régulation de l'activité est bidirectionnelle, des mécanismes compensateurs sont activés aux niveaux des synapses excitatrices ou inhibitrices afin de normaliser l'activité du neurone considéré (figure 26). Concrètement, la plasticité homéostatique est capable de diminuer l'activité des neurones quand leur niveau d'excitabilité devient trop important et au contraire, de l'augmenter quand leur niveau d'excitabilité est trop faible.

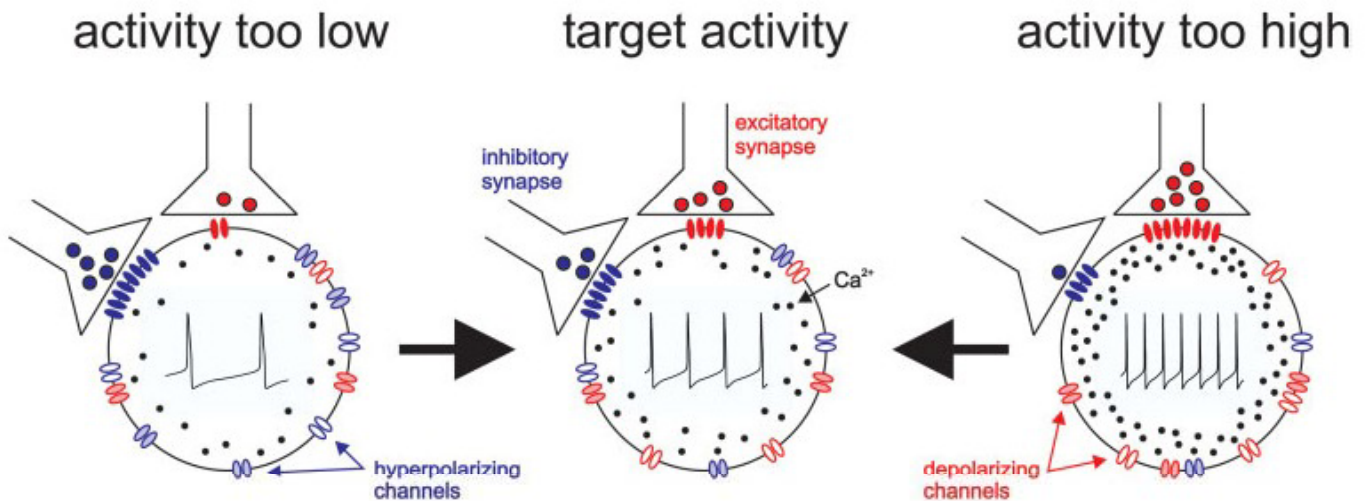


Figure 26. Régulation homéostatique de l'activité des synapses excitatrices et inhibitrices d'un neurone pyramidal cortical.

En cas de diminution de l'activité, on observe une augmentation de l'efficacité de la transmission des synapses excitatrices (augmentation du nombre de récepteurs, de la quantité de neurotransmetteur libérée...) et une diminution de l'efficacité de la transmission des synapses inhibitrices (diminution du nombre de récepteurs, de la quantité de neurotransmetteur libérée...).

En cas d'augmentation de l'activité, on observe au contraire une diminution de l'efficacité de la transmission des synapses excitatrices (diminution du nombre de récepteurs, de la quantité de neurotransmetteur libérée...) et une augmentation de l'efficacité de la transmission des synapses inhibitrices (augmentation du nombre de récepteurs, de la quantité de neurotransmetteur libérée...).

D'après Marder et Prinz 2002, *Bioessays*.

Objectifs du travail

Il apparaît que le niveau d'excitabilité des neurones corticaux dépend d'une régulation réciproque de l'efficacité des entrées excitatrices et inhibitrices reçues, processus décrit sous le terme de plasticité homéostatique. Cependant, aucune évidence directe de la régulation en parallèle des entrées excitatrices et inhibitrices n'a encore été démontrée. Mon premier objectif consiste à mettre en évidence le contrôle homéostatique de l'excitabilité des neurones pyramidaux du cortex par détermination de leur balance Excitation/Inhibition. Des protocoles de stimulation à haute ou basse fréquence seront utilisés pour induire des phénomènes de potentiation ou de dépression homéostatique des afférences excitatrices et inhibitrices reçus par un neurone pyramidal et en déterminer les conséquences sur le contrôle de la balance E/I. J'étudierai également les mécanismes cellulaires à la base de la potentiation homéostatique en me concentrant sur l'implication des différents sous-types de récepteurs NMDA dont le rôle a été largement débattu dans l'induction des phénomènes de LTP ou de LTD des synapses excitatrices et inhibitrices.

D'autre part, le système inhibiteur apparaissant comme un facteur important de la régulation de l'activité des neurones corticaux, que ce soit par régulation de l'efficacité des connexions ou par contrôle de l'édition des signaux au niveau dendritique par l'inhibition shuntante, une étude sera menée sur le rôle de l'inhibition dans la régulation de la balance E/I.

L'ensemble de mon travail a pour but de mieux caractériser la régulation réciproque de l'efficacité des entrées excitatrices et inhibitrices sur le contrôle de l'activité d'un neurone pyramidal.

Matériels

et

Méthodes

Cette étude a été réalisée sur des tranches de cortex visuel de rats Wistars âgés de 18 à 25 ou de 28 à 32 jours selon le type d'expériences réalisées. Le rat a été choisi car c'est un modèle expérimental très documenté en particulier du point de vue anatomique, et qui permet d'accéder relativement facilement aux réseaux neuronaux. La tranche d'âge des animaux utilisés, permet de limiter les variations liées à la maturation tardive des synapses, correspond à une période où le cerveau est pauvre en tissu conjonctif ce qui facilite l'enregistrement des neurones par la technique du "patch-clamp" et correspond à la période critique au cours de laquelle la force des connexions synaptiques est définie par les informations reçues.

L'étude *in vitro* sur tranche permet de conserver intacte une grande partie des réseaux neuronaux tout en enregistrant spécifiquement un neurone. Elle permet aussi de réduire considérablement les fluctuations dues à l'activité spontanée par rapport au modèle *in vivo*.

I. Le patch des neurones sur tranche de cortex visuel

Le rat est décapité selon les règles d'éthique en vigueur. Aucun anesthésiant n'est utilisé pour ne pas créer d'éventuelles interactions avec certains récepteurs (Gage & Hamill, 1981). Après ouverture de la boîte crânienne, le cerveau est prélevé et placé immédiatement dans le milieu extracellulaire glacé et oxygéné avec un mélange gazeux 95 % O₂ et 5 % CO₂. Des tranches de 200 à 300 µm sont réalisées à l'aide d'un vibratome avant d'être incubées à 36°C dans le milieu extracellulaire oxygéné pendant au moins une heure avant le début des enregistrements (figure 27).

Le milieu extracellulaire est un milieu Ringer pour mammifère composé de 126 mM de NaCl, 26 mM de NaHCO₃, 10 mM de glucose, 2 mM de CaCl₂, 1,5 mM de KCl, 1,5 mM de MgSO₄ et de 1,25 mM de KH₂PO₄ et dont l'osmolarité est comprise entre 310 et 330 mOsm.

Les tranches de cortex sont ensuite placées dans une chambre à immersion à température ambiante (22-25°C). Elles sont maintenues en place par une grille de platine et sont constamment perfusées par le milieu extracellulaire oxygéné. Les tranches sont visualisées à l'aide d'un microscope droit à immersion (Axioscope, Zeiss) en utilisant des objectifs à immersion à eau. Le cortex visuel et les différentes couches corticales sont repérés à un grossissement de 200x, alors que le patch est réalisé au grossissement de 400x à l'aide d'une caméra CCD.

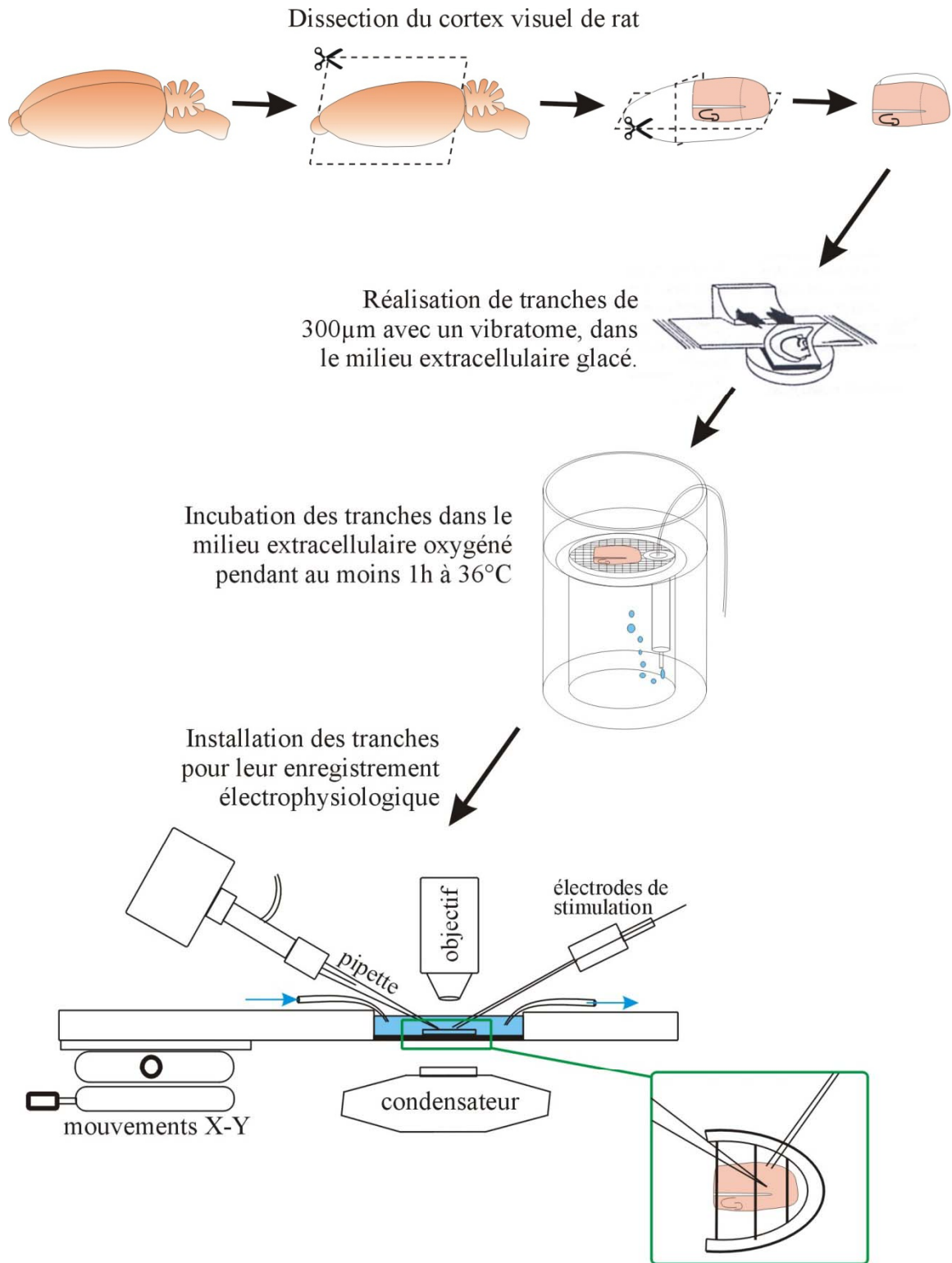


Figure 27. Schéma des différentes étapes pour la réalisation d'enregistrements *in vitro* sur tranches de cortex visuel de rat.

Les flèches bleues symbolisent la circulation continue du milieu extracellulaire dans le système de perfusion.

Les enregistrements sont réalisés par la technique de patch-clamp en cellule entière qui permet l'enregistrement des courants globaux résultant de l'activité de l'ensemble des canaux membranaires.

Les électrodes de patch sont obtenues par étirement de capillaires de verre borosilicaté sans filament de 1,7 mm de diamètre externe et de 1,5 mm de diamètre interne (Harvard Apparatus, UK) à l'aide d'une étireuse horizontale (Puller p-97, Sutter instrument) préalablement étalonnée. Ces électrodes possèdent des extrémités d'un diamètre de 1 à 2 μm afin de permettre l'établissement d'une jonction serrée avec la membrane neuronale. Les électrodes sont remplies du milieu intrapipette préalablement filtré et composé de 140 mM de K-gluconate, 10 mM d'Hepes, 4 mM d'ATP, 2 mM de MgCl_2 , 0,4 mM de GTP, 0,5 mM d'EGTA, dont le pH est ajusté à 7,3 et la pression osmotique est contrôlée entre 270 et 290 mOsm. Les électrodes de patch ont alors une résistance de 3 à 5 $\text{M}\Omega$ dans le milieu extracellulaire. La résistance est mesurée par application de sauts rectangulaires de potentiel de 20 mV et de 100 ms de durée à une fréquence de 50 Hz. Le créneau de courant observé sur oscilloscope permet de contrôler la variation de la résistance d'accès de l'électrode au cours du patch.

L'électrode de patch est approchée du neurone à l'aide d'un micromanipulateur piézoélectrique (Burleigh), une pression d'air positive est appliquée à l'intérieur de l'électrode de patch afin de dégager la surface du neurone cible. Après contact entre l'électrode de patch et la cellule cible, la pression positive est coupée ce qui provoque l'adhésion de la membrane sur l'électrode de verre entraînant une augmentation de la résistance d'accès de l'électrode (visualisée sur l'oscilloscope). Une pression négative légère est alors exercée afin d'obtenir une jonction serrée entre électrode et membrane neuronale, la résistance de l'électrode est alors maximale, de l'ordre de plusieurs $\text{G}\Omega$ (le créneau de courant sur l'oscilloscope est quasi nul). Une fois la jonction serrée établie, le passage en configuration cellule entière est réalisé par application d'une pression négative forte et brève (environ 1 bar pendant 1 s) pour rompre la portion de membrane située sous l'électrode (figure 28). Le passage en configuration cellule entière se traduit par l'apparition d'un courant capacitif (en réponse au créneau de potentiel imposé) qui traduit les phénomènes de charge et de décharge de la capacité membranaire.

Après quelques minutes, le neurone enregistré se trouve complètement dialysé par le milieu intrapipette.

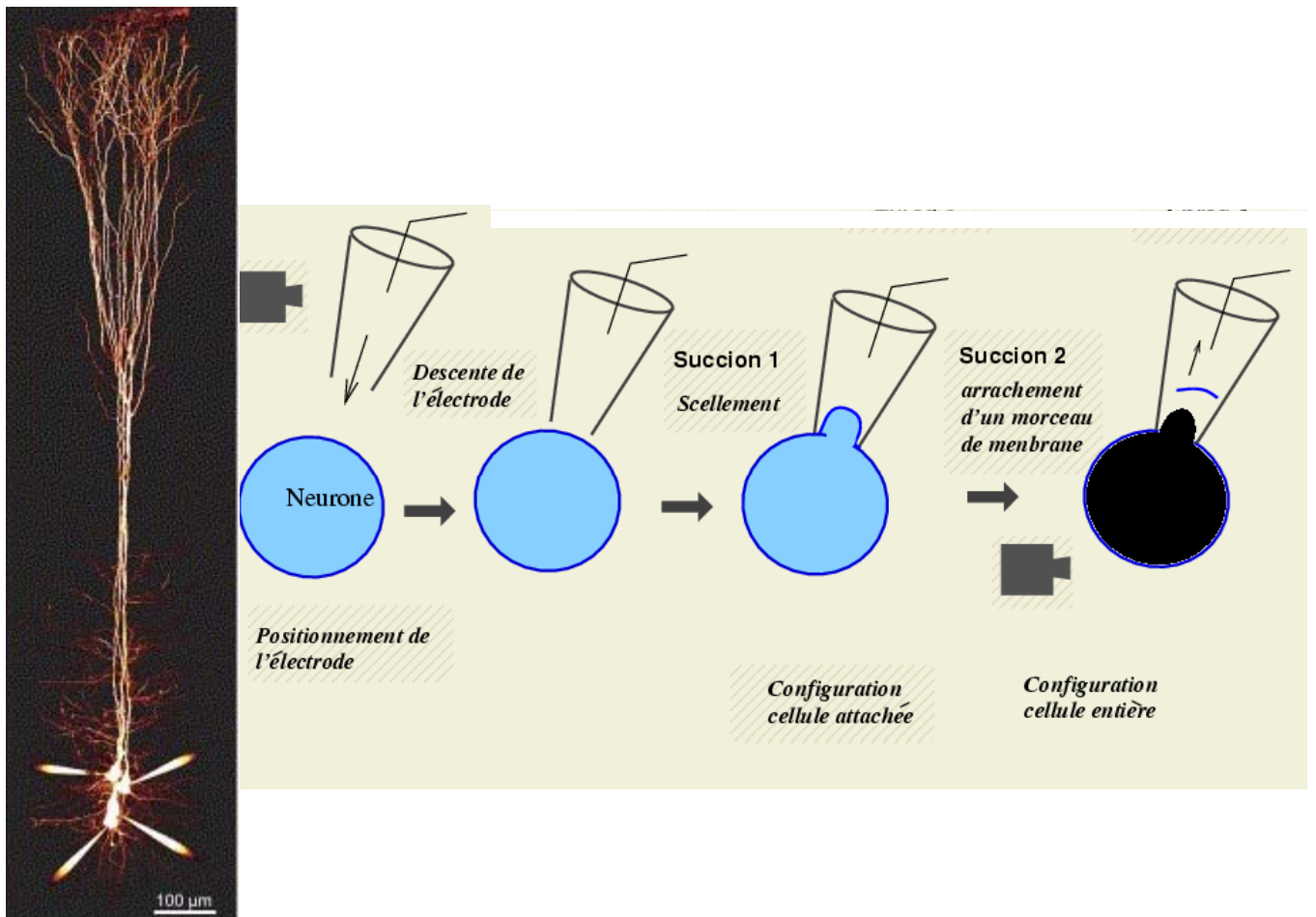


Figure 28. Enregistrement par la technique de patch-clamp en configuration cellule entière d'un neurone pyramidal.

Photo de neurones pyramidaux de couche 5 du cortex visuel de rat marqués à l'aide d'une sonde fluorescente présente dans le milieu intracellulaire.

D'après Sjostrom et al., 2006; *Neuropharmacology*

Schéma des différentes étapes aboutissant à la configuration cellule entière.

II. Enregistrements électrophysiologiques

Le patch est réalisé au niveau du soma d'un neurone pyramidal de couche 5 du cortex visuel. Cette technique de patch permet d'enregistrer les courants transmembranaires générés au niveau du soma et de la partie proximale des dendrites. Cependant, comme tous les enregistrements somatiques, nos enregistrements ne peuvent être des estimations rigoureuses des événements synaptiques ayant lieu au niveau distal des dendrites à cause du problème de « space-clamp ». Ce problème résulte essentiellement du fait que la cellule n'est pas électriquement compacte. Ainsi, la fuite ohmique liée à la résistance axiale des neurites produit un décalage relativement proportionnel à la distance synapse/soma, dans la mesure du potentiel d'inversion synaptique (Spruston et al., 1994). En nous plaçant en configuration cellule entière au niveau somatique, il n'est donc pas techniquement possible de connaître la valeur exacte du potentiel imposé au niveau de la partie distale des dendrites.

Toutefois, nos enregistrements rendent compte de l'intégration dendritique normale et représentent les variations relatives des changements de conductance au niveau somatique (Haider et al., 2006).

A) Acquisition

A l'intérieur de l'électrode d'enregistrement, le filament d'argent chloruré est relié à un changeur d'impédance. Le signal est ensuite amplifié à l'aide d'un amplificateur Axopatch 1D (Axon Instrument, USA). Les signaux électriques sont filtrés à 2 KHz et échantillonnés à 4 KHz. Pendant les expériences, les signaux sont observés sur oscilloscope et sur l'ordinateur et digitalisés par une carte d'acquisition DigiDATA 1200 (Axon Instrument, USA). Les protocoles de stimulation sont commandés par le logiciel Acquis 1 (Gérard Sadoc, Biologic, France) et l'analyse a été réalisée grâce au logiciel Elphy (Gérard Sadoc, Biologic, France).

B) Enregistrement en mode courant imposé

Afin de caractériser le neurone enregistré, une première étape consiste à déterminer le profil de décharge et la résistance membranaire du neurone (figure 29).

Pour ce faire, un protocole de stimulation en mode courant imposé est utilisé. Ce protocole consiste en deux phases distinctes :

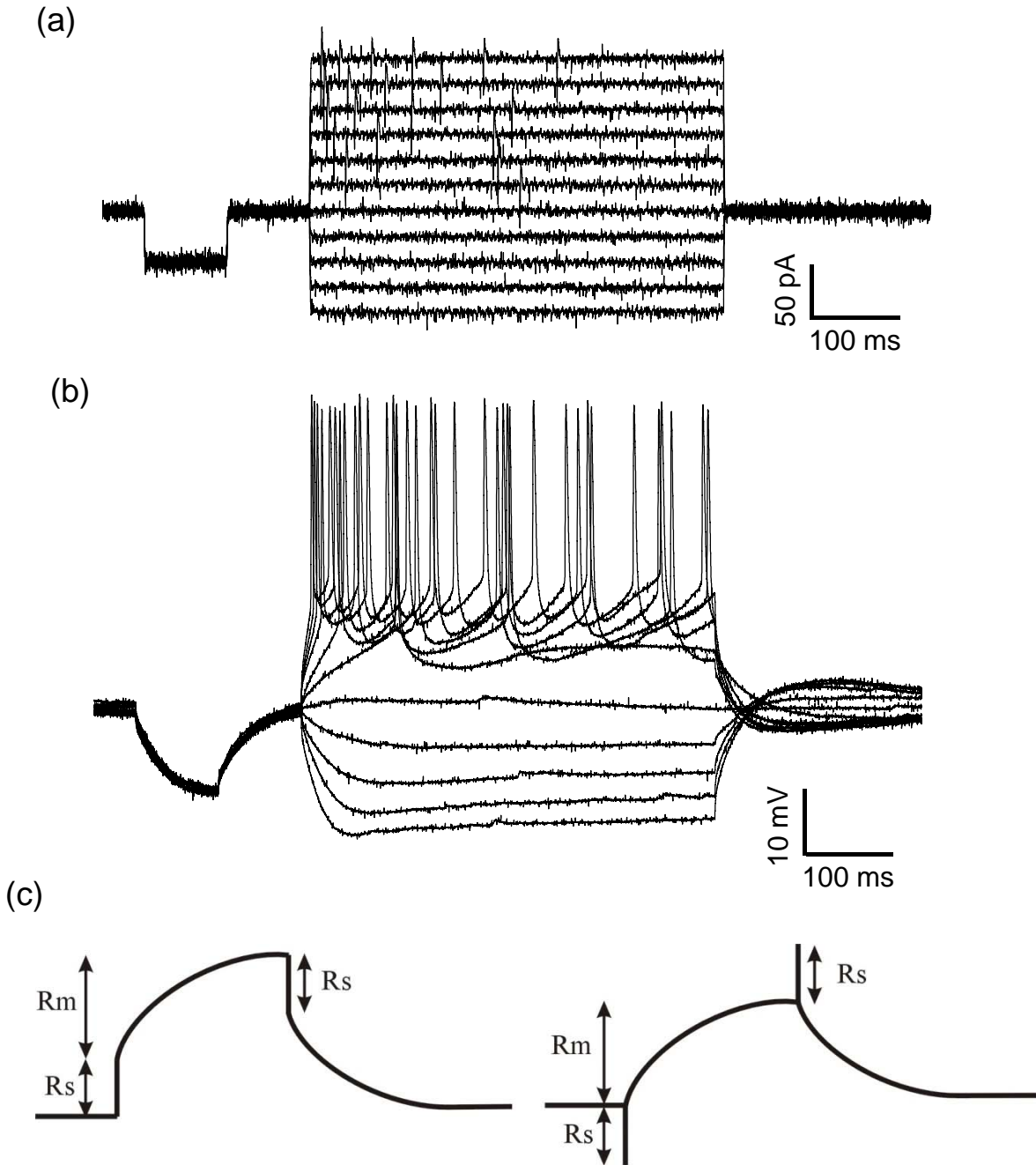


Figure 29. Protocole de stimulation en mode courant imposé et compensation de la résistance série.

- (a) Protocole réalisé en mode courant imposé par la pipette d'enregistrement.
- (b) Enregistrement d'un neurone pyramidal de couche 5 en réponse à l'application du protocole d'injection de courant.
- (c) Compensation de la résistance série (R_s) en mode courant imposé. La R_s est compensée visuellement par balancement du pont de Wheastone de l'amplificateur, jusqu'au point de rupture de pente qui sépare la R_s de la résistance membranaire R_m .

D'abord un premier créneau de courant imposé de -50 pA d'amplitude et de 100 ms de durée est appliqué par l'électrode de patch. Ce courant injecté charge la capacitance membranaire et permet de déterminer la résistance membranaire, la constante de temps de la charge de la membrane et la résistance série (figure 29).

Un second créneau de courant est injecté 100 ms après le premier. Ce créneau de courant à une durée de 500 ms et une amplitude initiale de -200 pA. Des cycles sont alors réalisés au cours desquels ce créneau de courant est incrémenté de $+25$ pA. Un cycle dure 1 s et est répété entre 15 et 20 fois ce qui permet de tester des créneaux de courant compris entre -200 pA et $+300$ pA. Ce protocole permet de déterminer le profil de décharge du neurone enregistré et ainsi de différencier les neurones pyramidaux au profil de décharge régulier des interneurons, au profil de décharge rapide (figure 30).

C) Enregistrement en mode voltage imposé

Le deuxième protocole utilisé au cours de nos expériences permet l'enregistrement en mode potentiel imposé des réponses en courant des neurones pyramidaux suite à la stimulation électrique d'une couche corticale (couche 2/3, 4 ou 6) afin de recruter différents circuits neuronaux excitateurs et inhibiteurs (figure 31). Les stimulations électriques sont réalisées à l'aide d'électrodes bipolaires en tungstène séparées de 100 μm (Phymep, France). La stimulation électrique est induite par le programme qui commande toutes les 15 s le déclenchement de la stimulation (0.05 Hz).

Au cours de nos expériences, l'intensité de la stimulation est réglée afin d'enregistrer une réponse infraliminaire, ne présentant pas de potentiel d'action.

Plusieurs niveaux de potentiel compris entre -90 et -40 mV (séparés de 5 mV) sont imposés. Pour chaque niveau de potentiel au moins quatre stimulations sont appliquées.

Un enregistrement contrôle est réalisé 15 min après équilibration du patch (dialyse du contenu intracellulaire par le milieu intrapipette) à 0.05 Hz puis des enregistrements dans les mêmes conditions et à cette même fréquence sont réalisés :

- Après 20 min de perfusion d'une substance pharmacologique.
- Après 15 , 30 , 45 et 60 min suite à l'application d'un protocole de stimulations à haute fréquence (HFS : « high frequency of stimulation »). Ce protocole est classiquement utilisé afin d'induire une potentiation à long terme de l'efficacité de la transmission synaptique (Abraham & Huggett, 1997). Il consiste en l'application de 3 trains de 13 bursts à une fréquence de 5 Hz, chaque train est constitué de 4 pulses à une fréquence 100 Hz.

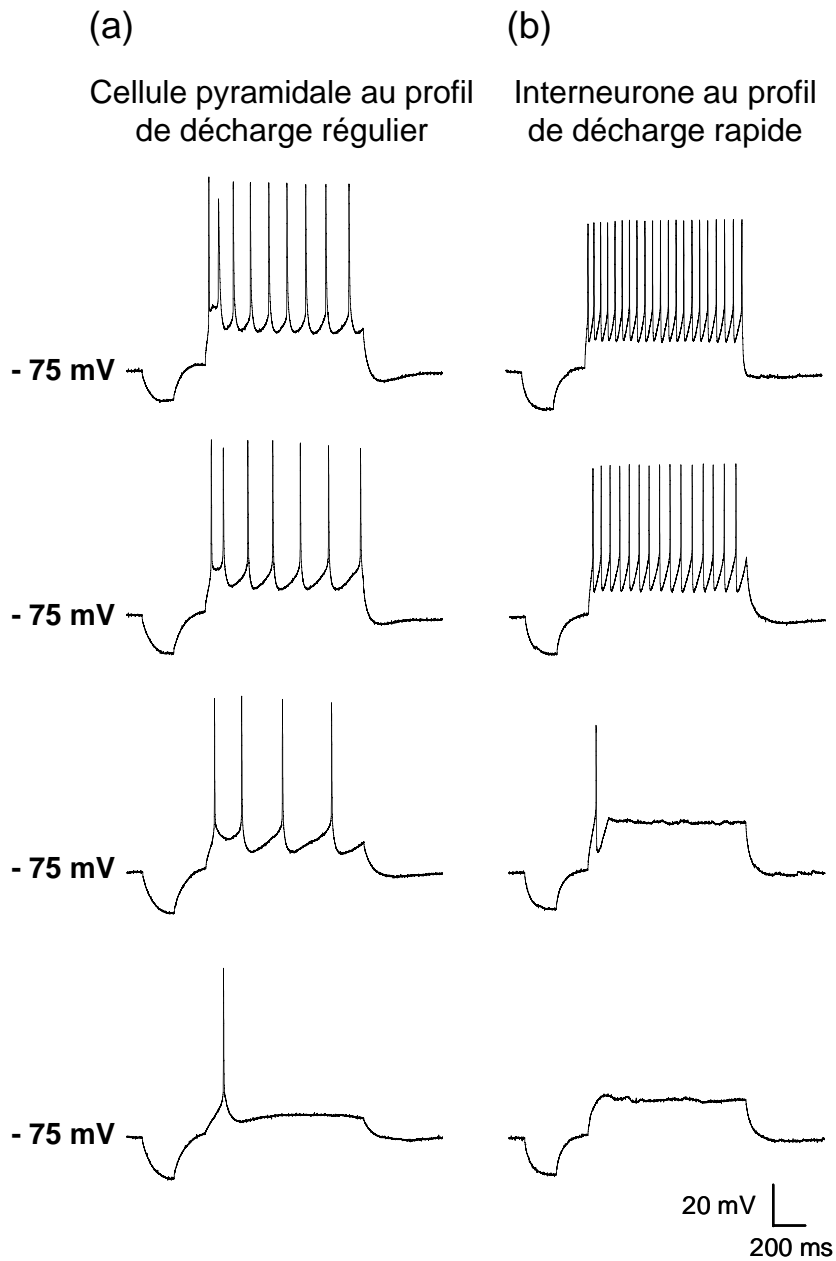


Figure 30. Les profils de décharges des neurones pyramidaux et des interneurones.

- (a) Les neurones pyramidaux de couche 5 présentent un profil de décharge régulier.
- (b) Les interneurones de couche 5 présentent un profil de décharge rapide.

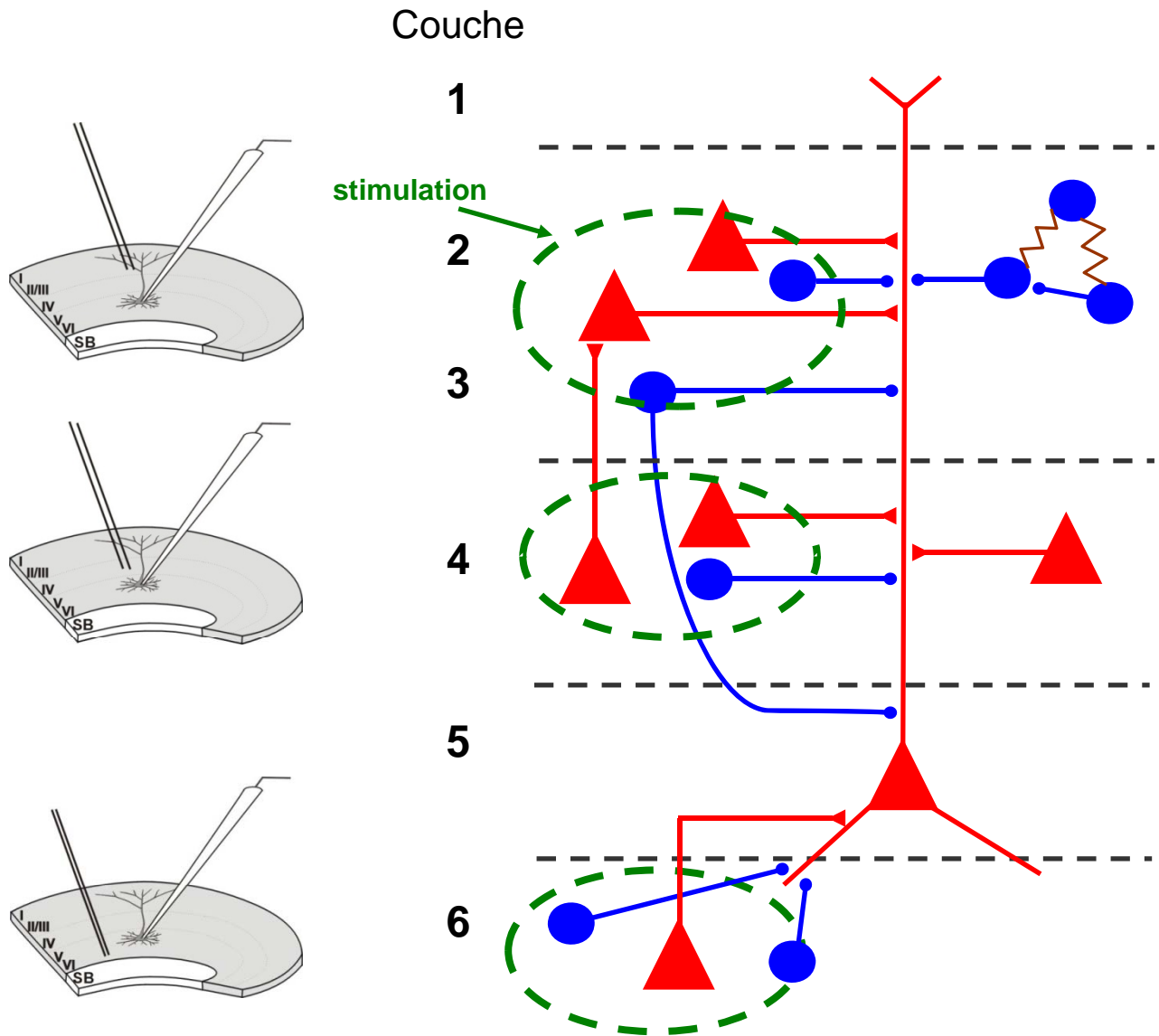


Figure 31. Représentation schématique des différents circuits excitateurs et inhibiteurs activés par les stimulations en couche 2/3, 4 ou 6.

- Après 15, 30, 45 et 60 min suite à l'application d'un protocole de stimulation à basse fréquence (LFS : « low frequency of stimulation »). Ce protocole est classiquement utilisé pour induire une dépression à long terme de l'efficacité de la transmission synaptique (Dudek & Bear, 1992). Il consiste en l'application de 100 pulses à une fréquence de 1 Hz.
- Des enregistrements suite à l'application d'un protocole de stimulation à haute fréquence (HFS) ont aussi été réalisés après perfusion d'une substance pharmacologique.

Enfin, des variations du courant membranaire à l'application d'une substance chimique dans la cuve ont aussi été enregistrées en mode potentiel imposé sans stimulation électrique.

III. Analyse de la réponse

A) Paramètres liés à la technique d'enregistrement.

L'analyse des réponses enregistrées tient compte de différents paramètres liés à la technique de patch-clamp en configuration cellule entière.

1. Le potentiel de jonction de liquide

Le potentiel de jonction décrit par Neher (1992) résulte de la différence de mobilité des ions à l'interface entre deux solutions différentes.

Dans nos conditions, le milieu intrapipette est riche en ions K^+ -gluconate qui se retrouve au niveau de la pointe de la pipette en contact avec la solution saline physiologique du bain, ce qui induit une différence de potentiel de 10 mV entre les deux solutions. Avant la formation de la jonction serrée entre la pipette et la membrane du neurone, le potentiel est ajusté à zéro par l'expérimentateur ce qui annule le potentiel de jonction. Après le passage en configuration cellule entière, le milieu intracellulaire est rapidement dialysé par le milieu intrapipette, il n'y a donc plus de potentiel de jonction. Le potentiel lu sur l'amplificateur se trouve donc affecté d'une erreur de - 10 mV. Lors de l'analyse, tous nos résultats sont corrigés par la valeur du potentiel de jonction qui a été vérifiée expérimentalement.

2. La dérive du potentiel de l'électrode

Avant la formation de la jonction serrée entre la pipette et la membrane du neurone, la différence de potentiel est ajustée à zéro par l'expérimentateur. Cette différence de potentiel

entre l'électrode et la masse est à nouveau mesurée en fin d'expérience, après la rupture de la jonction serrée. Si elle est différente de zéro, la différence provient d'une dérive de l'électrode qui survient le plus souvent au moment du passage en configuration cellule entière. Par la suite, tous les potentiels enregistrés sont corrigés de cette valeur lors de l'analyse.

Lorsqu'un changement de potentiel de repos a été observé au cours des expériences, le protocole d'enregistrement en courant imposé a été appliqué à la cellule afin de s'assurer que le seuil de décharge du neurone était constant et que ce changement de potentiel n'était pas dû à la dérive de l'électrode.

3. La résistance série

La résistance d'accès (R_a) est la résistance à l'écoulement du courant entre la pipette et le cytoplasme (elle est en partie liée à la forme de la pointe de la pipette). La résistance externe (R_{ex}) est liée à la masse et il faut en tenir compte dans certaines configurations d'enregistrement. La somme de la résistance d'accès et de la résistance externe est appelée résistance série (R_s). En configuration cellule entière, la résistance externe est négligeable, la résistance série est donc égale à la résistance d'accès.

Globalement plus l'excision de la membrane par l'électrode d'enregistrement est importante, plus cette résistance série est faible. Les électrodes utilisées ont une résistance série d'environ 3-5 M Ω mesurée dans le milieu extracellulaire, après le passage en configuration « cellule entière » dans des conditions optimales il est admis que la résistance série est multipliée par un facteur 2 environ. Lorsque cette résistance était trop grande, il a été parfois possible de la diminuer en appliquant une légère pression négative intrapipette. Tous les neurones retenus dans cette étude ont été enregistrés avec une résistance série inférieure à 25M Ω .

Mesure de la résistance série

En mode courant imposé, un créneau de courant est appliqué à la membrane du neurone afin de compenser la résistance série à l'aide du pont de Wheastone (« bridge ») de l'amplificateur. Cette compensation se fait visuellement par balancement du pont jusqu'au point de rupture de pente qui sépare la résistance due à l'électrode (R_s) de celle due à la cellule (résistance membranaire, R_m) (figure 29). Cette opération de compensation donne directement la valeur de résistance série sur l'amplificateur.

En mode potentiel imposé, la résistance série n'a jamais été compensée pendant l'enregistrement car la compensation n'est jamais optimale avec l'appareillage utilisé (sur

l'amplificateur Axopatch 1D, la compensation n'est au maximum que de 80%). Avant chaque enregistrement, la résistance série est estimée en mode courant imposé afin d'être compensée lors de l'analyse.

Lors de l'analyse, le potentiel imposé lors des expérimentations a été corrigé (V_{hc}) par la résistance série selon la relation :

$$V_{hc}(t) = V_h(t) - I(t) \times R_s$$

dans laquelle $V_h(t)$ est le potentiel imposé à l'instant t et $I(t)$ est le courant enregistré à ce même instant.

B) Paramètres liés aux propriétés des neurones enregistrés.

Avant tout enregistrement en potentiel imposé, un enregistrement en courant imposé est effectué afin de déterminer les caractéristiques de décharge du neurone ainsi que ses caractéristiques intrinsèques.

1. Les caractéristiques intrinsèques du neurone

La résistance membranaire au repos du neurone (R_m) peut être déterminée à partir de l'amplitude de la réponse hyperpolarisante moyenne observée à la suite de l'injection d'un créneau de courant (figure 29). Cet ajustement permet d'estimer la constante de temps (τ_m) de la membrane, sa capacitance ($C_m = \tau_m/R_m$) et la résistance série R_s .

La seconde partie du protocole (créneaux de courants imposés croissants) nous permet de déterminer le profil de décharge du neurone.

2. La relation courant/voltage

La relation entre le courant et le potentiel de la cellule est déterminée à chaque instant. La pente de la courbe I/V obtenue en potentiel imposé donne une estimation directe de la conductance membranaire du neurone (d'après la loi d'Ohm: $V = RI = I/G$).

Les courants membranaires ($I_m(t)$) sont enregistrés à différents niveaux de potentiel imposé. La courbe I/V à chaque instant de la réponse a été tracée pour des potentiels compris entre -100 et $+30$ mV, domaine de potentiel pour lequel cette relation est linéaire. Par la suite, la relation I/V a toujours été calculée sur 3 à 5 valeurs de potentiel comprises dans cette gamme.

Seules les courbes I/V dont le coefficient de corrélation était supérieur à 0,95 ont été utilisées pour déterminer les changements de conductance des neurones pyramidaux enregistrés à partir de la pente des régressions linéaires.

C) Décomposition de la réponse synaptique

L'analyse des réponses est réalisée à l'aide du logiciel Elphy (Biologic, France).

1. Principe de la décomposition

Les études de la réponse synaptique à la stimulation électrique d'une couche corticale ont été réalisées sur des réponses enregistrées en courant. Avec cette méthode, l'inhibition calculée à partir du courant sortant est toujours sous-estimée puisqu'une partie de cette inhibition, l'inhibition silencieuse ou "shuntante" ne s'exprime pas en terme de courant au potentiel de repos du neurone (voir introduction). C'est pourquoi nous avons choisi d'analyser les réponses synaptiques en termes de variations de conductances et nous avons utilisé et adapté une méthode d'analyse préalablement mise au point *in vivo* chez le chat, pour décomposer des réponses à une stimulation visuelle (Borg-Graham et al., 1998). Cette méthode permet de caractériser la signature électrique du processus d'intégration synaptique, en déterminant en continu la variation de la conductance membranaire. Cette méthode a reçu plusieurs validations sur différents modèles expérimentaux : *in vivo* sur le cortex visuel de chat (Borg-Graham et al., 1998 ; Monier et al., 2003), sur le cortex auditif du rat (Wehr & Zador, 2003), ou *in vitro* sur des tranches de cortex préfrontal et occipital de furet (Shu et al., 2003 ; Haider et al., 2006) et sur le cortex somatosensoriel de rat (Higley & Contreras, 2006).

2. Les paramètres de la décomposition

La conductance membranaire ($g(t)$) est égale à la pente de la régression linéaire de la courbe I/V, elle est déterminée à chaque instant de la réponse. Pour estimer l'augmentation de conductance membranaire lors d'une stimulation électrique, la valeur de la conductance au repos (g_{rest}) est déterminée en dehors de la période de stimulation (90 ms avant la stimulation). Les changements de conductance (Δg) sont déterminés à chaque instant t de la réponse selon la relation suivante :

$$\Delta g(t) = g(t) - g_{rest}$$

Le point d'intersection de la courbe I/V au repos (avant stimulation) avec l'axe des abscisses (courant nul) donne le potentiel de membrane au repos (E_{rest}).

La relation I/V nous permet également de déterminer le potentiel d'inversion apparent au soma ($E_{syn}(t)$). La valeur de $E_{syn}(t)$ correspond au point d'intersection entre la droite I/V au repos et la droite I/V à un instant (t) de la réponse. En supposant que les changements de conductance évoqués au soma reflètent les entrées synaptiques arrivant à ce niveau, $E_{syn}(t)$ caractérise la balance E-I. La relation I/V permet aussi de déterminer $I_{syn}(t)$, le courant synaptique membranaire apparent au soma à chaque instant de la réponse (figure 32).

3. La décomposition de la réponse synaptique

La méthode d'analyse repose sur le calcul du changement de conductance membranaire à chaque instant pendant une réponse synaptique. Nous avons d'abord déterminé les composantes de la réponse enregistrée suite à une stimulation électrique :

En présence de CNQX (bloqueur des récepteurs AMPA) et de bicuculline (bloqueur des récepteurs GABA_A), la stimulation électrique n'induit plus de réponse en courant du neurone pyramidal (figure 33).

Afin de valider cette méthode de décomposition, la linéarité de la relation I/V a été déterminée pour les deux composantes excitatrice et inhibitrice :

En présence de CNQX ou de bicuculline, les courbes I/V sont linéaires dans la gamme de potentiel dans laquelle nos enregistrements sont réalisés (entre - 90 et - 40 mV). Le potentiel d'inversion de l'inhibition est de - 80 mV et celui de l'excitation de 0 mV (figure 34).

Dans nos conditions expérimentales, la stimulation électrique d'une couche corticale conduit à des réponses postsynaptiques dépendant de l'activation des récepteurs AMPA et GABA_A.

Les valeurs des potentiels d'inversion utilisés lors de la décomposition sont donc de 0 mV pour l'excitation et de - 80 mV pour l'inhibition.

Dans la gamme de potentiel dans laquelle nous travaillons (de - 90 mV à - 40 mV), le potentiel d'inversion apparent au soma est compris entre les potentiels d'inversion de l'excitation et de l'inhibition (figure 35) :

$$E_{inh} < E_{syn}(t) < E_{exc}$$

$$\text{alors } g_T(t) = g_E(t) + g_I(t)$$

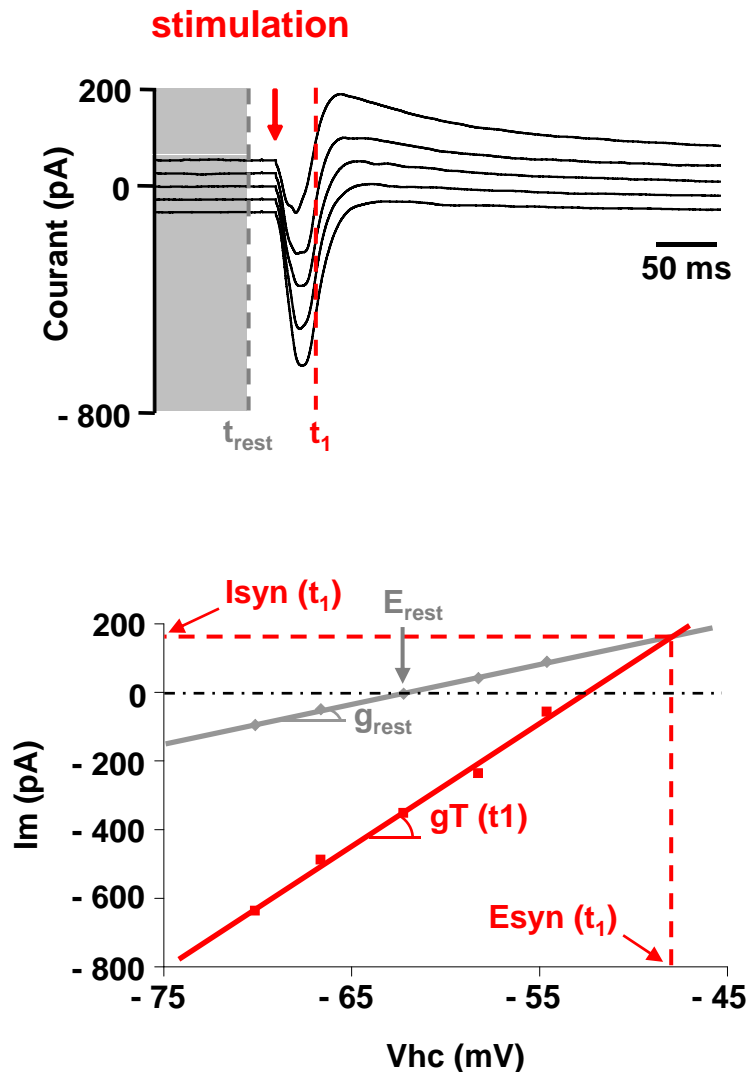


Figure 32. Détermination de la conductance au repos et de la conductance synaptique.

- (a) Traces moyennées de courant obtenues à différents niveaux de potentiel imposé. La flèche rouge indique la stimulation ($t = 100$ ms). La zone grisée comprise entre 0 et 90 ms correspond aux courants enregistrés pour déterminer la valeur de la conductance au repos.
- (b) Relation I/V permettant de calculer la conductance au repos, g_{rest} (gris) et la conductance à chaque instant de la réponse synaptique, $g_T(t)$ (exemple à un instant t_1 en rouge). Les valeurs des ordonnées au point d'intersection des courbes I/V au repos et à un instant t_1 nous donne également le potentiel synaptique ($E_{syn}(t)$) et le courant synaptique à cet instant ($I_{syn}(t)$).

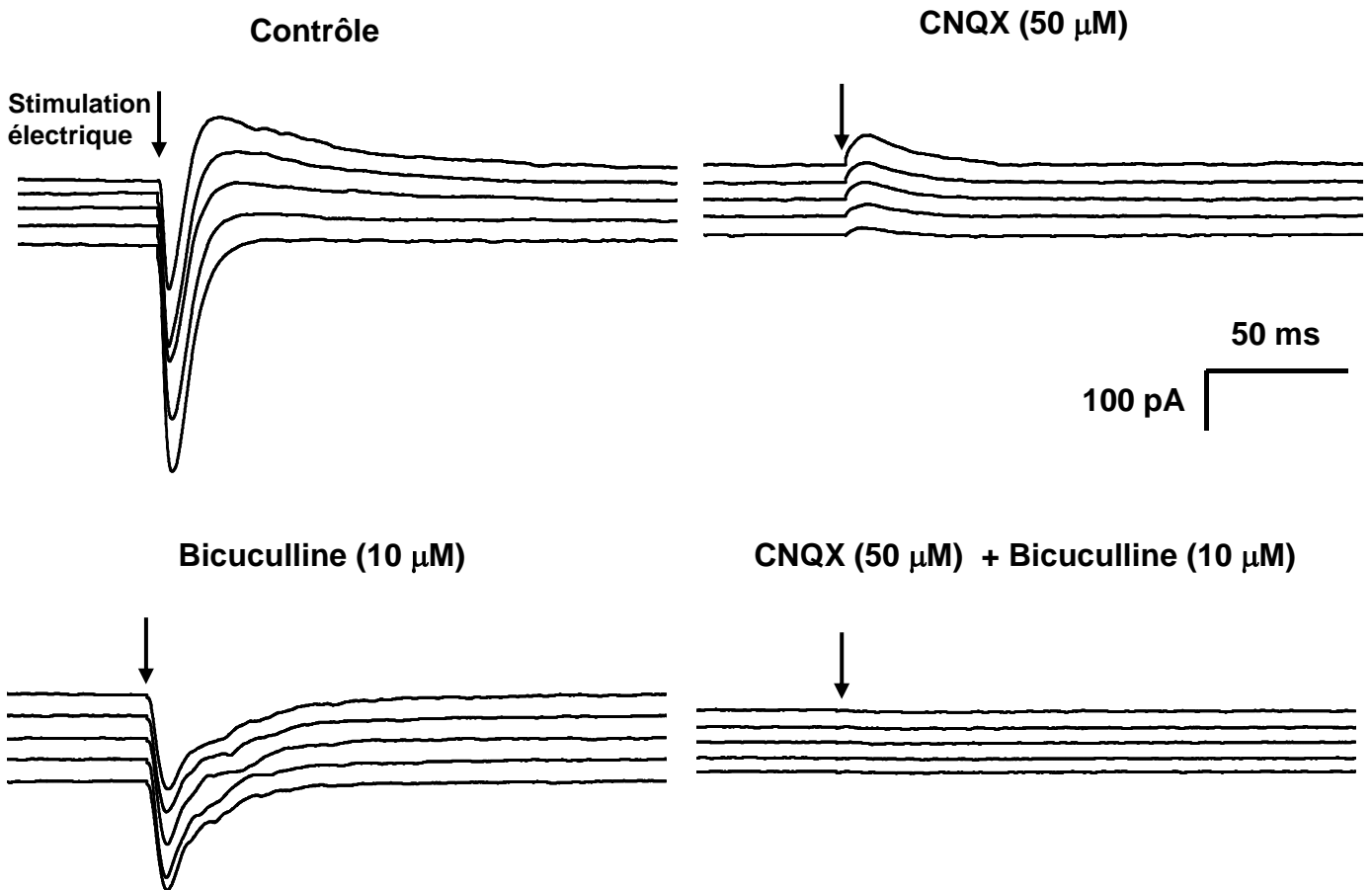


Figure 33. Détermination des composantes excitatrice et inhibitrice de la réponse neuronale suite à une stimulation électrique d'une couche corticale.

Enregistrement des réponses en courant d'un neurone pyramidal de couche 5 à la stimulation électrique d'une couche corticale à différents niveaux de potentiels imposés (de -60 à -80 mV).

La réponse en courant en condition contrôle est biphasique, elle présente une composante entrante excitatrice et une composante sortante inhibitrice. L'application de CNQX, le bloqueur des récepteurs AMPA bloque la composante excitatrice. L'application de bicuculline, le bloqueur des récepteurs $GABA_A$ bloque la composante sortante. L'application conjuguée de CNQX et de bicuculline prévient la réponse neuronale à la stimulation.

La réponse d'un neurone pyramidal de couche 5 à la stimulation électrique d'une couche corticale apparaît par conséquent dépendre de l'activation de récepteurs AMPA et $GABA_A$.

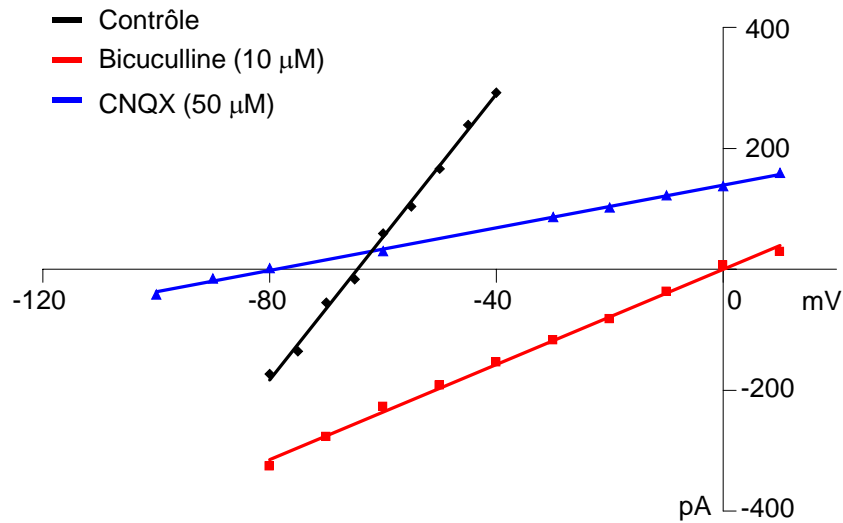


Figure 34. Détermination des potentiels d'inversion de l'inhibition GABAergique et de l'excitation AMPAergique.

Les courbes I/V sont réalisées en présence du bloqueur des récepteurs NMDA (D-AP5 à 50 µM).

En condition contrôle, le potentiel d'inversion est de - 65 mV (noir). En bloquant la composante inhibitrice à l'aide de bicuculline, nous déterminons un potentiel d'inversion de l'excitation de 0 mV. En bloquant la composante excitatrice à l'aide de CNQX, nous déterminons un potentiel d'inversion de l'inhibition de - 80 mV.

Il est important de noter que dans tous les cas, la relation I/V est linéaire dans la gamme de potentiel où sont réalisés nos enregistrements: - 90 à - 40 mV.

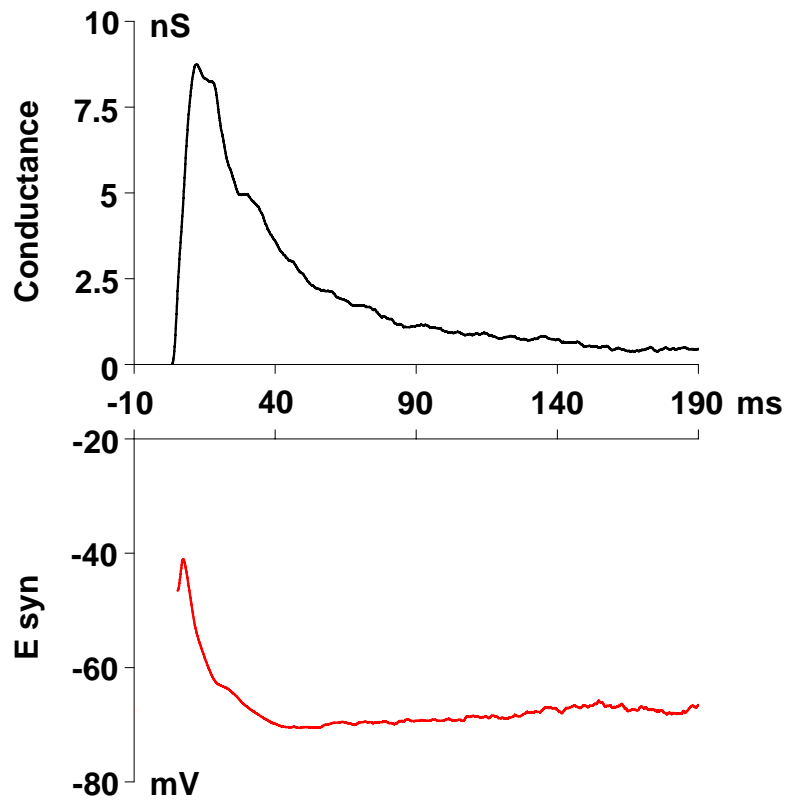


Figure 35. Changement de conductance d'un neurone pyramidal de couche 5 en réponse à une stimulation électrique et du potentiel d'inversion synaptique associé.

Il est important de noter que le potentiel d'inversion apparent au soma reste dans la gamme de potentiel pour laquelle nous travaillons (-90 à -40 mV) et pour laquelle les réponses sont linéaires.

La variation de conductance totale peut alors être décomposée linéairement en ses composantes excitatrice et inhibitrice (figure 36). Cette décomposition a été réalisée à l'aide d'un système de deux équations à deux inconnues (la conductance inhibitrice, gI et la conductance excitatrice, gE) utilisant comme facteurs connus, la variation de conductance à chaque instant de la réponse ($gT(t)$), le potentiel d'inversion synaptique apparent au soma mesuré à chaque instant de la réponse ($E_{syn}(t)$) et le courant synaptique membranaire apparent au soma à chaque instant de la réponse $I_{syn}(t)$:

$$gT(t) = gE(t) + gI(t)$$

$$I_{syn}(t) = gI (E_{syn}(t) - E_{inh}) + gE (E_{syn}(t) - E_{exc}) \text{ avec } E_{inh} = - 80 \text{ mV}$$

$$E_{exc} = 0 \text{ mV}$$

Cette méthode présente l'avantage de pouvoir étudier l'excitation et l'inhibition sans avoir à isoler pharmacologiquement l'une des composantes de la réponse synaptique pour étudier l'autre. Elle permet donc de conserver les interactions entre excitation et inhibition et d'étudier la modulation de ces interactions par différents composés ou dans différentes situations physiologiques.

D) Les paramètres caractérisant la réponse

1. Les variations de conductance

Les changements de conductance sont exprimés soit en nS, soit en pourcentage suivant la formule :

$$\Delta gT(t) = (gT(t) - g(\text{rest})) / g(\text{rest}) \times 100$$

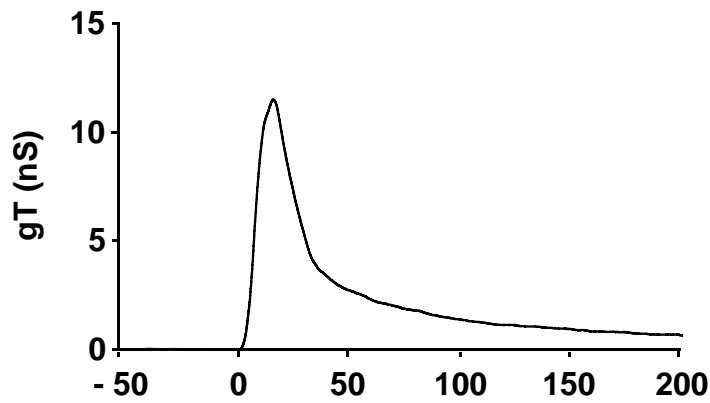
Nous avons estimé l'importance du changement de conductance pendant la réponse en calculant l'intégrale de la conductance synaptique (notée intégrale ou intg) sur les 200 ms suivant la stimulation électrique. Nous avons exprimé nos résultats sous forme d'intégrale de conductance plutôt qu'en utilisant la valeur maximale au pic de conductance car les valeurs en intégrale reflètent la valeur des conductances en fonction du temps et donnent une meilleure reproductibilité.

$$\text{intgT} = \int gT(t) dt$$

Comme pour la conductance totale, l'intégrale des changements de conductance excitatrice intgE et inhibitrice intgI est calculée sur une durée de 200 ms suite à la stimulation électrique.

$$\text{intgE} = \int gE(t) dt$$

$$\text{intgI} = \int gI(t) dt$$



Détermination de gI et gE à partir de $gT(t)$ et $E_{syn}(t)$:

$$gT(t) = gI(t) + gE(t) \text{ si } E_{inh} < E_{syn}(t) < E_{exc}$$

On a:

$$gT(t) = gI(t) + gE(t)$$

$$I(t) = gI(t) (E_{syn}(t) - E_{inh}) + gE(t) (E_{syn}(t) - E_{exc})$$

Avec $E_{exc} = 0$ et $E_{inh} = -80$ mV

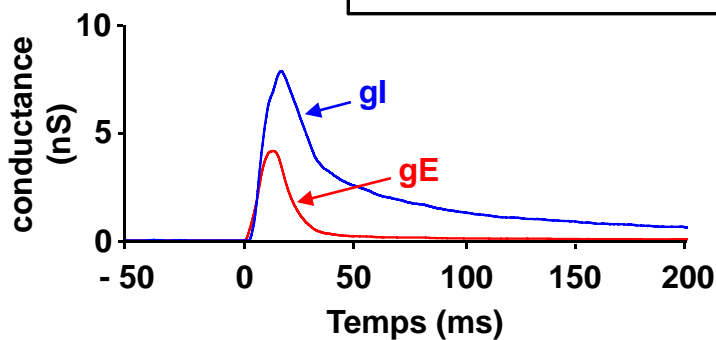


Figure 36. Décomposition de la réponse synaptique en ses composantes excitatrice et inhibitrice.

2. Détermination des latences

Les latences calculées correspondent aux temps (en ms) entre le moment où la stimulation électrique est induite ($t = 0$) et le pic de conductance de la réponse.

3. La balance des conductances excitatrice et inhibitrice

Les poids respectifs des conductances excitatrice et inhibitrice dans la réponse synaptique sont déterminés par le pourcentage de l'intégrale des conductances de chacune des composantes sur l'intégrale de la conductance totale :

$$\%E = 100 \times (\text{intgE} / \text{intgT})$$

$$\%I = 100 \times (\text{intgI} / \text{intgT})$$

4. Reconstitution de la réponse en voltage

Les variations du potentiel de membrane (V_m) lors d'une réponse synaptique à une stimulation électrique ont été reconstituées à partir des changements de conductance synaptique :

$$\frac{dV_m(t)}{dt} = \frac{g_{rest} + gT(t)}{\tau g_{rest}} \left(\frac{g_{rest} E_{rest} + gT(t) E_{syn}(t)}{g_{rest} + gT(t)} - V_m(t) \right)$$

avec g_{rest} , conductance au repos et E_{rest} , potentiel de repos.

Trois types de potentiel de membrane ont été calculés (figure 37) : le potentiel de membrane synaptique (V_{recT}), le potentiel de membrane ne considérant que la conductance excitatrice (V_{recE}) et le potentiel de membrane ne considérant que la conductance inhibitrice (V_{recI}).

5. Le facteur M

Notre méthode nous permet de déterminer les valeurs des conductances excitatrice et inhibitrice au niveau somatique (après intégration dendritique). L'inhibition shuntante peut être estimée par le coefficient d'atténuation de l'excitation par l'inhibition (facteur M).

$$M = (V_{recT} - V_{recI}) / V_{recE} \text{ (Koch et al., 1990)}$$

Dans notre cas, le facteur M a été calculé en utilisant la formule :

$$M = (\text{int}V_{recT} - \text{int}V_{recI}) / \text{int}V_{recE}$$

$$\frac{dV_m(t)}{dt} = \frac{g_{rest} + gT(t)}{\tau g_{rest}} \left(\frac{g_{rest} E_{rest} + gT(t) E_{syn}(t)}{g_{rest} + gT(t)} - V_m(t) \right)$$

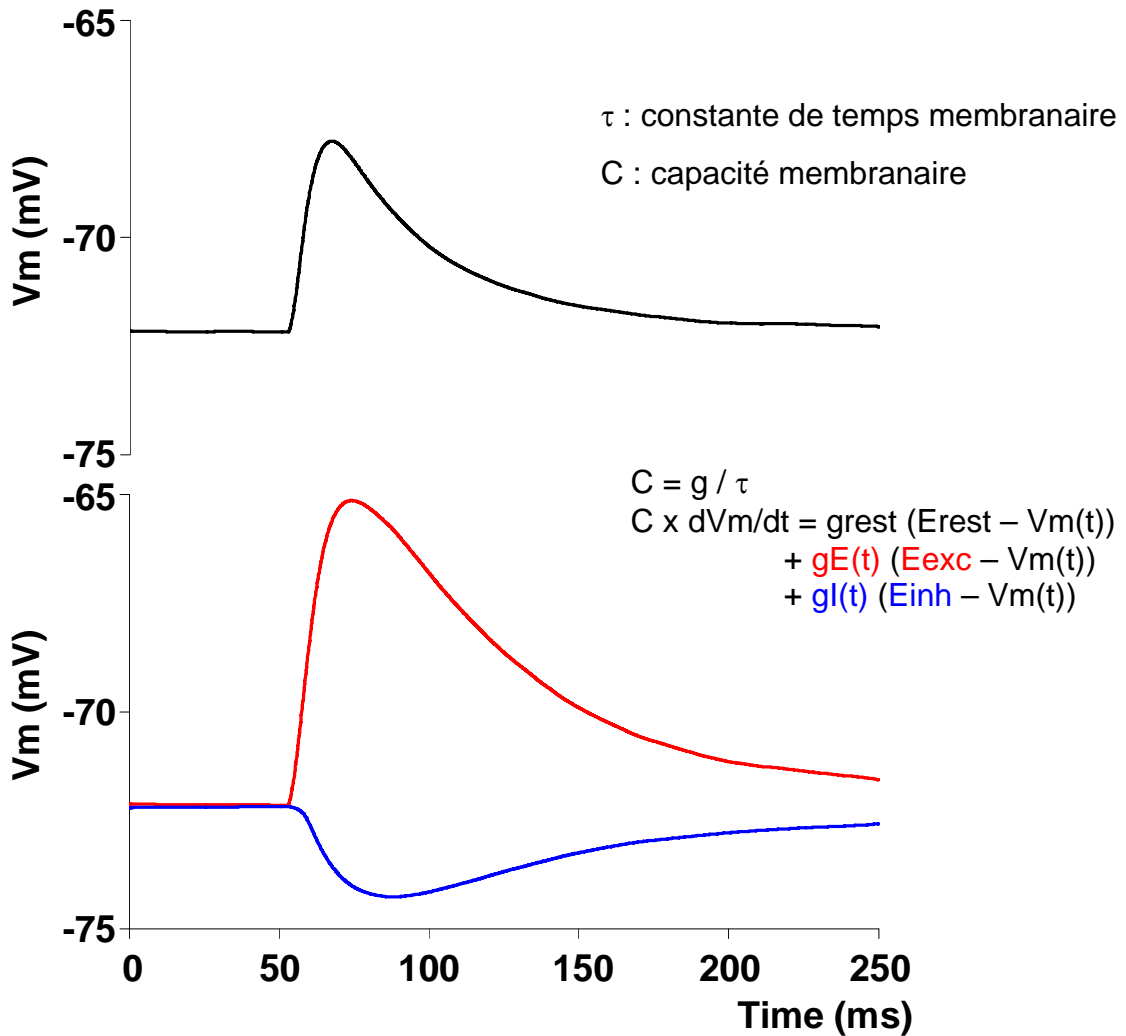


Figure 37. Reconstitution de la réponse en voltage.

Reconstitution de la réponse en voltage (en noir, V_{recT}), en ne tenant compte que de l'excitation (rouge, V_{recE}) et en ne tenant compte que de l'inhibition (bleu, V_{recI}).

E) Analyse statistique

Les résultats observés sont exprimés par la moyenne \pm l'erreur standard à la moyenne (SEM) de n enregistrements. Deux tests statistiques différents ont été utilisés selon que les populations comparées étaient appariées ou indépendantes.

Dans la majorité des cas, nous avons utilisé le test-T ou test de student. Le test T est un test paramétrique qui permet de déterminer si les variances et/ou les moyennes sont significativement différentes. Ce test révèle la significativité des variations mesurées pour un même neurone pour des enregistrements réalisés avant et après perfusion d'une substance pharmacologique, avant et après application de protocoles de stimulation à haute ou basse fréquence et avant et après application de protocoles de stimulation à haute fréquence en présence d'une substance pharmacologique.

Pour comparer deux populations neuronales différentes, de taille différente, le test-U ou test non paramétrique de Mann-Whitney a été utilisé.

Pour ces différents tests, les résultats sont considérés comme significativement différents pour : $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) et $p < 0,001$ (***)).

IV. Marquages immunocytochimiques

Des rats âgés de 18 à 25 jours sont anesthésiés par injection intrapéritonéale de pentobarbital (6 %, 0,1 mL/200 g). Les rats ont d'abord été perfusé au niveau du ventricule gauche avec du tampon phosphate (PBS, 0,1 M, pH 7,3) et du paraformaldéhyde (PAF, 4 %). Les rats sont ensuite perfusés avec du PBS et du sucrose à 15 %. Les cerveaux sont alors prélevés et conservés dans une solution de PAF à 4 % avec du sucrose à 15 %. Des tranches parasagittales de cortex visuel primaire de 30 μ m d'épaisseur sont réalisées, puis conservées dans une solution de PBS 0,1 M et azide de sodium 0,02 %.

Pour l'immunomarquage, les tranches sont rincées (3 fois, 5 min) en PBS 0,1 M et incubées avec une solution de glycine 10 mM + Triton 0,4 % pendant 30 minutes. Après plusieurs rinçages (10 fois, 5 min), elles sont incubées (30 min) avec du sérum de chèvre à 10 %, puis les sites antigéniques sont saturés pendant 1 h avec une solution de saturation (PBS + albumine 2 % + sérum de chèvre 3 %).

L'anticorps primaire est ensuite ajouté, cet anticorps dilué dans la solution de saturation est préalablement centrifugé (5 min, 13000 g, 4°C) avant d'être déposé sur les tranches (48 h

d'incubation à température ambiante avec agitation). L'excès d'anticorps primaire est éliminé par rinçage au PBS, Tween 20 0,1 % (2 fois, 15 min).

L'anticorps secondaire dilué dans la solution de saturation est ensuite ajouté. Après 1h15 d'incubation, les tranches sont rincées (10 fois, 10 min PBS), montées entre lames et lamelles avec du VectaShield (milieu de montage contenant du DAPI), puis conservées à 4°C.

Pour les marquages des récepteurs GABA_A extrasynaptiques chez le rat, un anticorps primaire (IgG) dirigé contre la sous-unité δ de ce récepteur fait chez le lapin a été employé (Santa Cruz Biotechnology, dilution 1/500^e dans du PBS). Un anticorps secondaire couplé à la fluorescéine fait chez la chèvre et dirigé contre les immunoglobulines de type G de lapin a été par la suite utilisé.

La colocalisation des récepteurs GABA_A contenant la sous-unité δ avec les neurones GABAergiques a été étudiée en incubant les tranches avec un anticorps primaire anti-GAD67 fait chez la souris (1/1000^e), associé à un anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé à l'Alexa 528 (1/2000^e). La glutamate décarboxylase (GAD) est l'enzyme de l'étape limitante de la voie de biosynthèse du GABA et est exclusivement présente dans les neurones GABAergiques, avec une localisation cytosolique pour l'isoforme de 67 kDa.

Les contrôles négatifs ont été réalisés en remplaçant, à même dilution, l'anticorps primaire par du sérum de lapin épuisé, les autres étapes restant identiques.

Les tranches ont ensuite été observées à l'aide d'un microscope à épifluorescence à différents objectifs (10 x, 20 x ou 40 x).

Résultats

I. Etude du contrôle homéostatique de la balance excitation/inhibition des neurones pyramidaux de couche 5 du cortex.

A) Position du problème

La réponse corticale élaborée par les neurones pyramidaux de couche 5 dépend de la balance entre les entrées excitatrices et inhibitrices perçues par ce neurone (Borg-Graham et al., 1998 ; Wehr & Zador, 2003) et donc de l'activité des circuits neuronaux excitateurs et inhibiteurs en amont. Le contrôle de la balance E/I est capital pour maintenir les réseaux corticaux dans un état d'activité fonctionnel (Liu, 2004 ; Haider et al., 2006) afin d'empêcher la saturation du système et les pathologies qui découlent d'une hypo ou d'une hyper-excitabilité (Turrigiano, 1999). Dans le but de contrôler leur niveau d'excitabilité, les réseaux neuronaux sont capables d'ajuster la force de leurs connexions synaptiques. Ainsi, des changements trop drastiques de l'efficacité des entrées excitatrices ou inhibitrices sur un neurone seraient compensés par des changements réciproques d'efficacité de l'autre composante. Cette régulation a été décrite sous le terme de plasticité homéostatique (Turrigiano, 1999 ; Davis & Bezprozvanny, 2001 ; Turrigiano & Nelson, 2004 ; Buckby et al., 2006). Le seul moyen de démontrer expérimentalement l'existence de ces interactions régulatrices entre excitation et inhibition est une mesure directe de la balance E/I.

L'objectif fixé dans un premier temps était d'estimer la balance Excitation/Inhibition des neurones pyramidaux de couche 5 en réponse à des stimulations électriques en couche 2/3, 4 ou 6, qui correspondent aux principales voies d'entrée corticale. Des protocoles de stimulation à haute ou basse fréquence, capables d'induire des changements d'efficacité des connexions synaptiques dans les réseaux neuronaux excitateurs et/ou inhibiteurs ont été ensuite appliqués dans les différentes couches corticales dans le but de caractériser la régulation de la balance E/I en réponse à des changements d'efficacité des connexions excitatrices et/ou inhibitrices des réseaux neuronaux.

B) Résultats

“Homeostatic control of the excitation-inhibition balance in cortical layer 5 pyramidal neurons”

LE ROUX Nicolas, AMAR Muriel, BAUX Gérard et FOSSIER Philippe.

European Journal of Neuroscience (2006) **24**: 3507-3518.

Homeostatic control of the excitation–inhibition balance in cortical layer 5 pyramidal neurons

Nicolas Le Roux, Muriel Amar, Gérard Baux and Philippe Fossier

CNRS, Institut de Neurobiologie Alfred Fessard, FRC2118, Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire, UPR9040, Gif sur Yvette, F-91198, France

Keywords: cortical networks, homeostatic plasticity, shunting inhibition

Abstract

Homeostatic regulation in the brain is thought to be achieved through a control of the synaptic strength by close interactions between excitation and inhibition in cortical circuits. We recorded in a layer 5 pyramidal neuron of rat cortex the composite response to an electrical stimulation of various layers (2–3, 4 or 6). Decomposition of the global conductance change in its excitatory and inhibitory components permits a direct measurement of excitation–inhibition (E-I) balance. Whatever the stimulated layer was, afferent inputs led to a conductance change consisting of 20% excitation and 80% inhibition. Changing synaptic strengths in cortical networks by using a high-frequency of stimulation (HFS) protocol or a low-frequency of stimulation (LFS) protocol (classically used to induce long-term potentiation or long-term depression at the synaptic level) were checked in order to disrupt this balance. Application of HFS protocols in layers 2–3, 4 or 6, or of LFS protocols in layer 4 induced, respectively, long-term parallel increases or long-term paralleled decreases in E and I which did not change the E-I balance. LFS protocols in layers 2–3 or 6 decreased E but not I and disrupted the balance. It is proposed that regulatory mechanisms might be mainly sustained by recurrent connectivity between excitatory and inhibitory neuronal circuits and by modulation of shunting GABA_A inhibition in the layer 5 pyramidal neuron.

Introduction

The neuronal population of the cerebral cortex is mainly composed of glutamatergic pyramidal neurons and gamma amino butyric acid (GABA)ergic interneurons making extensive local connections. Each cortical population also receives inputs from neighbouring neurons (Peters & Kara, 1985a; Martin, 2002) which form recurrent excitatory and inhibitory circuits. Moreover, excitatory circuits are strongly connected to inhibitory circuits (Maffei *et al.*, 2004) of distinct types (Peters & Kara, 1985b; Gibson *et al.*, 1999) by feedback and feedforward connections (Bannister, 2005).

The cortical response elaborated by layer 5 pyramidal neurons is dependent on the balance between the excitatory and inhibitory inputs perceived (Borg-Graham *et al.*, 1998; Wehr & Zador, 2003). Thus, the regulation of cortical activity needs a tight control of excitatory and inhibitory neurons; a complex control of the excitation–inhibition (E-I) balance has to be maintained to keep the network in a functional state (Liu, 2004; Haider *et al.*, 2006) to prevent saturation and hence disorders induced by hyper- or hypoeexcitability (Turrigiano, 1999). In this way, neuronal networks can sense and control their level of excitability by adjusting their synaptic strength. This regulation has been described in terms of homeostatic plasticity (Davis & Bezprozvanny, 2001; Buckby *et al.*, 2006). It is generally thought that dynamic equilibria between recurrent excitation and inhibition in neuronal networks allow the generation of stable periods of activity (Durstewitz *et al.*, 2000; Compte *et al.*, 2003; Turrigiano & Nelson, 2004). However, the only way to demonstrate experimentally that an equilibrated and regulated balance exists between excitation and

inhibition is to determine the E-I ratio by a direct measurement of each component.

Our results provide experimental evidence for the previous computational analysis (Miller, 1996; Shu *et al.*, 2003) predicting a homeostatic regulation of the E-I balance. In order to define the E-I balance in layer 5 pyramidal neurons, we used a method allowing simultaneous measurement of changes in excitation and inhibition conductances (Borg-Graham *et al.*, 1998; Monier *et al.*, 2003). Such a method used to determine the E-I balance at the somatic level of the pyramidal neuron permits maintenance of functional interactions between glutamatergic neurons and GABAergic interneurons because it avoids any pharmacological treatment of neuronal networks. Whichever network of the three main entries into the cortex (layers 2–3, 4 or 6) was stimulated, we observed that the E-I ratio was identical. To further investigate the regulatory mechanisms, we used protocols of stimulation known to induce changes in synaptic strength: a high-frequency stimulation (HFS) protocol classically used to induce long-term potentiation (LTP) and a low-frequency stimulation (LFS) protocol used to induce long-term depression (LTD) in the stimulated layer. Our results point to a network organization involving recurrent excitatory and inhibitory circuits which interact to stabilize the E-I balance and to assume neuronal control of synaptic integration. The control of the synaptic integration is partly due to tonic GABA_A inhibition (known as shunting inhibition: Petrini *et al.*, 2004; Mody, 2005) which appears differently recruited from one layer to another.

Materials and methods

Slice preparation

Parasagittal slices containing primary visual cortex were obtained from 18- to 25-day-old Wistar rats. Briefly, in accordance with the

Correspondence: Dr Nicolas Le Roux, as above.
E-mail: leroux@nbcn.cnrs-gif.fr

Received 9 June 2006, revised 14 September 2006, accepted 28 September 2006

guidelines of the American Neuroscience Association, a rat was decapitated, its brain quickly removed and placed in chilled (5 °C) artificial cerebrospinal extracellular solution. Slices of 250 µm thickness were made using a vibratome from the primary visual cortex and then incubated for at least 1 h at 36 °C in a solution containing (in mM): NaCl, 126; NaHCO₃, 26; glucose, 10; CaCl₂, 2; KCl, 1.5; MgSO₄, 1.5; and KH₂PO₄, 1.25 (pH 7.5, 310–330 mOsm). This solution was bubbled continuously with a mixture of 95% O₂ and 5% CO₂.

Electrophysiological recordings and cell identification

Slices were placed on the *X-Y* translation stage of a microscope with a video-enhanced differential interference contrast system and superfused continuously. The optical monitoring of the patched cell was achieved with standard optics using 40× long working distance water-immersion lens. Layer 5 pyramidal neurons, identified from the shape of their soma and primary dendrites and from their current-induced excitability pattern, were studied using the patch-clamp technique in whole-cell configuration. Somatic whole-cell recordings were performed at room temperature using borosilicate glass pipettes (of 3–5 MΩ resistance in the bath), filled with a solution containing (in mM): K-gluconate, 140; HEPES, 10; ATP, 4; MgCl₂, 2; GTP, 0.4; and EGTA, 0.5 (pH 7.3 adjusted with KOH, 270–290 mOsm).

Current-clamp and voltage-clamp recordings were performed using an Axopatch 1D (Axon Instruments, Union City, California, USA); filtered by a low-pass Bessel filter with a cutoff frequency set at 2 kHz, and digitally sampled at 4 kHz. The membrane potential was corrected off-line by –10 mV to account for the junction potential. This value (–10 mV) was measured in our experimental conditions (data not shown). Estimation of the access resistance (*R_s*) is critical in quantitatively evaluating the relative change in input conductance in response to synaptic activation. After capacitance neutralization, bridge balancing was performed on-line in current-clamp conditions, which provided us with an initial estimate of *R_s*. This value was checked and revised as necessary off-line by fitting the voltage response to a hyperpolarizing current pulse with the sum of two exponentials. Under voltage-clamp conditions, the holding potential was corrected off-line using this *R_s* value (see below). Only cells with a resting membrane potential more negative than –55 mV and recordings with *R_s* < 25 MΩ were kept for further analysis. In 350 cells, mean ± SD *R_s* = 18.4 ± 0.3 MΩ, ranging from 4 to 25 MΩ. The firing profile of neurons was determined in response to depolarizing current pulses ranging from –100 to +200 pA under current-clamp conditions.

The stimulating electrodes were positioned in the three main entrance sites of visual cortex: layers 4, 2–3 and 6. Electrical stimulations (1–10 µA, 0.2 ms duration) were delivered in these layers using 1 MΩ impedance bipolar tungsten electrodes (TST33A10KT; WPI, Hertfordshire, UK). The intensity of the stimulation was adjusted in current-clamp conditions to be strong enough to induce a subthreshold postsynaptic response due to coactivation of excitatory and inhibitory circuits but weak enough to avoid recruitment of dominant nonlinear processes linked for instance to NMDA receptor activation. Additional experiments (not shown) with the NMDA receptor blocker D-AP5 showed no variation in synaptic responses. Responses with antidromic spikes were discarded. Under voltage-clamp conditions, the frequency of stimulation was 0.05 Hz and five to eight trials were repeated for a given holding potential.

A control recording was made after 15 min of patch-clamp equilibration, and then HFS or LFS protocols were applied in order to induce long-term modifications of synaptic strengths in the recruited circuits. The HFS protocol was elicited with theta-burst stimulation, known to induce LTP at the synaptic level. It consisted of three trains of 13 bursts applied at a frequency of 5 Hz, each burst containing four pulses at 100 Hz (Abraham & Huggett, 1997). Several LFS protocols were tested (to induce LTD at the synaptic level): 1 Hz stimulation for 15 min (Dudek & Bear, 1992) or for 10 min, or 1 Hz stimulation for 10 min with bursts composed of eight pulses at 250 Hz. The first protocol gave better results and was retained. Recordings under control conditions were made at 0.05 Hz and an identical frequency of stimulation was used 15, 30, 45 and 60 min after application of the HFS or LFS protocol.

Synaptic response analysis

Data were analysed off-line with specialized software (Acquis1™ and Elphy™; Biologic UNIC-CNRS, Gif-sur-Yvette, France). The method is based on the continuous measurement of conductance dynamics during stimulus-evoked synaptic response, as primary described *in vivo* on cat cortex (Borg-Graham *et al.*, 1998; Monier *et al.*, 2003). This method received further validation on rat primary auditory cortex (Wehr & Zador, 2003), on slices of ferret prefrontal and occipital cortex (Shu *et al.*, 2003; Haider *et al.*, 2006) and on rat barrel cortex (Higley & Contreras, 2006). Evoked synaptic currents were measured and averaged at a given holding potential. In *I-V* curves for every possible delay (*t*), the value of holding potential (*V_h*) was corrected (*V_{hc}*) from the ohmic drop due to the leakage current through *R_s* according the following equation.

$$V_{hc}(t) = V_h(t) - I(t) \times R_s$$

An average estimate of the input conductance waveform of the cell was calculated from the best linear fit (mean least square criterion) of the *I-V* curve for each delay (*t*) following the stimulation onset. Only cells showing a Pearson correlation coefficient > 0.95 for the *I-V* linear regression between –90 and –40 mV were considered when calculating the conductance change of the recorded pyramidal neuron from the slope of the linear regression.

The evoked synaptic conductance term [*g_T*(*t*)] was derived from the input conductance by subtracting the resting conductance (*g_{rest}*). Under our experimental conditions, the global spontaneous activity was very weak and, thus, the synaptic activity at rest was null. Consequently, the *g_{rest}* value was estimated 90 ms before the electrical stimulation. The apparent reversal potential of the synaptic current at the soma [*E_{syn}*(*t*)] was taken as the voltage abscissa of the intersection point between the *I-V* curve obtained at a given time (*t*) and that determined at rest. Assuming that the evoked somatic conductance change reflects the composite synaptic input reaching the soma, *E_{syn}*(*t*) characterizes the stimulation-locked dynamics of the balance between excitation and inhibition.

Stable patch-clamp recordings were obtained from the soma of neurons, localized exclusively in layer 5 of rat visual cortex. The excitability profile of each neuron was characterized by the discharge pattern in response to test depolarizing current pulses. Recorded neurons had a resting potential of –75.7 ± 0.2 mV (*n* = 350) and showed the typical regular adaptation discharge pattern of pyramidal neurons. Membranes of these neurons had an input resistance of 240.0 ± 7.1 MΩ.

Decomposition of the synaptic conductance

To decompose the global evoked synaptic conductance [$gT(t)$] into excitatory and inhibitory components [$gE(t)$ and $gI(t)$], we used the following simplifications:

$$I_{\text{syn}}(t) = gE(t)(E_{\text{syn}}(t) - E_{\text{exc}}) + gI(t)(E_{\text{syn}}(t) - E_{\text{inh}})$$

and

$$gT(t) = gE(t) + gI(t)$$

where $I_{\text{syn}}(t)$ is the global synaptic current, $E_{\text{syn}}(t)$ is the apparent reversal potential at the soma (see the previous paragraph), $gE(t)$ and $gI(t)$ are excitatory and inhibitory conductances, respectively, and E_{exc} and E_{inh} are the reversal potentials for excitation and inhibition currents. Values of these reversal potentials were equal to 0 mV for excitation (E_{exc}) and to -80 mV for inhibition (E_{inh} ; see Supplementary material, Appendix S1), lumping the combined effects of the activation of GABA_A and GABA_B receptors in a single inhibitory component potential (Anderson *et al.*, 2000; Borg-Graham, 2001; Monier *et al.*, 2003). These values for the reversal potentials are classically accepted (Wehr & Zador, 2003; Higley & Contreras, 2006). However, in additional experiments (data not shown) where we used a pharmacological bath application of excitatory synaptic transmission blockers (CNQX, D-AP5) associated with QX314 in the intracellular solution (to block the GABA_B component), the apparent synaptic reversal potential of the peak conductance was found to be stabilized at -80 mV and the remaining synaptically evoked response component was abolished by addition of bicuculline, a selective antagonist of GABA_A receptors. The value of -80 mV used in the decomposition method is thus the reversal potential corresponding to GABA_A (and not an intermediate value between GABA_A and GABA_B) because in the presence of QX314 no variation in the synaptic response was observed. Indeed, under our experimental conditions of stimulation of cortical layers leading to subthreshold postsynaptic responses, $E_{\text{syn}}(t)$ which was extrapolated from I - V curves took any intermediate value between -80 and -40 mV, i.e. within the limits of our voltage excursion (-90 to -40 mV) corresponding to the linearity of I - V curves and between the respective values of E_{inh} and E_{exc} in such a way that the mathematical conditions of the simplification used to calculate $gI(t)$ and $gE(t)$ were fulfilled (see Supplementary material, Appendix S1).

Like all somatic recordings, our recordings cannot make rigorous estimates of synaptic events in the distal dendrites, and the conductance estimates are ratios of the overall excitatory and inhibitory drive contained in the local network stimulated (Haider *et al.*, 2006). However, our measurements are relative changes in conductance magnitude which reflect the cumulative contributions of excitation and inhibition arriving at proximal portions of the neuron. These relative conductance changes at the somatic level define a narrow window over which input integration and spike output can occur (Higley & Contreras, 2006).

Two parameters were used to quantify the synaptic conductance changes: the peak value and the integral (int) over a time window of 200 ms. The contribution of each component was expressed by the ratio of its integral value (int gE or int gI) to that of global conductance change (int gT). The time elapsed from the beginning of the stimulation to the peak of conductance changes (TESP) was measured in order to avoid errors due to the overlapping of the stimulation artefact with the onset of synaptic responses. Stimulation artefacts were replaced off-line by equivalent basal line on the recordings.

Reconstitution of the membrane potential

The dynamics of the membrane potential (V_{recT}) was reconstituted from the experimentally derived excitatory and inhibitory conductance profiles, on the basis of the prediction given by the combination of the different synaptic activation sources:

$$\frac{dV_{\text{m}}(t)}{dt} = \frac{g_{\text{rest}} + gT(t)}{\tau g_{\text{rest}}} \left(\frac{g_{\text{rest}} E_{\text{rest}} + gT(t) E_{\text{syn}}(t)}{g_{\text{rest}} + gT(t)} - V_{\text{m}}(t) \right)$$

where τ is the membrane time constant measured at rest by injecting a 50 pA hyperpolarizing current step and E_{rest} is the resting potential.

V_{recI} or V_{recE} are also derived from this equation assuming that the voltage drive is only due to inhibitory or excitatory conductance profiles, respectively.

As our method gives gE and gI at the somatic level (i.e. after dendritic integration), we do not have an estimation of shunting inhibition due to the activation of GABA_A receptors (which opens chloride permeability) in conditions where the reversal potential of Cl⁻ is close to the resting potential. The activation of these receptors does act as a shunt of distal inputs (Bai *et al.*, 2001; Kullmann *et al.*, 2005; Mody, 2005).

To estimate the shunting inhibition previously reported by theoretical studies as a tonic-like GABA_A conductance (Mitchell & Silver, 2003; Mody, 2005), the following parameter, described as the M factor (Koch *et al.*, 1990) was calculated.

$$M = (\text{int}V_{\text{recT}} - \text{int}V_{\text{recI}}) / (\text{int}V_{\text{recE}})$$

using the integrals of V_{recT} , V_{recI} and V_{recE} .

M reflects the reducing coefficient of excitation by shunting inhibition at the somatodendritic level when the membrane potential is near the resting potential.

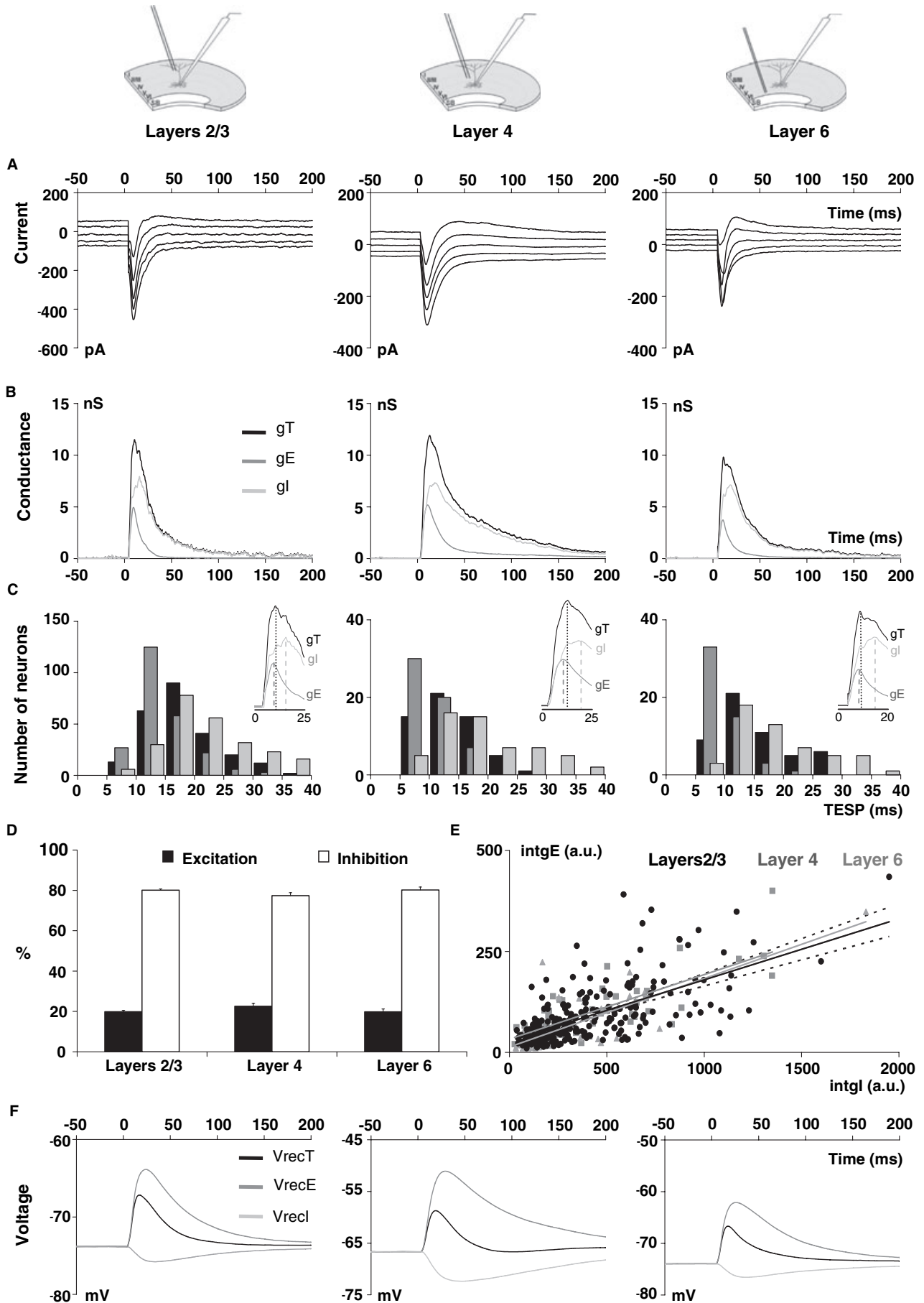
Statistical analysis

Data are expressed as the mean \pm SD of n cells. Statistical analyses were performed using the nonparametric Wilcoxon test and the parametric t -test for paired samples. In this latter case, data were expressed as percentages of control values. Data were considered statistically significant for $P \leq 0.05$.

Results

Characterization of the E-I balance in layer 5 pyramidal neurons in response to the stimulation of different cortical layers

The visual cortex receives sensory inputs from the retina, mainly in layer 4 (Bannister, 2005; Silberberg *et al.*, 2005) but also in layers 2–3 and 6 (Thomson *et al.*, 2002; Sincich & Horton, 2005). Electrical stimulations of layers 2–3, 4 or 6 initiate a complex current response in the recorded pyramidal neuron of layer 5 (Fig. 1A). Representative experiments for stimulation of layers 2–3 ($n = 241$), 4 ($n = 57$) and 6 ($n = 52$) are presented in Fig. 1A. Figure 1B shows the decomposition of the conductance of the response (black trace) into its excitatory and inhibitory components (dark grey and light grey traces). The global conductance changes appeared with shorter TESP (black bars, Fig. 1C) when the stimulation was applied in layer 4 or 6 (15.0 ± 1.0 and 16.7 ± 1.2 ms, respectively) than in layers 2–3 (20.2 ± 0.6 ms). Similar results were obtained for excitatory (dark grey bars) or inhibitory (light grey bars) conductance changes. In all cases, excitation always occurred before inhibition. Stimulation in



layer 4 or 6 induced excitation conductance changes with a preferential distribution between 5 and 10 ms after stimulation, and inhibition conductance changes between 10 and 15 ms. The excitation and inhibition conductance changes appeared later when the stimulation was applied in layers 2–3, i.e. between 10 and 15 ms and between 15 and 20 ms, respectively. It is proposed that excitatory afferents are directly recruited by the stimulation whereas inhibitory afferents ($91.3\% \pm 4.8\%$, $n = 6$) depend on disynaptic connections involving a glutamatergic excitatory synapse on the GABAergic neuron (unpublished results obtained following excitation blockade) which introduce a delay for the observed inhibition in pyramidal neurons. The shorter TESP of the response induced by stimulation of layer 4 or 6 may result from the proximity of the soma of the pyramidal cell in layer 5 and/or from the neuronal composition and organization of the activated networks.

The integral of conductance changes was calculated as it reflects the conductance as a function of time with a better reproducibility than the direct measurement of the peak conductance. The analysis of the whole population of recorded neurons gave mean values of total conductance integral (intgT), 503.9 ± 23.1 , 520.9 ± 51.5 and 319.9 ± 47.1 arbitrary units for stimulation of layers 2–3, 4 and 6, respectively. Similarly, changes in excitation (intgE) and inhibition (intgI) conductance integrals were calculated and expressed as percentages of intgT. Excitation represented $\sim 20\%$ and inhibition 80% of the signal received by layer 5 pyramidal neurons, whichever layer was stimulated (Fig. 1D). The balance between excitatory and inhibitory inputs was also estimated by the slope of the linear regression of the relationships between intgE and intgI (Fig. 1E). Linear regressions corresponding to stimulation in layer 4 or 6 lie within the 95% confidence interval calculated for stimulation in layers 2–3. This confirms that E–I ratios were similar whichever layer of the cortical network was stimulated and although different neuronal networks were recruited. The large proportion of inhibition and the lack of change in this parameter through stimulation of different layers are in agreement with previous studies showing that inhibition appears to be the main controller of excitability in the cortex (Galarreta & Hestrin, 1998; Hasenstaub *et al.*, 2005) although glutamatergic pyramidal cells represent $> 80\%$ of the neuronal population in each layer (Peters & Kara, 1985a). This is all the more crucial as GABAergic neurons are highly connected by electrical synapses (Bennett, 1997; Hestrin & Galarreta, 2005) which probably synchronize all recurrent GABAergic circuitry in the cortex (Buzsáki & Chrobak, 1995).

Reconstituted voltage responses of a pyramidal neuron, as well as the reconstituted voltage drives of excitation and inhibition during the response, following activation of different layers are shown in Fig. 1F. These subliminal responses to stimulation of one layer just reflect the result of somatodendritic integration of afferent inputs in the soma of the pyramidal neuron, i.e. the probability of occurrence of action potentials.

The voltage response is not the linear summation of reconstituted independent excitation and inhibition voltage changes due to shunting inhibition estimated by the M factor (see Materials and methods). M factor values were similar for stimulation of layers 2–3 and 4 (0.64 ± 0.01 and 0.65 ± 0.02 , respectively) but lower than that for layer 6 stimulation (0.75 ± 0.02). These values emphasize that tonic-like GABA_A inhibition acts as a somatodendritic filter for distal signals afferent to the pyramidal neuron, this filter being more or less important according to the stimulated layer. To approach the factors controlling the E–I balance, we next tried to modify the balance of excitatory and inhibitory inputs on the layer 5 pyramidal neuron by application of HFS or LFS protocols.

Effects of HFS or LFS protocols of stimulation in different cortical layers on the E–I balance

HFS and LFS are known to induce prolonged modifications of synaptic efficacy (LTP or LTD). They have been mainly studied on excitatory glutamatergic synapses in the hippocampus (Bliss & Gardner-Medwin, 1973), in the cortex (Daw *et al.*, 2004) and in the cerebellum (Daniel *et al.*, 1998). Few observations of LTP at inhibitory synapses have been made (Komatsu, 1996; Saitow *et al.*, 2005). However, the consequences of HFS and LFS protocols of stimulation applied on a complex neuronal network have not been determined. In order to induce prolonged changes in synaptic efficacy in cortical networks, HFS or LFS protocols were applied in different cortical layers and the E–I balance was then determined in the layer 5 pyramidal neuron.

HFS protocols in layers 2–3 ($n = 12$), 4 ($n = 23$) or 6 ($n = 19$) led to an increase in current amplitudes of the recorded layer 5 pyramidal neuron (Fig. 2A). Marked increase in integrals of global, excitation and inhibition conductance changes compared to control were observed (Fig. 2B). These effects were recorded 15 min after HFS and were well maintained during a further 45 min. It is probable that they were due to long-term significant increases in synaptic efficacies. It is worth noting that intgT, intgE and intgI increased in the same proportions for stimulation of layers 2–3 or 6 by ~ 50 , 30 and 50%, respectively (see Fig. 2, B1, B2 and B3), whereas the effects were weaker for layer 4 (by ~ 40 , 20 and 40%, respectively; Fig. 2, B2) than for the other stimulated layers. However, no significant modification of the ratio of excitation or inhibition to total conductance changes was detected (Fig. 2C). This strongly suggests that equivalent enhancements of excitatory and inhibitory inputs occur after application of HFS to maintain the network in a stable functional range. Indeed, reconstituted voltage responses showed no significant variation in the response of the studied pyramidal neuron after HFS protocols in both excitatory and inhibitory input circuits, as illustrated in Fig. 2D for application of HFS in layers 2–3. However, the M factor was decreased after HFS protocols in layers 2–3 (from a control value of 0.61 ± 0.04 to 0.57 ± 0.04 after 60 min) or in layer 6 (from a

FIG. 1. Comparison of the effects of stimulation of different layers of rat visual cortex on the response recorded in layer 5 pyramidal neurons. Diagrams show the location of the stimulated layer (bipolar electrode, left) and of the recorded neuron ($n = 241$ for layers 2–3, $n = 57$ for layer 4 and $n = 52$ for layer 6) in layer 5 (micropipette, right). (A) Representative current recordings in response to electrical stimulation (100 ms) applied in the given layer. Holding potentials were scaled from -75 mV (bottom trace) to -55 mV (top trace) for layers 2–3; from -65 to -45 mV for layer 4; and from -70 to -50 mV for layer 6; all in 5-mV steps. (B) Decomposition of the total conductance change in the response (black) into its excitatory (dark grey) and inhibitory (light grey) components. Peak values of the total conductance changes were 11.7 ± 1.2 , 11.6 ± 0.6 and 9.7 ± 1.5 nS for stimulations applied in layers 2–3, 4 and 6, respectively. (C) Distribution of TESP of the responses for the studied population of recorded pyramidal neurons. TESP values were calculated from time 0, the beginning of the stimulation, to the peak of the conductance changes: global (black), excitatory (dark grey) and inhibitory (light grey). Insets are the conductance changes presented in B on an expanded time scale. (D) Excitatory (black bars) and inhibitory (white bars) conductances expressed as percentages of the total conductance change. Note that excitation represents $19.9 \pm 0.6\%$, $22.7 \pm 1.4\%$ and $19.9 \pm 1.4\%$ of total conductance change for stimulation of layers 2–3, 4 and 6, respectively. (E) Relationship between intgE and intgI for each recorded neuron. Linear regression (black line) with its 95% confidence interval (dotted lines) corresponds to layers 2–3 stimulation and has a slope of 0.1511. The slopes of linear regressions for stimulations of layers 4 (dark grey line) or 6 (light grey line) were 0.1599 and 0.1695, respectively. (F) Reconstitution of the voltage responses from membrane parameters: global voltage drive (black line); voltage drive considering the sole contribution of excitation (dark grey line); and voltage drive considering the sole contribution of inhibition (light grey line).

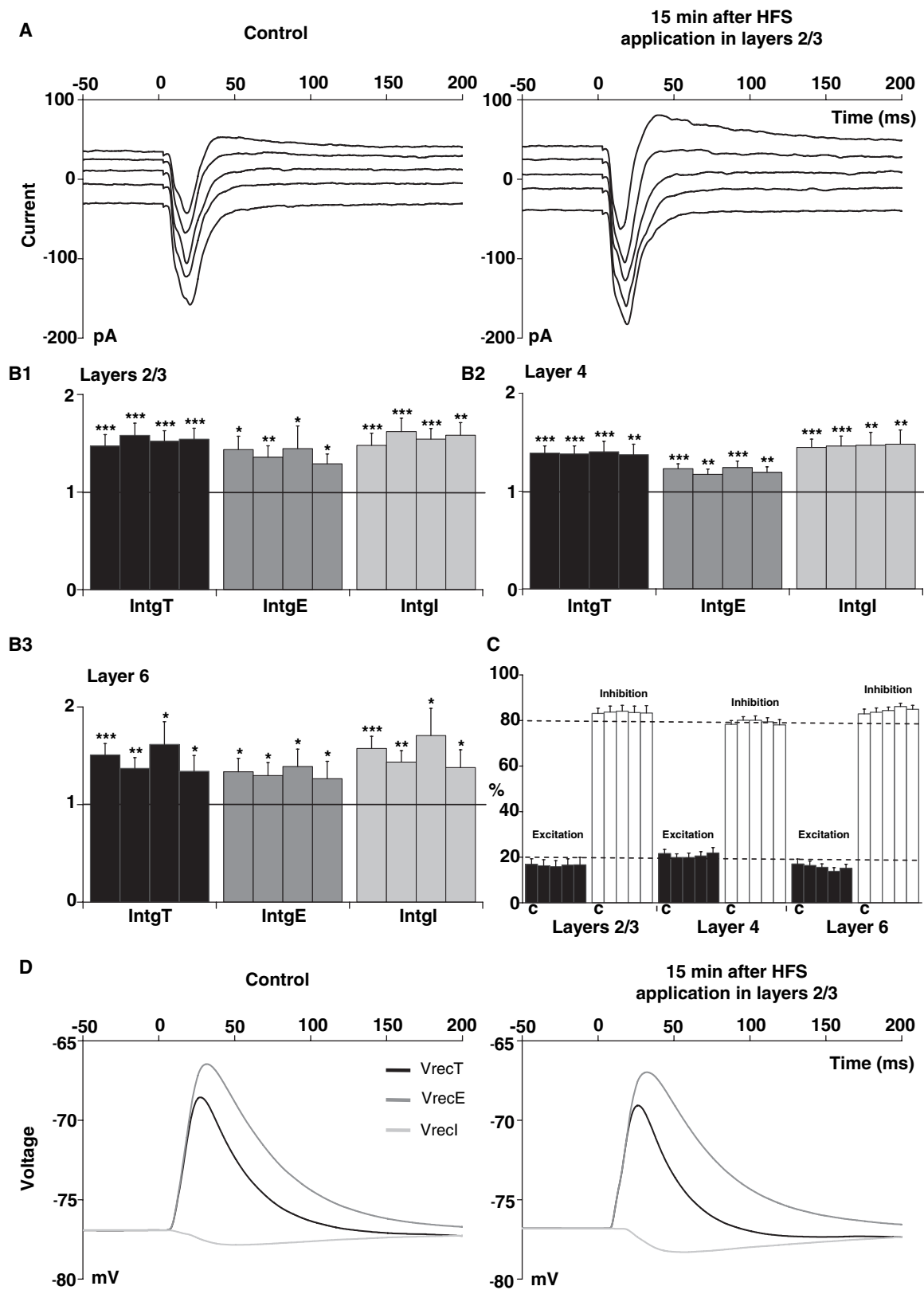


FIG. 2. Effects of HFS protocols. (A) Representative whole-cell current recordings before and 15 min after application of HFS in layers 2–3. Holding potentials were scaled from -85 mV (bottom trace) to -65 mV (top trace), in 5-mV steps. (B) Relative changes (compared to control) of intgT (black bars) and intgE (dark grey bars) and intgI (light grey bars), various times (15, 30, 45 and 60 min) after application of HFS in layers 2–3 ($n = 12$), 4 ($n = 23$) and 6 ($n = 19$). (C) Relative contribution of excitation (black) and inhibition (white) conductances to the total conductance change, various times (15, 30, 45 and 60 min) after HFS protocols in the different layers (c, control). (D) Reconstitution of the voltage responses from membrane parameters. Global voltage drive (black line), voltage drive considering the sole contribution of excitation (dark grey line), and voltage drive considering the sole contribution of inhibition (light grey line) before and 15 min after application of HFS in layers 2–3. Note that the voltage drive was unchanged after the HFS protocol. $***P < 0.001$, $**P < 0.01$, $*P < 0.05$.

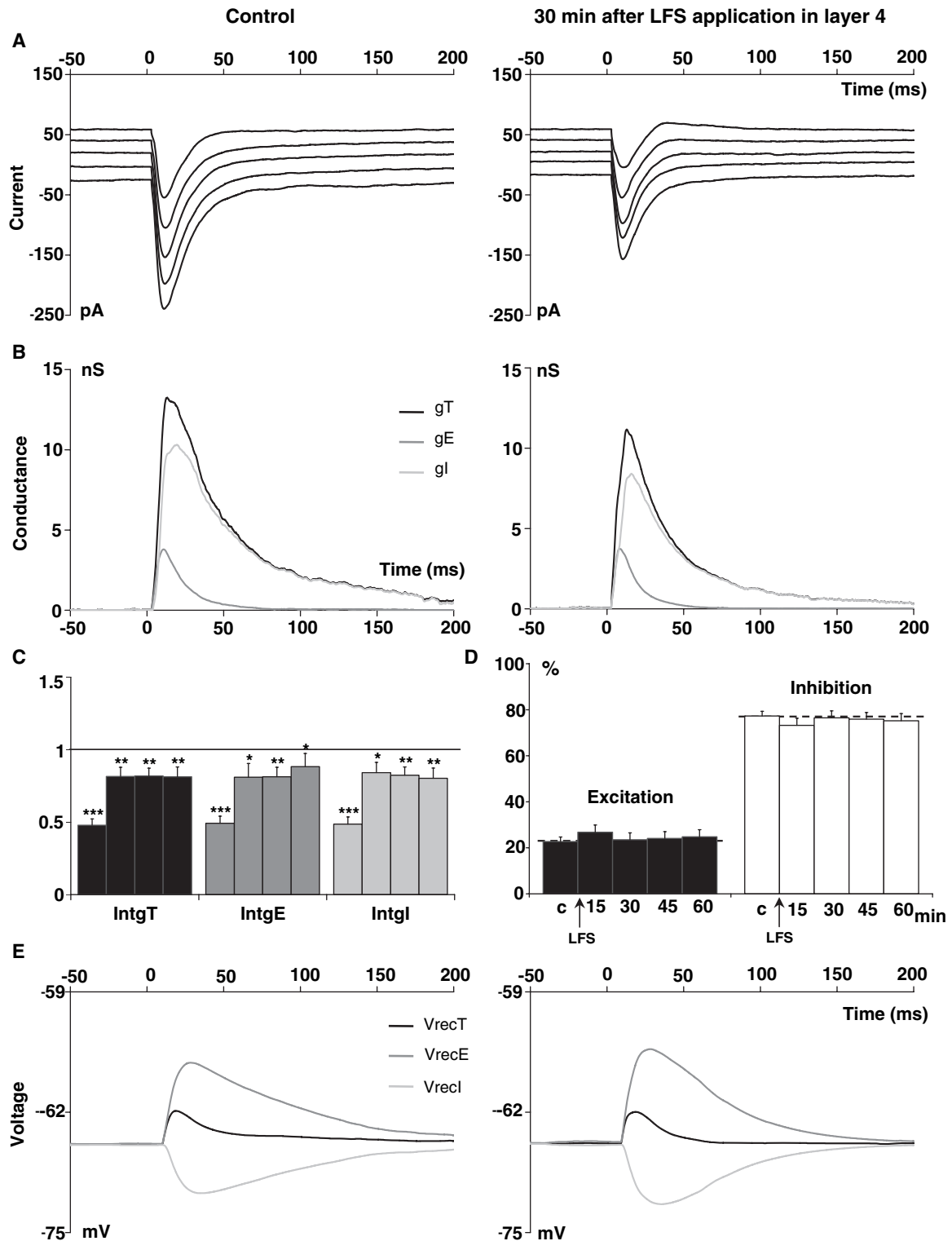


FIG. 3. Effects of LFS protocols in layer 4. (A) Representative whole-cell current recordings before and 30 min after application of LFS in layer 4. Holding potentials were scaled from -85 mV (bottom trace) to -65 mV (top trace), in 5 -mV steps. (B) Decomposition of the total conductance change in the response (black) into its excitatory (dark grey) and inhibitory (light grey) components before and after the LFS protocol. (C) Relative changes (compared to control) of intgT (black bars), intgE (dark grey bars) and intgI (light grey bars), various times (15, 30, 45 and 60 min) after application of LFS ($n = 23$). The excitatory conductance was decreased by $18 \pm 6\%$ and the inhibitory conductance by $17 \pm 5\%$. (D) Relative contribution of excitation (black) and inhibition (white) conductances to the total conductance change, various times (15, 30, 45 and 60 min) after the LFS protocol in layer 4 (c, control). (E) Reconstitution of the voltage responses from membrane parameters before and after LFS protocols: global voltage drive (black line), voltage drive considering the sole contribution of excitation (dark grey line), and voltage drive considering the sole contribution of inhibition (light grey line). Note that the voltage drive was unchanged after LFS. $***P < 0.001$, $**P < 0.01$, $*P < 0.05$.

control value of 0.72 ± 0.03 to 0.62 ± 0.04 after 60 min) but was unchanged after HFS in layer 4 (0.69 ± 0.04). These significant ($P < 0.05$) decreases in the M factor indicate an increase in the shunting inhibition. This may be due to an enhancement of shunting GABA_A inhibition at a somatodendritic level after HFS protocols in layers 2–3 or 6. In contrast, HFS protocols in layer 4 did not seem to have a marked effect on tonic GABA_A inhibition. We conclude that, according to the stimulated layer, potentiating effects of the excitatory inputs due to HFS is significantly balanced by the potentiation of hyperpolarizing inhibitory inputs and/or by shunting inhibition.

In order to induce synaptic depressions in stimulated neuronal circuits, a 15 min stimulation at 1 Hz (LFS protocol) in layers 2–3 ($n = 17$), 4 ($n = 23$) or 6 ($n = 22$) was used. Representative results of LFS in layer 4 are shown in Fig. 3. They involved a decrease in both current amplitudes (Fig. 3A) and conductance changes (Fig. 3B). The large decrease (by 50%) of the conductance following 15 min recordings was not considered for analysing the results because it corresponds to the end of the stimulation. The integral of excitatory conductance was significantly decreased, by $18 \pm 6\%$, and the integral of inhibitory conductance by $17 \pm 5\%$; these effects were sustained following LFS protocols (Fig. 3C). However, the integrals of excitation and inhibition conductance changes, expressed as percentages of that of global conductance change, were not significantly modified (Fig. 3D). This indicates that the E-I ratio was not affected by LFS in layer 4. Reconstituted voltage recordings for layer 4 stimulation revealed no significant modification in the responses after LFS protocols (Fig. 3E). However, the M factor was increased (from 0.66 ± 0.04 for control to 0.71 ± 0.03 after 60 min). This significant ($P < 0.01$) increase indicates a lower effect of shunting inhibition than under control conditions.

Interestingly, LFS of layers 2–3 or 6 induced a significant decrease in the integral of excitation conductance change whereas that corresponding to inhibition was slightly enhanced (Fig. 4A). Significant ($P < 0.05$) decreases in the ratio of excitation to total conductance changes were observed for stimulation of layers 2–3 (by $24 \pm 9\%$) and for stimulation of layer 6 (by $22 \pm 8\%$), as expected with the LFS protocol. However, inhibition was significantly ($P < 0.05$) increased, by 8 ± 2 and $7 \pm 2\%$, respectively (Fig. 4B). These unexpected results indicate a decrease in the E-I ratio which was further confirmed by the statistical analysis of linear regressions of the relationships between intgE and intgI . It is worth noting that after various times (30–60 min) following LFS in layer 4, linear regressions were well fitted in the 95% confidence interval of the control, indicating no effect on the E-I ratio (Fig. 4, C1). In contrast, linear regressions did not lie within the 95% confidence interval of the control after LFS in layers 2–3 (Fig. 4, C2) or in layer 6 (Fig. 4, C3). These modifications of the E-I ratio led to a marked decrease in the depolarizing phase of the reconstituted voltage response, as illustrated

in Fig. 4D and E. In this case, the M factor was not significantly modified after the LFS protocol in layer 6 (0.78 ± 0.03 for control and 0.77 ± 0.03 after 60 min) and a similar observation was made for LFS protocols in layers 2–3. This indicates that application of LFS in layers 2–3 or 6 modified the ratio between excitation and hyperpolarizing inhibition without significantly changing shunting GABA_A inhibition in the layer 5 pyramidal neuron.

We conclude that changes in the E-I balance appear to be linked to the specific organization of various cortical layers (see Xiang *et al.*, 2002) to involve feedback and feedforward connections between pyramidal neurons and inhibitory interneurons. The opposite effects observed on the shunting inhibition when layers 2–3 or 6 and layer 4 were stimulated are in favour of a particular mode of activation of shunting GABA_A inhibition which clearly appears to be at least frequency-dependent.

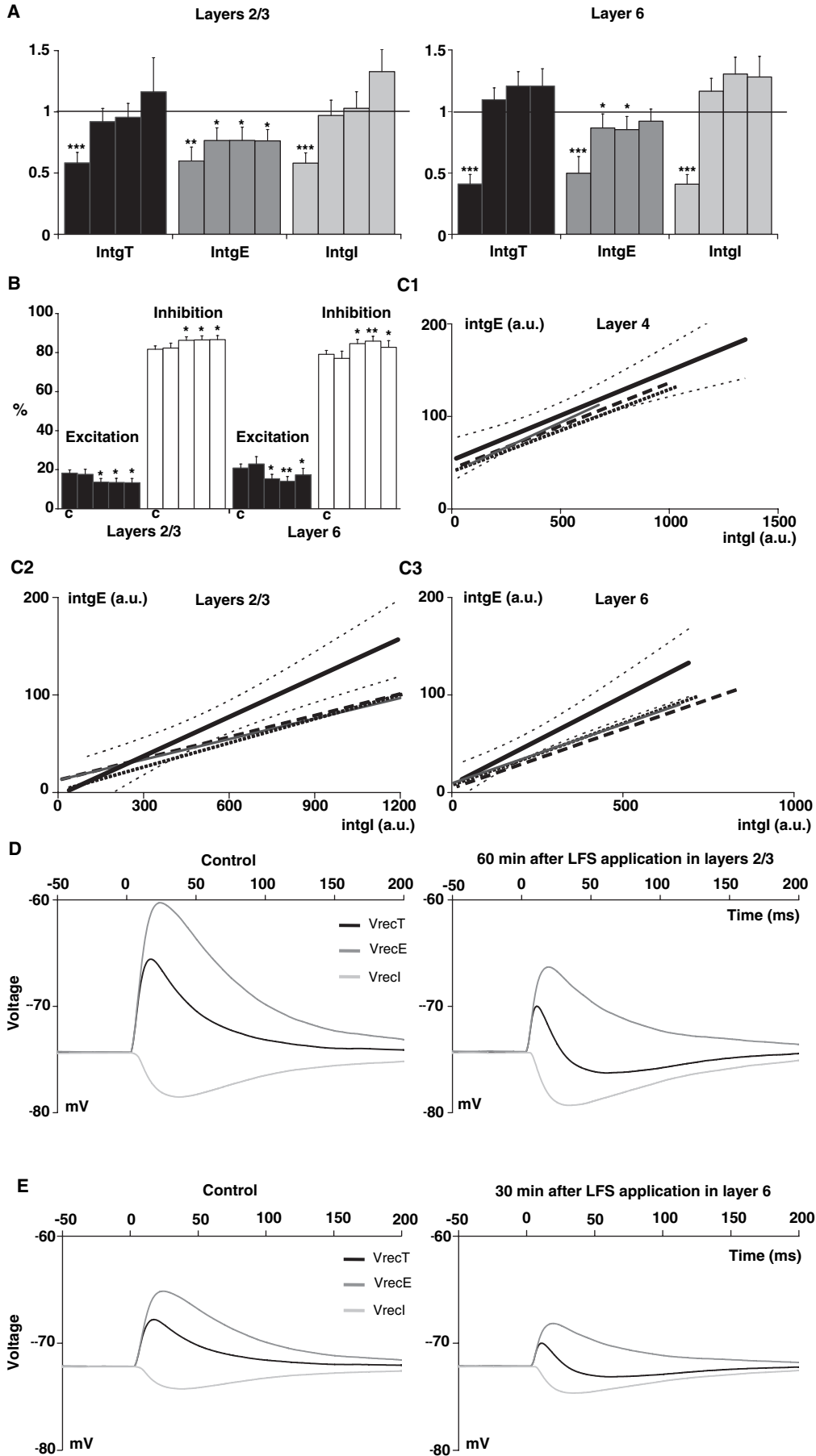
Discussion

A homeostatic regulation of the E-I balance has been proposed as preserving the structure and the function of neuronal networks (Maffei *et al.*, 2004). Our study clearly shows that, in cortical networks, the E-I balance measured at the somatic level of a pyramidal neuron of layer 5 is not dependent on the stimulated layer, and is characterized by an excitatory component accounting for 20% of the global conductance change and by an inhibitory component accounting for 80%. This balance is not markedly modified by protocols of stimulation that change the synaptic strength (such as HFS whichever layer was stimulated or LFS protocols in layer 4). It can be also disrupted by some protocols (as we have seen for application of LFS in layers 2–3 or 6).

Estimation of the relative contributions of excitation and inhibition to the global conductance change is based on a method of conductance calculation in which it is assumed that neurons are linear isopotential neurons. According to Wehr & Zador (2003), the deviation of the actual membrane from these assumptions results in an underestimate of conductance magnitudes that is greater for inhibitory than excitatory inputs. Saturation and synaptic current attenuation also reduce the effective excitatory and inhibitory conductances seen from the soma. Indeed, these factors do not represent solely errors of estimation but reflect functional consequences of somatodendritic integration (Wehr & Zador, 2003). It is precisely the result of integration which appeared in the reconstituted voltage response in our work.

Comparing effects of the stimulation of different layers on the response recorded in layer 5 pyramidal neurons shows the following. (i) Whichever layer is stimulated, excitation occurs before inhibition but the TESP of the response is shorter for layer 4 or 6 stimulation

FIG. 4. Effects of LFS protocols in layers 2–3 or 6. (A) Relative changes (compared to control) of intgT (black bars), intgE (dark grey bars) and intgI (light grey bars), various times (15, 30, 45 and 60 min) after application of LFS in layers 2–3 ($n = 17$) or in layer 6 ($n = 22$). (B) Relative contribution of excitation (black) and inhibition (white) conductances to the total conductance change, various times after LFS protocols in layers 2–3 or 6 (c, control). (C) Relationships between intgE and intgI . (C1) The linear regression (thick black line) and its 95% confidence interval is represented for the control condition (slope of regression was 0.0964). Slope of linear regressions 30 min (thin black line), 45 min (dashed line) and 60 min (dotted line) after application of the LFS protocol in layer 4 were 0.1082, 0.0923 and 0.0893, respectively. Note that these linear regressions lie within the 95% confidence interval of the control. (C2) Linear regressions of intgE as a function of intgI for control conditions (thick black line, slope = 0.2025) with its 95% confidence interval, and 30 min (thin black line, slope = 0.1809), 45 min (dashed line, slope = 0.1782) and 60 min (dotted line, slope = 0.1871) after stimulation with the LFS protocol in layers 2–3. (C3) Linear regressions of intgE as a function of intgI for control conditions (thick black line, slope = 0.1793) with its 95% confidence interval, and 30 min (thin black line, slope = 0.1244), 45 min (dashed line, slope = 0.1197) and 60 min (thick black line, slope = 0.1268) after stimulation with the LFS protocol in layer 6. Note (C2 and C3) that linear regressions do not lie within the 95% confidence interval of the control following LFS protocols in layers 2–3 or 6. (D) Reconstitution of the voltage responses from membrane parameters before and after an LFS protocol applied to layers 2–3: global voltage drive (black line), voltage drive considering the sole contribution of excitation (dark grey line), and voltage drive considering the sole contribution of inhibition (light grey line). Note that a marked decrease in the depolarizing phase of the response was observed after the LFS protocol. (E) Reconstitution of the voltage responses from membrane parameters before and after the LFS protocol in layer 6 (identical meaning of shades of grey as in D). Note that a marked decrease in the depolarizing phase of the response was observed after the LFS protocol.



than for layers 2–3 stimulation. Although this observation might be linked to the distance of the stimulating electrode (more or less distant from the recorded pyramidal neuron), it also indicates some difference in the composition of stimulated networks. (ii) Shunting inhibition evoked by stimulation of layers 2–3 or 4 is identical. This may be due to the recruitment of GABA receptors localized on the apical dendrite (Xiang *et al.*, 2002; Monier *et al.*, 2003) of the recorded neuron because it has been proposed that these receptors are responsible for shunting inhibition (Staley & Mody, 1992) whereas stimulation of layer 6 recruits mainly GABA receptors on the soma. (iii) The results obtained after application of HFS or LFS protocols in layer 4 were different from those obtained by stimulations of layers 2–3 or 6. HFS protocols induced a weaker potentiation of the inputs for layer 4 stimulation than for stimulation of layers 2–3 or 6, whereas LFS protocol application disrupted the E-I balance for stimulation of layers 2–3 or 6, in contrast to layer 4.

These observations support an activation of different networks which can differ in their composition of excitatory and inhibitory neurons and their properties of signal modulation (Gibson *et al.*, 1999) although we cannot rule out upstream modulations by other neuromodulators, depending on the location of stimulating electrodes. However, it is surprising that the stimulation of different layers induces responses in the layer 5 pyramidal neurons which are characterized with our experimental procedure by a large proportion (80%) of inhibitory inputs, although the majority of cortical neurons are excitatory neurons (Peters & Kara, 1985a; Somogyi *et al.*, 1998). Indeed, the cortical organization of excitatory and inhibitory neurons in networks creates specialized subpopulations of neurons (Yoshimura & Callaway, 2005). We have seen that excitation is always first recruited. This is physiologically achieved by inputs from the thalamus or from the cortex itself which activate excitatory networks leading to a secondary activation of inhibitory networks (Maffei *et al.*, 2004). Our results clearly show a main controlling function of inhibitory inputs on the probability of evoked action potential occurrence in the layer 5 pyramidal neurons. Inhibitory neurons compose a heterogeneous population of neurons with 12 described types (Gupta *et al.*, 2000) exhibiting various morphologies and functional properties (Cherubini & Conti, 2001), contrary to the excitatory pyramidal neurons which appear to form a homogeneous cell population. Studies in the neocortex have supported the idea that these different inhibitory networks could partly result from the electrical coupling (Hestrin & Galarreta, 2005) between similar types of local-circuit interneurons (Galarreta & Hestrin, 1999; Beierlein *et al.*, 2000) via gap junctions to the exclusion of other types of inhibitory neuron (Gibson *et al.*, 1999). The difference in the diversity of inhibitory populations recruited as a function of the stimulated layers in the cortex might explain the relative role of shunting inhibition in our experiments. Using recordings of layer 5 pyramidal neurons, it has been shown that low-threshold spike (LTS) interneurons of rat visual cortex layer 5 have numerous synapses on the apical dendrite which render them responsible for a strong shunting inhibition (Tamás *et al.*, 2000; Xiang *et al.*, 2002). Fast-spiking (FS) interneurons contact mainly the soma and the proximal dendrites of layer 5 pyramidal neurons to directly modulate the excitability through hyperpolarization or shunting inhibition but to a lesser extent than LTS neurons (Xiang *et al.*, 2002). These data are in accordance with our experiments showing that shunting inhibition is more efficient when the stimulation is applied in layers 2–3 (which can recruit the majority of LTS interneurons) compared to layer 6 stimulation (which can recruit FS interneurons). Despite this heterogeneity in cortical networks, we observed an outstanding stability of the E-I ratio whichever the stimulated layer (2–3, 4 or 6) was.

Synaptic plasticity not only is a mechanism inducing learning and memory but also plays an important role in information processing and the control of excitability (Destexhe & Marder, 2004). In our study, application of HFS protocols was associated with a potentiation of excitatory inputs and a direct or an indirect potentiation of inhibition whichever layer was stimulated. Numerous studies have been carried out on long-term facilitation of glutamatergic transmission (Daw *et al.*, 2004) but much less is known about the gain control mechanisms and the plasticity of GABAergic transmission at inhibitory synapses. Indeed, a few studies report a direct potentiation of inhibitory synapses (Komatsu, 1996; Saitow *et al.*, 2005), but it seems more probable that an indirect disinaptic potentiation can occur in our system because it has been observed that, in layers 2–3, disinaptic activation (via a glutamatergic synapse) of inhibitory interneurons represents 90% of inhibition. HFS protocols enhance excitatory and inhibitory inputs on the layer 5 pyramidal neuron. It is obvious that we cannot localize facilitated synapses in the stimulated networks by HFS protocols, but what is important is the absence of significant variation in the E-I ratio otherwise illustrated by no change in the reconstituted voltage drive. A similar result was obtained for the LFS protocol applied in layer 4 with a depression of excitatory and inhibitory inputs but no change in the voltage drive of the response. Paralleled changes in excitatory and inhibitory inputs on the layer 5 pyramidal neuron avoid a significant modification of the E-I balance although these changes are probably due to remodelling of excitatory and inhibitory circuits after application of HFS or LFS protocols. One site of remodelling might be a change in the clustering of GABA_A receptors leading to a modulation of shunting inhibition (Pettrini *et al.*, 2004). Another possibility would be that gap junctions between GABAergic interneurons would be differently regulated by activity-dependent processes. Remodelling of the circuits may involve feedback projections of layer 5 pyramidal neurons on inhibitory circuits and feedforward connections with other pyramidal neurons (Bannister, 2005; Silberberg *et al.*, 2005).

The sensitivity of excitatory and inhibitory synapses to different frequencies of stimulation appears to be critical. Moreover, the heterogeneity of inhibitory interneurons in the cerebral cortex suggests that each type of cell has different biophysical properties (Gupta *et al.*, 2000; Markram *et al.*, 2004) as illustrated by FS interneurons which discharge strongly in relation to higher frequency stimulation (Hasenstaub *et al.*, 2005). In the cerebral cortex, the frequency of neuronal discharges peaks at 20 and 60 Hz; these frequencies characterize β and γ rhythms, respectively (Wespatat *et al.*, 2004). However, each neuronal type may have its own pattern of discharge as observed for pyramidal cells firing at rates ranging from 5 to 20 Hz (Steriade *et al.*, 1978). The β and γ rhythms serve for attention, in short- as well as in long-term memory (Wespatat *et al.*, 2004), and frequencies <15 Hz would be involved in memory consolidation (Crochet *et al.*, 2005). Although it has been proposed that a high level of discharge in the cortical network ensures better stability of connectivity within the cortical circuitry (Crochet *et al.*, 2005), high frequencies of discharge due to a misregulated balance of E-I (inhibition failure) may lead to epilepsy (Fritschy & Brünig, 2003). In consequence, the E-I balance must be strictly controlled in order to avoid unwanted racing out of the system but must allow some plasticity. We show that HFS protocols using high-frequency pulses (100 Hz) are able to induce potentiation of both excitatory and inhibitory inputs on layer 5 pyramidal neurons; nevertheless, a homeostatic regulation takes place to prevent change in the E-I ratio. In a range of stimulations <15 Hz (a frequency used in our LFS protocol) a disruption of the homeostatic control of excitation and inhibition was observed, thus leading to a change in the excitability of

the pyramidal neuron (a marked decrease in the depolarizing phase of the response is observed).

Homeostatic regulation mainly involves dynamic adjustment of excitatory and inhibitory circuits (Rutherford *et al.*, 1998; Kilman *et al.*, 2002; Turrigiano & Nelson, 2004). A factor that controls the gain of the pyramidal neuron is its ability to sense and adapt its excitability level by feedback projections, allowing the selective recruitment of inhibitory inputs which ensure a graded activation of shunting GABA_A inhibition.

We propose that the regulation of the E-I balance is sustained not only by the homeostatic plasticity process due to reciprocal interactions between excitatory and inhibitory circuits but also by modulation of dendritic integration properties of the pyramidal neuron; these properties are thus another major factor in keeping cortical networks within their functional range.

Supplementary material

The following supplementary material may be found on www.blackwell-synergy.com

Appendix. S1. Supplementary information about methods

Acknowledgements

The authors are indebted to Dr E. Cherubini for critical reading of the manuscript. They thank Dr E. Benoît and Dr S. O'Regan for improving the manuscript.

Abbreviations

E-I, excitation–inhibition; GABA, gamma amino butyric acid; HFS, high-frequency stimulation; intgE, excitatory conductance integral; intgI, inhibitory conductance integral; intgT, total conductance integral; LFS, low-frequency stimulation; LTD, long-term depression; LTP, long-term potentiation; Rs, access resistance; TESP, time elapsed from the beginning of the stimulation to the peak.

References

- Abraham, W.C. & Huggett, A. (1997) Induction and reversal of long-term potentiation by repeated high-frequency stimulation in rat hippocampal slices. *Hippocampus*, **7**, 137–145.
- Anderson, J.S., Carandini, M. & Ferster, D. (2000) Orientation tuning of input conductance, excitation, and inhibition in cat primary visual cortex. *J. Neurophysiol.*, **84**, 909–926.
- Bai, D., Zhu, G., Pennefather, P., Jackson, M.F., Macdonald, J.F. & Orser, B.A. (2001) Distinct functional and pharmacological properties of tonic and quantal inhibitory postsynaptic currents mediated by gamma-aminobutyric acid (A) receptors in hippocampal neurons. *Mol. Pharmacol.*, **59**, 814–824.
- Bannister, A.P. (2005) Inter- and intra-laminar connections of pyramidal cells in the neocortex. *Neurosci. Res.*, **53**, 95–103.
- Beierlein, M., Gibson, J.R. & Connors, B.W. (2000) A network of electrically coupled interneurons drives synchronized inhibition in neocortex. *Nat. Neurosci.*, **3**, 904–910.
- Bennett, M.V. (1997) Gap junctions as electrical synapses. *J. Neurocytol.*, **26**, 349–366.
- Bliss, T.V. & Gardner-Medwin, A.R. (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol. (Lond.)*, **232**, 357–374.
- Borg-Graham, L.J. (2001) The computation of directional selectivity in the retina occurs presynaptic to the ganglion cell. *Nat. Neurosci.*, **4**, 176–183.
- Borg-Graham, L.J., Monier, C. & Frégnac, Y. (1998) Visual input evokes transient and strong shunting inhibition in visual cortical neurons. *Nature*, **393**, 369–373.
- Buckley, L.E., Jensen, T.P., Smith, P.J. & Empson, R.M. (2006) Network stability through homeostatic scaling of excitatory and inhibitory synapses following inactivity in CA3 of rat organotypic hippocampal slice cultures. *Mol. Cell. Neurosci.*, **31**, 805–816.
- Buzsáki, G. & Chrobak, J.J. (1995) Temporal structure in spatially organized neuronal ensembles: a role for interneuronal networks. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **5**, 504–510.
- Cherubini, E. & Conti, F. (2001) Generating diversity at GABAergic synapses. *Trends Neurosci.*, **24**, 155–162.
- Compte, A., Sanchez-Vives, M.V., McCormick, D.A. & Wang, X.J. (2003) Cellular and network mechanisms of slow oscillatory activity (< 1 Hz) in a cortical network model. *J. Neurophysiol.*, **89**, 2707–2725.
- Crochet, S., Fuentealba, P., Cisse, Y., Timofeev, I. & Steriade, M. (2005) Synaptic plasticity in local cortical network in vivo and its modulation by the level of neuronal activity. *Cereb. Cortex*, **5**, 618–631.
- Daniel, H., Levenes, C. & Crepel, F. (1998) Cellular mechanisms of cerebellar LTD. *Trends Neurosci.*, **21**, 401–407.
- Davis, G.W. & Bezprozvanny, I. (2001) Maintaining the stability of neural function: a homeostatic hypothesis. *Annu. Rev. Physiol.*, **63**, 847–869.
- Daw, N., Rao, Y., Wang, X.F., Fischer, O. & Yang, Y. (2004) LTP and LTD vary with layer in rodent visual cortex. *Vision Res.*, **44**, 3377–3380.
- Destexhe, A. & Marder, E. (2004) Plasticity in single neuron and circuit computations. *Nature*, **431**, 789–795.
- Dudek, S.M. & Bear, M.F. (1992) Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **89**, 4363–4367.
- Durstewitz, D., Seamans, J.K. & Sejnowski, T.J. (2000) Neurocomputational models of working memory. *Nat. Neurosci.*, **3**, 1184–1191.
- Fritschy, J.M. & Brünig, I. (2003) Formation and plasticity of GABAergic synapses: physiological mechanisms and pathophysiological implications. *Pharmacol. Ther.*, **98**, 299–323.
- Galarreta, M. & Hestrin, S. (1998) Frequency-dependent synaptic depression and the balance of excitation and inhibition in the neocortex. *Nat. Neurosci.*, **1**, 587–594.
- Galarreta, M. & Hestrin, S.A. (1999) Network of fast-spiking cells in the neocortex connected by electrical synapses. *Nature*, **402**, 72–75.
- Gibson, J.R., Beierlein, M. & Connors, B.W. (1999) Two networks of electrically coupled inhibitory neurons in neocortex. *Nature*, **402**, 75–79.
- Gupta, A., Wang, Y. & Markram, H. (2000) Organizing principles for a diversity of GABAergic interneurons and synapses in the neocortex. *Science*, **287**, 273–278.
- Haider, B., Duque, A., Hasenstaub, A.R. & McCormick, D.A. (2006) Neocortical network activity in vivo is generated through a dynamic balance of excitation and inhibition. *J. Neurosci.*, **17**, 4535–4545.
- Hasenstaub, A., Shu, Y., Haider, B., Kraushaar, U., Duque, A. & McCormick, D.A. (2005) Inhibitory postsynaptic potentials carry synchronized frequency information in active cortical networks. *Neuron*, **47**, 423–435.
- Hestrin, S. & Galarreta, M. (2005) Electrical synapses define networks of neocortical GABAergic neurons. *Trends Neurosci.*, **28**, 304–309.
- Higley, M.J. & Contreras, D. (2006) Balanced excitation and inhibition determine spike timing during frequency adaptation. *J. Neurosci.*, **26**, 448–457.
- Kilman, V., van Rossum, M.C.W. & Turrigiano, G.G. (2002) Activity deprivation reduces miniature IPSC amplitude by decreasing the number of postsynaptic GABA (A) receptors clustered at neocortical synapses. *J. Neurosci.*, **22**, 1328–1337.
- Koch, C., Douglas, R. & Wehmeier, U. (1990) Visibility of synaptically induced conductance changes: theory and simulations of anatomically characterized cortical pyramidal cells. *J. Neurosci.*, **10**, 1728–1744.
- Komatsu, Y. (1996) GABA_B receptors, monoamine receptors, and postsynaptic inositol triphosphate-induced Ca²⁺ release are involved in the induction of long-term potentiation at visual cortical inhibitory synapses. *J. Neurosci.*, **16**, 6342–6352.
- Kullmann, D.M., Ruiz, A., Rusakov, D.M., Scott, R., Semyanov, A. & Walker, M.C. (2005) Presynaptic, extrasynaptic and axonal GABA_A receptors in the CNS: where and why? *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **87**, 33–46.
- Liu, G. (2004) Local structural balance and functional interaction of excitatory and inhibitory synapses in hippocampal dendrites. *Nat. Neurosci.*, **7**, 373–379.
- Maffei, A., Nelson, S.B. & Turrigiano, G.G. (2004) Selective configuration of layer 4 visual cortical circuitry by visual deprivation. *Nat. Neurosci.*, **7**, 1353–1359.
- Markram, H., Toledo-Rodriguez, M., Wang, Y., Gupta, A., Silberberg, G. & Wu, C. (2004) Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat. Rev. Neurosci.*, **5**, 793–807.
- Martin, K.A. (2002) Microcircuits in visual cortex. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **12**, 418–425.
- Miller, K.D. (1996) Synaptic economics: competition and cooperation in synaptic plasticity. *Neuron*, **17**, 371–374.

- Mitchell, S.J. & Silver, R.A. (2003) Shunting inhibition modulates neuronal gain during synaptic excitation. *Neuron*, **38**, 433–445.
- Mody, I. (2005) Aspects of the homeostatic plasticity of GABA_A receptor-mediated inhibition. *J. Physiol. (Lond.)*, **562**, 37–46.
- Monier, C., Chavane, F., Baudot, P., Graham, L.J. & Frégnac, Y. (2003) Orientation and direction selectivity of synaptic inputs in visual cortical neurons: a diversity of combinations produces spike tuning. *Neuron*, **37**, 663–680.
- Peters, A. & Kara, D.A. (1985a) The neuronal composition of area 17 of rat visual cortex. I. The pyramidal cells. *J. Comp. Neurol.*, **234**, 218–241.
- Peters, A. & Kara, D.A. (1985b) The neuronal composition of area 17 of rat visual cortex. II. The nonpyramidal cells. *J. Comp. Neurol.*, **234**, 242–263.
- Petrini, E.M., Marchionni, I., Zacchi, P., Sieghart, W. & Cherubini, E. (2004) Clustering of extrasynaptic GABA (A) receptors modulates tonic inhibition in cultured hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.*, **279**, 45833–45843.
- Rutherford, L.C., DeWan, A., Lauer, H.M. & Turrigiano, G.G. (1998) BDNF has opposite effects on the quantal amplitude of pyramidal neuron and interneuron excitatory synapses. *Neuron*, **21**, 521–530.
- Saitow, F., Suzuki, H. & Konishi, S. (2005) Beta-Adrenoceptor-mediated long-term up-regulation of the release machinery at rat cerebellar GABAergic synapses. *J. Physiol. (Lond.)*, **565**, 487–502.
- Shu, Y., Hasenstaub, A. & McCormick, D.A. (2003) Turning on and off recurrent balanced cortical activity. *Nature*, **423**, 288–293.
- Silberberg, G., Grillner, S., LeBeau, F.E.N., Maex, R. & Markram, H. (2005) Synaptic pathways in neuronal microcircuits. *Trends Neurosci.*, **28**, 541–551.
- Sincich, L.C. & Horton, J.C. (2005) The circuitry of V1 and V2: integration of color, form, and motion. *Annu. Rev. Neurosci.*, **28**, 303–328.
- Somogyi, P., Tamás, G., Lujan, R. & Buhl, E.H. (1998) Salient features of synaptic organisation in the cerebral cortex. *Brain Res. Brain Res. Rev.*, **26**, 113–135.
- Staley, K.J. & Mody, I. (1992) Shunting of excitatory input to dentate gyrus granule cells by a depolarizing GABA_A receptor-mediated postsynaptic conductance. *J. Neurophysiol.*, **68**, 197–212.
- Steriade, M., Oakson, G. & Kitsikis, A. (1978) Firing rates and patterns of output and nonoutput cells in cortical areas 5 and 7 of cat during the sleep-waking cycle. *Exp. Neurol.*, **60**, 443–468.
- Tamás, G., Eberhard, H.B., Lörincz, A. & Somogyi, P. (2000) Proximally targeted GABAergic synapses and gap junctions synchronize cortical interneurons. *Nat. Neurosci.*, **3**, 366–371.
- Thomson, A.M., West, D.C., Wang, Y. & Bannister, A.P. (2002) Synaptic connections and small circuits involving excitatory and inhibitory neurons in layers 2–5 of adult rat and cat neocortex: triple intracellular recordings and biocytin labelling in vitro. *Cereb. Cortex*, **12**, 936–953.
- Turrigiano, G.G. (1999) Homeostatic plasticity in neuronal networks: the more things change, the more they stay the same. *Trends Neurosci.*, **22**, 221–227.
- Turrigiano, G.G. & Nelson, S.B. (2004) Homeostatic plasticity in the developing nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.*, **5**, 97–107.
- Wehr, M. & Zador, A.M. (2003) Balanced inhibition underlies tuning and sharpens spike timing in auditory cortex. *Nature*, **426**, 442–446.
- Wespapat, V., Tegnigkeit, F. & Singer, W. (2004) Phase sensitivity of synaptic modifications in oscillating cells of rat visual cortex. *J. Neurosci.*, **24**, 9067–9075.
- Xiang, Z., Huguenard, J.R. & Prince, D.A. (2002) Synaptic inhibition of pyramidal cells evoked by different interneuronal subtypes in layer V of rat visual cortex. *J. Neurophysiol.*, **2**, 740–750.
- Yoshimura, Y. & Callaway, E.M. (2005) Fine-scale specificity of cortical networks depends on inhibitory cell type and connectivity. *Nat. Neurosci.*, **8**, 1552–1559.

C) Conclusions

Notre étude permet pour la première fois de déterminer la balance entre les entrées excitatrices et inhibitrices perçues par un neurone en conservant les interactions existantes entre les deux populations neuronales. Nous avons ainsi observé que, pour la stimulation de couches corticales différentes 2/3, 4 ou 6 et par conséquent le recrutement de différents réseaux neuronaux, la balance E/I est dans tous les cas composée de 20 % d'excitation et de 80 % d'inhibition. La stabilité de la balance E/I des neurones pyramidaux de couche 5 tend à prouver que le niveau d'excitabilité des neurones pyramidaux corticaux est strictement régulé.

Afin de déterminer les mécanismes à l'origine de cette régulation, nous avons également montré que des stimulations répétitives à haute ou basse fréquence sont capables d'induire des formes de plasticité à long terme des signaux excitateurs et inhibiteurs dans les réseaux neuronaux stimulés.

L'application d'un protocole de stimulation à haute fréquence en couche 2/3, 4 ou 6 entraîne une potentiation à long terme des conductances excitatrices et aussi des conductances inhibitrices reçues par le neurone pyramidal. Une augmentation de l'inhibition shuntante est aussi enregistrée. En définitive, l'application de ce protocole de stimulation à haute fréquence en couche 2/3, 4 ou 6 n'induit pas de modification de la balance E/I. Ces expériences mettent en évidence une forme de potentiation homéostatique des afférences excitatrices et inhibitrices reçues par un neurone pyramidal.

L'application d'un protocole de stimulation à basse fréquence en couche 4 entraîne une dépression à long terme des conductances excitatrices et inhibitrices du neurone pyramidal. Dans ces conditions en plus d'une diminution réciproque du niveau d'excitation et d'inhibition, une diminution de l'inhibition shuntante est observée ce qui aboutit à un rapport E/I inchangé. Cette expérience met en évidence le phénomène de dépression homéostatique des afférences excitatrices et inhibitrices sur les neurones pyramidaux.

Toutefois, l'application d'un protocole de stimulations répétitives à basse fréquence en couche 2/3 ou 6 induit une dépression de l'excitation sans modification significative de la composante inhibitrice et de l'inhibition shuntante. Par conséquent, dans ces conditions la balance E/I est diminuée, le contrôle homéostatique n'a pas lieu.

Ces résultats montrent que la balance E/I est strictement régulée par des phénomènes réciproques de potentiation ou de dépression à long terme de l'excitation et de l'inhibition. Nous avons toujours pu corrélérer l'activation du contrôle homéostatique avec des changements de l'inhibition shuntante, ce qui tend à prouver que les connexions inhibitrices peuvent également contrôler la balance E/I des neurones pyramidaux en modifiant les processus d'intégration dendritique.

II. Etude de l'implication du système inhibiteur GABAergique dans le contrôle homéostatique de la balance excitation/inhibition des neurones pyramidaux de couche 5.

A) Position du problème

Au niveau cortical, les cellules glutamatergiques représentent 80 % de la population neuronale et les cellules GABAergiques 20 %. Malgré cette faible proportion d'interneurones, nos résultats montrent que l'inhibition représente 80 % de la réponse enregistrée au niveau d'un neurone pyramidal de couche 5 suite à une stimulation électrique en couche 2/3, 4 ou 6, ce qui souligne l'importance du système GABAergique dans la régulation de l'activité des réseaux neuronaux.

La population des interneurones GABAergiques est très hétérogène, de nombreux types d'interneurones sont organisés en réseaux spécifiques avec des propriétés morphologiques, biochimiques ou des fréquences d'activation différentes (Peters & Kara, 1985a, 1985b ; Markram et al., 2004 ; Hasenstaub et al., 2005). De plus, les interneurones innervent leurs cellules cibles de manière spécifique, au niveau de domaines membranaires spécialisés comme le segment initial de l'axone, le soma, les dendrites distales ou proximales, ce qui leur confère différentes propriétés fonctionnelles dans l'intégration des signaux et le contrôle de l'excitabilité des neurones pyramidaux (DeFelipe, 1997 ; Somogyi et al., 1998 ; Gupta et al., 2000 ; Markram et al., 2004). Il a par exemple été montré que certains interneurones peuvent modifier l'intégration dendritique des signaux au niveau de la partie proximale de la dendrite apicale en renforçant un type d'inhibition particulier, l'inhibition shuntante (Xiang et al., 2002). Au niveau des neurones pyramidaux du cortex, l'inhibition shuntante est reliée à l'activation de récepteurs extrasynaptiques GABA_A localisés au niveau proximal de la dendrite apicale (Gulyas et al., 1993 ; Cipolloni et al., 1998 ; Farrant & Nusser, 2005).

De manière plus générale, il apparaît que le système inhibiteur est un important mécanisme de contrôle de l'excitabilité neuronale. Une dérégulation du système inhibiteur peut par exemple, avoir de graves répercussions sur la régulation de l'activité corticale et serait à l'origine de phénomènes pathologiques tels que l'épilepsie (Mody, 1998 ; Nusser et al., 1998b).

L'objectif de cet article est de mieux appréhender l'implication du système GABAergique dans le contrôle homéostatique de l'activité corticale en enregistrant d'éventuels changements de la balance E/I des neurones pyramidaux de couche 5 en réponse à une stimulation en couche 2/3 suite à la sur-activation ou au blocage des récepteurs GABA_A. Cette approche a pour but de déterminer l'origine de la régulation GABAergique de l'activité, c'est-à-dire de savoir si elle résulte des interactions entre circuits neuronaux excitateurs et inhibiteurs et/ou si elle résulte d'une régulation des processus d'intégration dendritique du neurone pyramidal par l'inhibition shuntante.

B) Résultats

1. Implication des récepteurs GABA_A dans le contrôle homéostatique de la balance Excitation / Inhibition des neurones pyramidaux de couche 5 du cortex.

“Involvement of GABA_A receptors in the homeostatic control of the excitation / inhibition balance in cortical layer 5 pyramidal neurons”

LE ROUX Nicolas, AMAR Muriel, MOREAU Alexandre, BAUX Gérard et FOSSIER Philippe.

(Soumis à publication).

Abstract

In the cortex, inhibitory actions of GABA_A receptors occur according to hyperpolarizing or shunting mode. We previously showed that application of a high-frequency of stimulation (HFS) protocol in layer 2/3 causes parallel potentiation of excitatory and inhibitory inputs perceived by layer 5 pyramidal neurons, without changing the excitation/inhibition (E/I) balance. We proposed that this form of homeostatic plasticity is due to recurrent interactions between excitatory and inhibitory neurons and/or shunting inhibition.

In the presence of DNDS, an intracellular blocker of chloride channels, inside the pyramidal neuron, HFS application failed to potentiate inhibitory but also excitatory inputs. This indicates that upstream interactions between layer 5 pyramidal neurons and layer 2/3 neurons can regulate the strength of inputs. Over-activation of all GABA_A receptors of the network (with THIP) or their blockade (with gabazine) decreased shunting inhibition, prevented the long-term potentiation of excitatory and inhibitory inputs induced by a HFS protocol application, and led to a LTD-like (Long-Term Depression) effect. These results show that any deregulation of the GABAergic system leads to increase in the E/I balance and, consequently, to disrupt homeostatic plasticity.

Keywords: GABA_A receptors, homeostatic plasticity, shunting inhibition, cortical networks, LTP, excitability.

Introduction

Layer 5 pyramidal neurons in the cortex elaborate cortical output signals as a function of their level of excitability which is defined by the balance between excitatory and inhibitory inputs (Marder and Prinz, 2002). Normal cortical function requires a delicate balance between excitation and inhibition, and an imbalance was reported to underlie various pathologies such as epilepsy or schizophrenia (Cline et al., 2005). Inhibitory interneurons present a high degree of heterogeneity (Gupta et al., 2000; Markram et al., 2004) concerning their morphology, biochemical properties and electrophysiological profiles (DeFelipe, 1997; Kawaguchi and Kondo, 2002; Markram et al., 2004; Flames and Marin, 2005). They are organized in different networks according to cortical layers (Galarreta and Hestrin, 1998; Beierlein et al., 2000) and innervate their target cells on specialized membrane domains (axon initial segments, soma, proximal or distal dendrites) (DeFelipe, 1997; Somogyi et al., 1998; Markram et al., 2004). In the normal functioning brain, the regulation of inhibitory synaptic strength is important for the timing of the critical period (Freund and Gulyas, 1997; Zilberter, 2000), for the synchronization of neuronal activity (McBain and Fisahn, 2001; Freund, 2003; Tamas et al., 2000) and for learning and memory (Bradler and Barrionuevo, 1989; Steele and Maulk, 1999). In various pathological conditions including epilepsies, insomnia or substance abuse, it is crucial to determine some key cellular mechanisms underlying the inhibitory control of activity.

We previously showed that whatever the stimulated layer was (2/3, 4 or 6), the E/I balance was composed of 20 % excitation and 80 % inhibition (Le Roux et al., 2006). Moreover, we observed that application of a high frequency stimulation (HFS) protocol in layer 2/3 does not change the excitatory/inhibitory (E/I) ratio measured in layer 5 pyramidal neurons resulting from recurrent interactions between excitatory and inhibitory circuits, and also from shunting inhibition at the level of layer 5 pyramidal neurons.

The homeostatic control of the E/I balance may be due to recurrent changes in excitatory and inhibitory synaptic strength in the stimulated circuits. Inhibitory circuits of layer 2/3 make feed forward connections with layer 5 pyramidal neurons (Thomson et al., 1996; Callaway, 2002) involving both their apical and basal dendrites (Thomson and Bannister, 1998), but receive also feedback connections from layer 5 pyramidal neurons (Dantzker and Callaway, 2000). Such inhibitory circuits can provide exquisite control over network excitability. The homeostatic control of the E/I balance may also be due to changes in the level of shunting

inhibition. In cortical pyramidal neurons, shunting inhibition was proposed to mainly result from activation of extrasynaptic GABA_A receptors (Petrini et al., 2004; Mody, 2005), which opens a chloride permeability that operates as a shunt for excitatory glutamate-induced currents (Bai et al., 2001; Mody, 2005), due to the proximal localization of receptors on the apical dendrite (Gulyas et al., 1993; Cipolloni et al., 1998).

Our aim was to better characterize the GABAergic regulation of the E/I balance. We found in a cortical network that any deregulation of the GABAergic system, due to an over-activation or a blockade of GABA_A receptors, enhances the E/I balance. Moreover, it prevents normal plasticity processes induced by high frequencies of stimulation (usually used to induce Long-Term Potentiation) and leads to a depression of excitatory and inhibitory inputs on the layer 5 pyramidal neuron, a LTD-like (Long-Term Depression-like) effect ordinarily induced by a specific protocol of stimulation. These results provide evidence that the homeostatic control of the E/I balance depends on functional GABA_A receptors.

Materials and Methods

Slice preparation

Parasagittal slices containing primary visual cortex were obtained from 18 to 25-day-old Wistar rats. In accordance with the guidelines of the American Neuroscience Association, a rat was decapitated, and its brain quickly removed and placed in chilled (5°C) artificial cerebrospinal extracellular solution. Slices of 250 µm thickness were made from the primary visual cortex, using a vibratome and then incubated for at least 1 hr at 36°C in a solution containing (in mM) : 126 NaCl, 26 NaHCO₃, 10 Glucose, 2 CaCl₂, 1.5 KCl, 1.5 MgSO₄ and 1.25 KH₂PO₄ (pH 7.5, 310/330 mOsm). This solution was bubbled continuously with a mixture of 95 % O₂ and 5 % CO₂.

Electrophysiological recordings and cell identification

Slices were placed on the X-Y translation stage of a Zeiss microscope, equipped with a video-enhanced differential interference contrast system, and perfused continuously. The optical monitoring of the patched cell was achieved with standard optics using 40X long-working distance water immersion lens. Layer 5 pyramidal neurons, identified from the shape of their soma and primary dendrites and from their current-induced excitability pattern, were studied using the patch-clamp technique in whole-cell configuration. Somatic whole-cell recordings

were performed at room temperature using borosilicate glass pipettes (of 3-5 M Ω resistance in the bath) filled with a solution containing (in mM) : 140 K-gluconate, 10 HEPES, 4 ATP, 2 MgCl₂, 0.4 GTP, 0.5 EGTA (pH 7.3 adjusted with KOH, 270-290 mOsm).

Current-clamp and voltage-clamp recordings were performed using an Axopatch 1D (Axon Instruments, USA), filtered by a low-pass Bessel filter with a cut-off frequency set at 2 kHz, and digitally sampled at 4 kHz. The membrane potential was corrected off-line by about -10 mV to account for the junction potential. Estimation of the access resistance (R_s) is critical to quantitatively evaluate the relative change of input conductance in response to synaptic activation. After capacitance neutralisation, bridge balancing was done on-line under current-clamp conditions, which provided an initial estimate of R_s. The R_s value was checked and revised, as necessary off-line, by fitting the voltage response to a hyperpolarizing current pulse with the sum of two exponentials. Under voltage-clamp conditions, the holding potential was corrected off-line using this R_s value. Only cells with a resting membrane potential more negative than -55 mV and allowing recordings with R_s value lower than 25 M Ω were kept for further analysis. The firing behavior of neurons was determined in response to depolarizing current pulses ranging from -100 to 200 pA under current-clamp conditions.

The stimulating electrodes were positioned in layer 2/3. Electrical stimulations (1-10 μ A, 0.2 ms duration) were delivered in this layer using 1 M Ω impedance bipolar tungsten electrodes (TST33A10KT, WPI). The intensity of the stimulation was adjusted in current-clamp conditions to induce a subthreshold postsynaptic response due to coactivation of excitatory and inhibitory circuits. Responses with antidromic spikes were discarded. Under voltage-clamp conditions, the frequency of stimulation was 0.05 Hz and five to eight trials were repeated for a given holding potential.

A control recording was made after 15 min of patch-clamp equilibration at 0.05 Hz, and then drugs were continuously perfused during 20 min, a "drug recording" was made in the same conditions. We next applied a HFS (high frequency of stimulation) protocol in order to induce long term modifications of synaptic strengths in the recruited circuits. The HFS protocol was elicited with theta burst stimulation (TBS) known to induce long term potentiation (LTP) at the synaptic level. It consists of 3 trains of 13 bursts applied at a frequency of 5 Hz, each burst containing 4 pulses at 100 Hz (Abraham and Huggett, 1997). Recordings were made at 0.05 Hz after 15, 30, 45 and 60 min application of HFS protocol.

Drugs

Agonist and antagonists of GABA_A receptors: bicuculline, 4,5,6,7 tetrahydroisoxazolo[5,4-*c*]pyridine-3-ol (THIP or Gaboxadol) and gabazine (SR95531) purchased from Sigma (St-Louis, Missouri) were dissolved in the perfusate for at least 15 min before recordings. 4,4'-dinitro-stilbene-2,2'-disulfonic acid (DNDS, Molecular Probes) was dissolved at 0.5 mM in the intrapipette medium in order to block chloride channels in the layer 5 pyramidal neuron.

Synaptic responses analysis

Data were analyzed off-line with specialized software (Acquis1TM and ElphyTM: written by Gérard Sadoc, Biologic UNIC-CNRS, France). The method is based on the continuous measurement of conductance dynamics during stimulus-evoked synaptic response, as primarily described *in vivo* on cat cortex (Borg-Graham et al., 1998; Monier et al., 2003) and was recently validated on rat visual cortex (Le Roux et al., 2006). This method received further validation on other experimental models (Shu et al., 2003; Wehr and Zador, 2003; Higley and Contreras, 2006). Evoked synaptic currents were measured and averaged at a given holding potential. In I-V curves for every possible delay (t), the value of holding potential (V_h) was corrected (V_{hc}) from the ohmic drop due to the leakage current through R_s, by the equation: $V_{hc}(t) = V_h(t) - I(t) \times R_s$. An average estimate of the input conductance waveform of the cell was calculated from the best linear fit (mean least square criterion) of the I-V curve for each delay (t) following the stimulation onset. Only cells showing a Pearson correlation coefficient for the I-V linear regression higher than 0.95 between -90 and -40 mV were considered to calculate the conductance change of the recorded pyramidal neuron from the slope of the linear regression.

The evoked synaptic conductance term (g_T(t)) was derived from the input conductance by subtracting the resting conductance (g_{rest}). Under our experimental conditions, the global spontaneous activity was very weak and thus, the synaptic activity at rest was null. Consequently, the g_{rest} value was estimated 90 ms before the electrical stimulation. The apparent reversal potential of the synaptic current at the soma (E_{syn}(t)) was taken as the voltage abscissa of the intersection point between the I-V curve obtained at a given time (t) and that determined at rest. Assuming that the evoked somatic conductance change reflects the composite synaptic input reaching the soma, E_{syn}(t) characterizes the stimulation-locked dynamics of the balance between excitation and inhibition.

Decomposition of the synaptic conductance

To decompose the global evoked synaptic conductance ($g_T(t)$) into excitatory and inhibitory components ($g_E(t)$ and $g_I(t)$), we used the following simplifications: $I_{syn}(t) = g_E(t) (E_{syn}(t) - E_{exc}) + g_I(t) (E_{syn}(t) - E_{inh})$ and $g_T(t) = g_E(t) + g_I(t)$ where $I_{syn}(t)$ is the total synaptic current, $E_{syn}(t)$ is the apparent reversal potential at the soma (see the previous paragraph), $g_E(t)$ and $g_I(t)$ are excitatory and inhibitory conductances respectively and E_{exc} and E_{inh} are the reversal potentials for excitation and inhibition. Values of these reversal potentials were equal to 0 mV for excitation (E_{exc}) and to -80 mV for inhibition (E_{inh}), lumping the combined effects of the activation of $GABA_A$ and $GABA_B$ receptors in a single inhibitory component potentials (Anderson et al., 2000; Borg-Graham, 2001; Monier et al., 2003). The value of -80 mV used in the decomposition method is the reversal potential of $GABA_A$ (and not an intermediate value between $GABA_A$ and $GABA_B$) because in the presence of QX314 (which blocks K^+ efflux), no variation of the synaptic response was observed.

We showed that the I/V curve in the presence of excitatory synaptic transmission blockers (CNQX, D-AP5) is linear between -80 to +10 mV with a reversal potential equal to -80 mV (Le Roux et al., 2006). In the presence of bicuculline in order to block inhibitory inputs on the layer 5 pyramidal neuron, the I/V curve for excitation is linear between -80 to +10 mV with a reversal potential equal to 0 mV (data not shown) as already shown by other studies (Wehr and Zador, 2003; Higley and Contreras, 2006). Under our experimental conditions of stimulation of cortical layers leading to subthreshold postsynaptic responses, $E_{syn}(t)$ which was extrapolated from I-V curves took any intermediate values between -80 mV and -40 mV (Le Roux et al., 2006); supplementary data) *i.e.* within the limits of our voltage excursion (-90 to -40 mV) corresponding to the linearity of I-V curves and between the respective values of E_{inh} and E_{exc} in such a way that the mathematical conditions of the oversimplification used to calculate $g_I(t)$ and $g_E(t)$ were fulfilled.

Like all somatic recordings, our recordings cannot make rigorous estimates of synaptic events in the distal dendrites and the conductance estimates are ratios of the overall excitatory and inhibitory drive contained in the local network stimulated (Haider et al., 2006). However, our measurements give relative changes in conductance magnitude which reflect the cumulative contributions of excitation and inhibition arriving at proximal portions of the neuron. These relative conductance changes at the somatic level define a narrow window over which input integration and spike output can occur (Higley and Contreras, 2006).

To quantify the synaptic conductance changes, the integral (Int) over a time window of 200 ms was calculated for the total conductance change (IntgT) and for the excitatory and inhibitory conductance changes (IntgE and IntgI, respectively). The contribution of each component was expressed by the ratio of its integral value (IntgE or IntgI) to that of total conductance change (IntgT).

Reconstitution of the membrane potential

The dynamics of the membrane potential (VrecT) was reconstituted from the experimentally derived excitatory and inhibitory conductance profiles, on the basis of the prediction given by the combination of the different synaptic activation sources:

$$\frac{dVm(t)}{dt} = \frac{g_{rest} + gT(t)}{\tau g_{rest}} \left(\frac{g_{rest} E_{rest} + gT(t) E_{syn}(t)}{g_{rest} + gT(t)} - Vm(t) \right)$$

where τ is the membrane time constant measured at rest by injecting a 50 pA hyperpolarizing current step and E_{rest} is the resting potential.

VrecI or VrecE are also derived from this equation assuming that the voltage drive is only due to inhibitory or excitatory conductance profiles respectively.

To estimate the shunting inhibition previously reported by theoretical studies as a tonic-like GABA_A conductance (Mitchell and Silver, 2003; Mody, 2005), the following parameter, described as M factor (Koch et al., 1990) was calculated.

$$M = (\text{IntVrecT} - \text{IntVrecI}) / (\text{IntVrecE})$$
 using the integrals of VrecT, VrecI and VrecE.

M reflects the reducing coefficient of excitation by shunting inhibition at the somato-dendritic level when the membrane potential is near the resting potential.

Statistical analysis

Data are expressed as the mean \pm the standard deviation of the mean (SD) of n cells. Statistical analyses were performed using the non-parametric Mann-Whitney (U-test) to compare two different neuronal populations and the parametrical *t*-test for paired samples. In this latter case, data were expressed as percents of control values. Data were considered statistically significant for $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**) and $p \leq 0.001$ (***).

Results

Effects of over-activation of GABA_A receptors on the E/I balance

To further characterize the involvement of GABA_A receptors in the homeostatic regulation process of the E/I balance in visual cortex previously reported (Le Roux et al., 2006), we first over-stimulated the GABAergic system by perfusing neurons with 4,5,6,7 tetrahydroisoxazolo[5,4-c]pyridine-3-ol (THIP), an agonist of GABA_A receptors (Drasbek and Jensen, 2006).

Figure 1 shows current traces recorded from a layer 5 pyramidal neuron in response to application of 10 μM GABA or 10 μM THIP at different holding potentials. The currents elicited by GABA and THIP applications are due to activation of chloride channels because they reverse at -80 mV, a value equal to the equilibrium potential of Cl⁻ ions (*i.e.* -80 mV under our experimental conditions, see Methods). For a given concentration of agonist (10 μM), the amplitude of the current elicited by THIP is higher than that elicited by GABA. This indicates that THIP, compared to GABA, is a better agonist of GABA_A receptors, as previously reported (Cope et al., 2005; Drasbek and Jensen, 2006; Liang et al., 2006).

Representative recordings of current responses of a layer 5 pyramidal neuron to layer 2/3 stimulations are presented in Figure 2A under control conditions and after 20 min application of 10 μM THIP. The global conductance change of the pyramidal neuron (Fig. 2A medium traces), calculated from current recordings (see Methods) is significantly decreased in the presence of THIP. Decomposition of the global conductance change in its excitatory and inhibitory components shows a decrease of both components (Fig. 2A, lower traces). This observation was confirmed by the statistical analysis of the neuronal population (n = 24). IntgT is decreased from 446.8 ± 82.7 a.u. for the control to 267.6 ± 50.9 a.u. in the presence of THIP, IntgE from 65.2 ± 11.2 a.u. to 56.3 ± 11.9 a.u. and IntgI from 381.6 ± 73.6 a.u. to 211.3 ± 42.3 a.u. Relative conductance changes are presented in Figure 2B (left part). Excitatory conductance change, expressed as percent of total conductance change, is significantly increased from 16.9 ± 2.0 % for control to 22.8 ± 2.4 % in the presence of THIP, and the percentage of inhibition is significantly decreased from 83.1 ± 2.0 % to 77.2 ± 2.4 % (Fig. 2B, right part). Consequently, the E/I ratio was significantly increased by 5.9 % ($p < 0.01$, t-test, n = 24). Surprisingly, the M factor was increased from 0.66 ± 0.04 to 0.82 ± 0.03 ($p < 0.001$, t-test), indicating that the shunting inhibition was decreased.

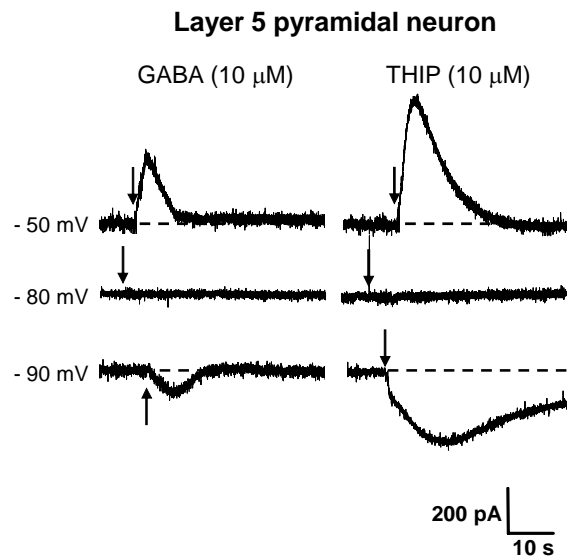


Figure 1. Activation of GABA_A receptors of a layer 5 pyramidal neuron by GABA or by THIP.

Current responses of a layer 5 pyramidal neuron. Left column, application of 10 μ M GABA (arrow) evoked a current response with a reversal potential equal to -80 mV. Right column, application of 10 μ M THIP (arrow) induced a response with a higher amplitude than GABA. Reversal potential of both responses was -80 mV. The dashed lines indicate the zero current level.

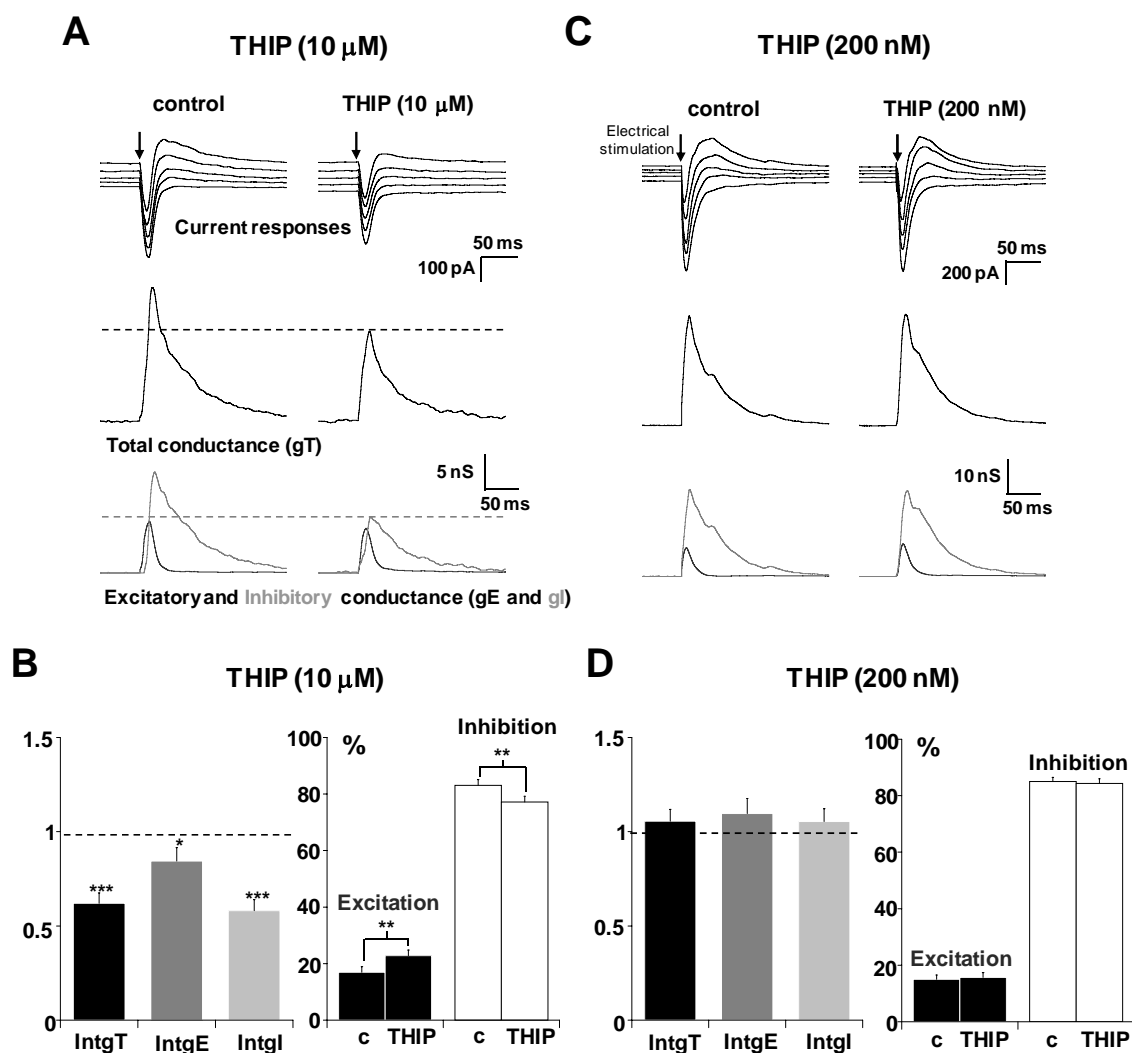


Figure 2. Effects of GABA_A receptors activation on the E/I balance of layer 5 pyramidal neurons.

(A and C) Left columns show representative recordings in control condition and right columns after 20 min application of THIP (10 μ M or 200 nM, respectively). **Upper traces:** current responses of a layer 5 pyramidal neuron to electrical stimulation (black arrow) applied in layer 2/3; holding potentials scaled from –70 (bottom trace) to –50 mV (steps equal to 5 mV). **Medium traces:** decomposition of the responses in total conductance changes (gT). **Lower traces:** decomposition of gT in excitatory (gE, dark grey) and inhibitory (gI, light grey) conductance changes. Note that the current responses and the conductance changes were decreased in the presence of 10 μ M THIP whereas they remain unchanged in the presence of 200 nM THIP.

(B) The left part shows relative changes (compared to control) of IntgT (black bars), IntgE (dark grey bars) and Intgl (light grey bars), after 10 μ M THIP application (n = 24). The right part shows excitation (black bars) and inhibition conductances (white bars) expressed as percents of the total conductance change (c: control). Excitation was increased from 16.9 ± 2.0 % to 22.8 ± 2.4 % and inhibition was decreased from 83.1 ± 2.0 % to 77.2 ± 2.4 %.

(*** p<0.001, ** p<0.01 and * p<0.05, t-test).

(D) Left part: relative changes (compared to control) of IntgT (black bars), IntgE (dark grey bars) and Intgl (light grey bars), after 200 nM THIP application (n = 20). Right part: excitation (black bars) and inhibition conductances (white bars) expressed as percents of the total conductance change (c: control). No significant change of excitation and inhibition was observed.

Indeed, 200 nM THIP has been reported to activate extrasynaptic GABA_A receptors (Cope et al., 2005; Drasbek et al., 2007) which are thought to mainly support shunting inhibition (Petrini et al., 2004; Mody, 2005). Thus, we have checked the effect of this concentration of THIP on the M factor. Current traces, as well as global conductance change and its excitatory and inhibitory components were not affected by 200 nM THIP (Fig. 2C). The statistical analysis of the neuronal population (n = 20) shows that the total, excitatory and inhibitory conductance changes were not significantly modified (p > 0.05, t-test, n = 20) while the M factor increased from 0.63 ± 0.04 to 0.69 ± 0.03 (p < 0.01, t-test, n = 20).

From these results, it was obvious that a high or low concentration of THIP decreases the shunting inhibition measured in the pyramidal neuron contrary to the expected effect from an activator of GABA_A receptors. However, the E/I ratio was increased in the presence of the high concentration of THIP, suggesting that the shunting inhibition is not sufficient to control this balance and that recurrent interactions between excitatory and inhibitory neurons have to be considered in this control (Le Roux et al., 2006). One way to test this latter possibility was to change the strength of synaptic connections by application of a HFS protocol.

Effects of over-activation of GABA_A receptors on the potentiation of excitatory and inhibitory inputs induced by HFS protocol

We previously described a homeostatic potentiation of excitatory and inhibitory inputs on layer 5 pyramidal neurons by application of a HFS protocol in layer 2/3. Marked increases of global, excitatory and inhibitory conductance changes were observed (Le Roux et al., 2006). Similar results were obtained in a new series of experiments (Fig. 3A). Statistical analysis of the global population (n = 19, Fig. 3B) shows that the total conductance change is increased by 50 %, due to parallel increases in excitatory and inhibitory conductance changes (Fig. 3C). This results in an unchanged E/I ratio. As already observed (Le Roux et al., 2006), this protocol of stimulation induced a decrease of the M factor from 0.59 to 0.54 (p < 0.05, t-test; n = 19) indicating that the shunting inhibition was increased to control the E/I ratio.

In the presence of 10 μM THIP, application of a HFS protocol in layer 2/3 failed to potentiate excitatory and inhibitory conductance changes. On the contrary, a time dependent depression of these conductance changes was observed (Fig. 4A for representative recordings and Fig. 4B for the statistical analysis of the global population, n = 12). 60 min after HFS application, relative conductance changes of IntgE and IntgI (compared to control before HFS protocol) were significantly decreased by about 20 % (p < 0.05) and 35 % (p < 0.001), respectively.

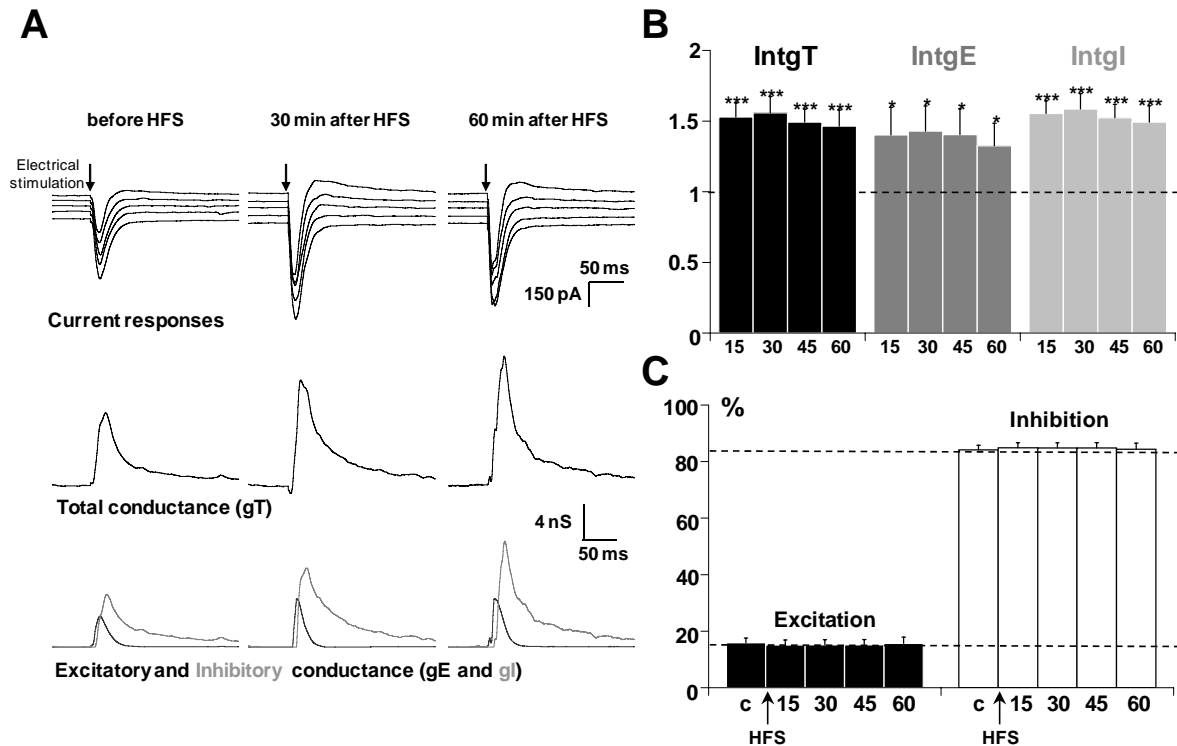


Figure 3. Effects of the application of a HFS protocol in layer 2/3 on the E/I balance of layer 5 pyramidal neurons.

(A) The left column shows representative recordings from the statistical analysis of $n = 19$ experiments in control conditions, the middle column 30 min after application of HFS protocol in layer 2/3 and the right column 60 min after application of HFS. **Upper traces:** current responses of a layer 5 pyramidal neuron to electrical stimulation. Imposed membrane potential ranged for -55 to -75 mV. Note that the amplitude of current responses was increased after HFS application. **Medium traces:** decomposition of the responses in total conductance change (gT). **Lower traces:** decomposition of gT in excitatory and inhibitory conductance changes (gE, dark grey and gI, light grey). Total, excitatory and inhibitory conductance changes were increased after HFS application.

(B) Relative changes (compared to control) of IntgT (black bars), IntgE (dark grey bars) and IntgI (light grey bars), after application of HFS protocol in layer 2/3 in control conditions ($n = 19$). (***) $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$, t-test).

(C) Relative contribution of excitation (black) and inhibition (white) conductance changes to the total conductance change, various times (15, 30, 45 and 60 min) after HFS (c: control before HFS protocol).

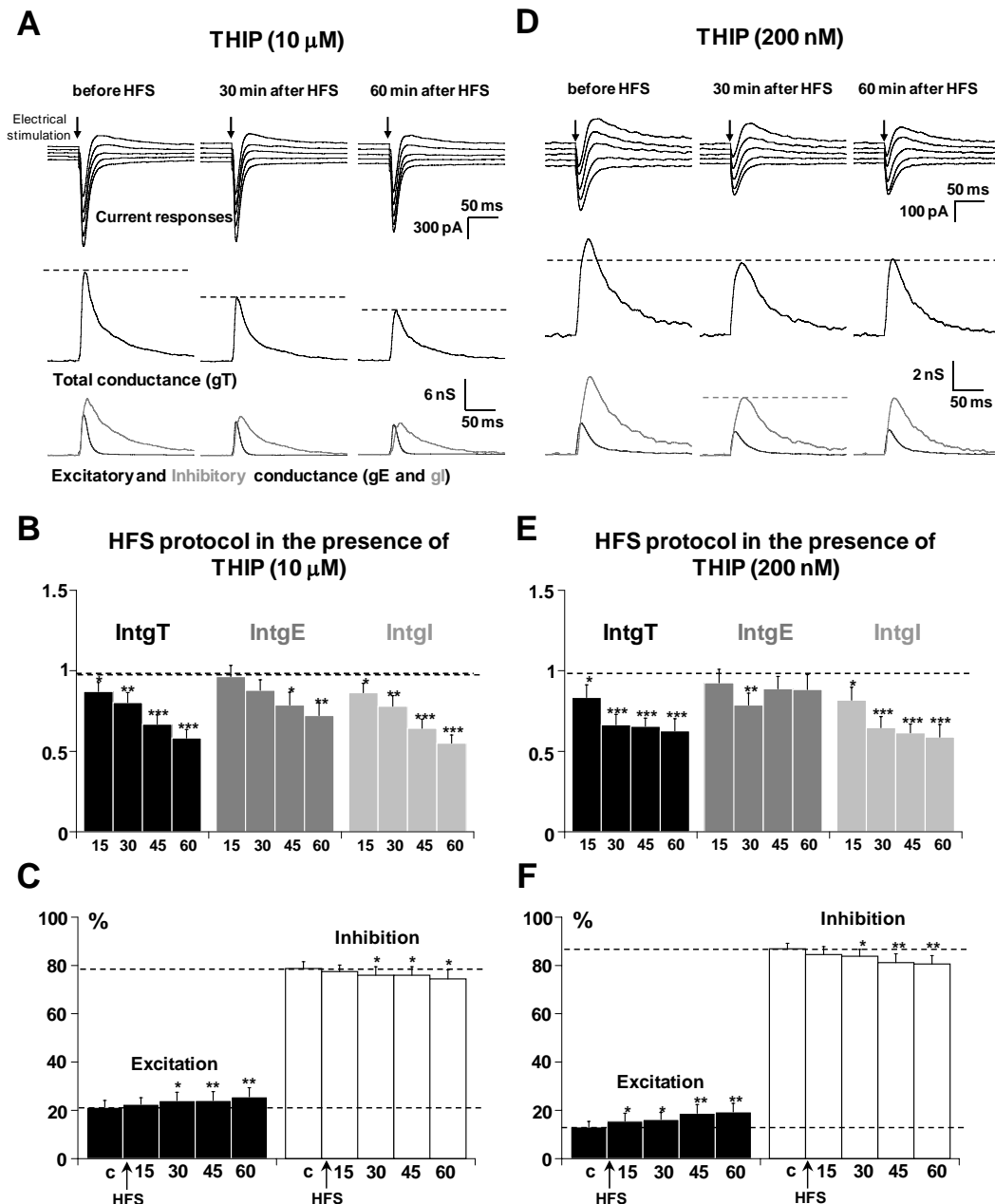


Figure 4. Effects of a HFS protocol in the presence of THIP.

(A) The left column shows a representative recordings from the statistical analysis of $n = 16$ experiments in the presence of 10 μ M THIP before HFS application, the middle column 30 min after application of HFS protocol and the right column 60 min after application of HFS in layer 2/3. **Upper traces:** current responses of a layer 5 pyramidal neuron to electrical stimulation. Imposed membrane potential ranged for -55 to -75 mV. Note that the amplitude of current responses was decreased after HFS application. **Medium traces:** decomposition of the responses in total conductance change (gT). **Lower traces:** decomposition of gT in excitatory and inhibitory conductance changes (gE, dark grey and gI, light grey). Total, inhibitory and excitatory conductance changes were decreased after HFS application.

(B) Relative changes (compared to control) of IntgT (black bars), IntgE (dark grey bars) and Intgl (light grey bars), after HFS in layer 2/3 ($n = 16$) in the presence of 10 μ M THIP. (** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$, t-test).

(C) Relative contribution of excitation and inhibition conductance changes to the total conductance change, after HFS in the presence of 10 μ M THIP (c:control before HFS protocol). Note that the E/I ratio was increased.

(D-E-F) Application of HFS protocol in the presence of 200 nM THIP ($n = 18$). Legends are identical than in A-B-C. Total, excitatory and inhibitory conductance changes were decreased (D-E) and the E/I ratio was increased (F).

The more important depression of inhibition (expressed as percent of total conductance change) than that of excitation (Fig. 4C) resulted in a significant enhancement of the E/I ratio by 4 % ($p < 0.01$, t-test). In the presence of 10 μM THIP, the M factor was increased (*i.e.* the shunting inhibition was decreased, $p < 0.001$) from 0.76 ± 0.04 to 0.85 ± 0.03 after application of a HFS protocol during 60 min.

Application of a HFS protocol in the presence of 200 nM THIP induced, after 15 min, a sustained depression of the integrals of total as well as of inhibitory and excitatory conductance changes which are not time dependent (Fig. 4D for representative recordings and Fig. 4E for statistical analysis of the global population, $n = 18$). IntgE, when expressed as percent of IntgT, was increased by 6 % while IntgI was decreased by 6 % after 60 min (Fig. 4F). This resulted in an increase of the E/I ratio after HFS application. Under these conditions, a significant enhancement ($p < 0.01$, t-test) of the M factor (from 0.68 ± 0.04 to 0.77 ± 0.04) was calculated, pointing out a decrease of the shunting inhibition.

These results show that whatever the concentration of THIP used, HFS protocol fails to induce parallel potentiations of excitatory and inhibitory inputs but induces depressions of these inputs on layer 5 pyramidal neurons. Moreover, the E/I balance was increased indicating that the homeostatic control of plasticity changes (potentiation or depression) was perturbed.

Effects of blockade of GABA_A receptors on the E/I balance

We used 30 nM or 200 nM gabazine (GBZ), a potent blocker of GABA_A receptors because it has been reported that a low concentration of this blocker can selectively prevent the activation of extrasynaptic GABAergic receptors (Cope et al., 2005).

Application of 30 nM GBZ did not modify significantly the conductance changes and the E/I ratio (Fig. 5A and 5B). The M factor remained constant ($n = 11$).

Application of 200 nM GBZ induced a significant decrease of IntgI by 38.8 ± 1.2 % and increased IntgE by 56.1 ± 2.2 % ($n = 17$), compared to control values (Fig. 5C and 5D). Consequently, the E/I ratio was significantly enhanced ($p < 0.001$, t-test) from 17.8 % / 82.2 % to 38.4 % / 61.6 % by 200 nM GBZ (Fig. 5D). The M factor was significantly increased from 0.77 ± 0.03 to 0.88 ± 0.02 ($p < 0.001$, t-test), which corresponds to a strong decrease of the shunting inhibition.

We conclude that the blockade of GABA_A receptors produces opposite effects on excitatory and inhibitory inputs, probably due to a reduced shunting inhibition and to disruption of recurrent interactions between excitatory and inhibitory neurons. These effects lead to the loss of homeostatic control of the E/I balance.

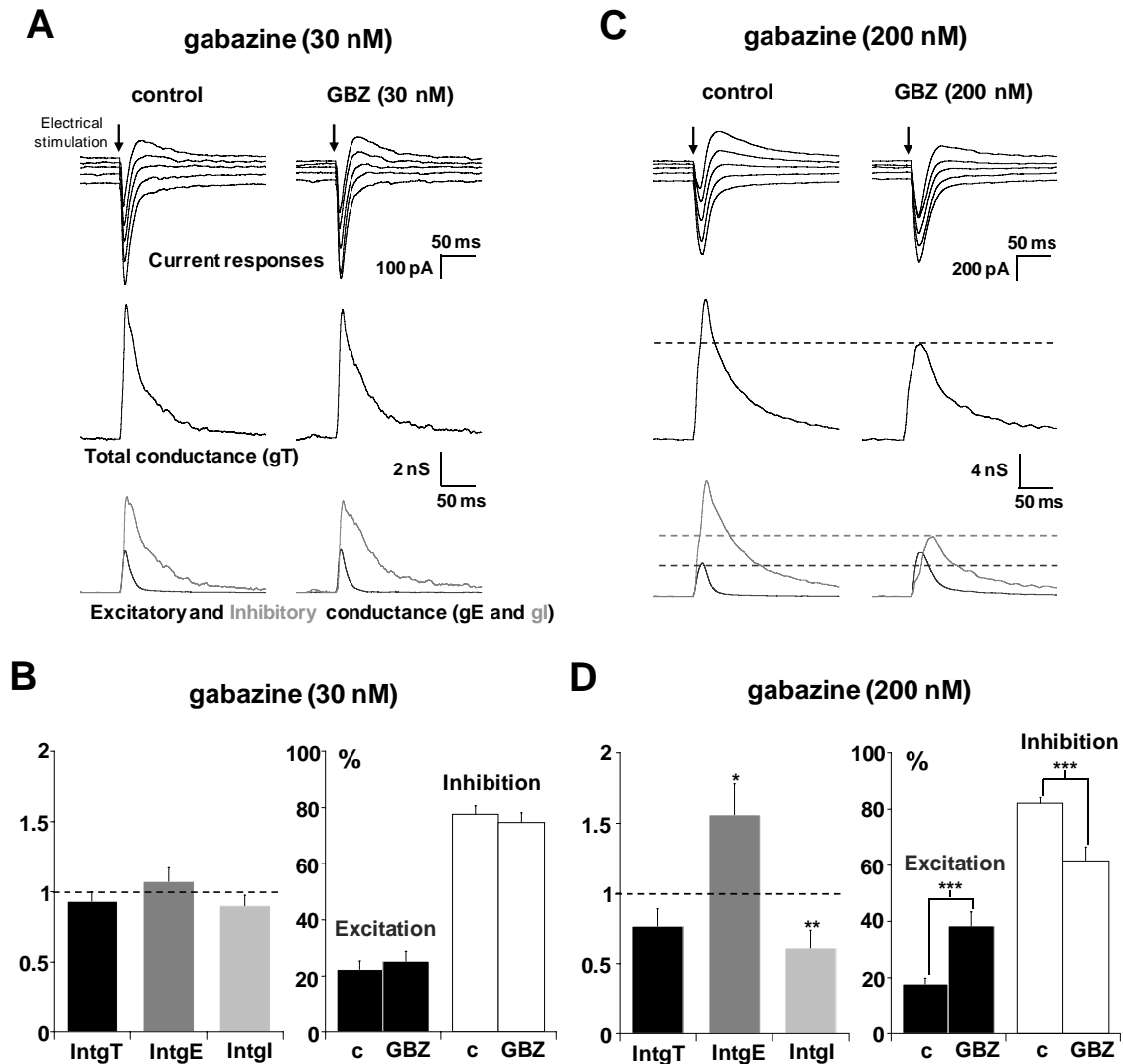


Figure 5. Effects of GABA_A receptors blockade on the E/I balance of layer 5 pyramidal neurons.

(A) The left column shows a representative recording in control condition and the right column after application of 30 nM GBZ during 20 min. **Upper traces:** current responses of a layer 5 pyramidal neuron to electrical stimulation (black arrow) applied in layer 2/3; holding potentials scaled from -75 (bottom trace) to -55 mV (steps equal to 5 mV). **Medium traces:** decomposition of the responses in total conductance change (gT). **Lower traces:** decomposition of gT in excitatory and inhibitory conductance changes (gE, dark grey and gI, light grey). No significant variation of total, excitatory and inhibitory conductance changes were observed.

(B) Left part: relative changes (compared to control) of IntgT (black bars), IntgE (dark grey bars) and IntgI (light grey bars), after application of 30 nM GBZ ($n = 11$). Right part: excitation (black bars) and inhibition (white bars) conductance changes expressed as percents of the total conductance change. The E/I ratio remains unchanged.

(C) The left column shows a representative recording in control condition and the right column after application of 200 nM GBZ during 20 min. Legends are identical than in A. In the presence of 200 nM the inward current was increased whereas the outward component was decreased.

(D) Left part: relative changes (compared to control) of IntgT (black bars), IntgE (dark grey bars) and IntgI (light grey bars), after application of 200 nM GBZ ($n = 17$). Right part: excitation (black bars) and inhibition (white bars) conductance changes expressed as percents of the total conductance change. Excitation increased from 17.8 ± 2.5 % of the total conductance change to 38.5 ± 5.0 % and inhibition decreased from 82.2 ± 2.5 % to 61.5 ± 5.0 %. (***) $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$, t-test).

Effects of blockade of GABA_A receptors on the potentiation of excitatory and inhibitory inputs induced by HFS protocol

Performing a HFS protocol in the presence of 30 nM GBZ induced a time-dependent depression of IntgT and IntgI (Fig. 6A and 6B). 60 min after application of the HFS protocol, IntgT and IntgI were decreased by $34.1 \pm 8.1 \%$ and $39.9 \pm 5.9 \%$ ($n = 13$), whereas IntgE remained almost stable. Under these conditions, the E/I ratio was significantly increased ($p < 0.01$, t-test) from 25.9% / 74.1% to 36.1% / 63.9% by GBZ (Fig. 6C), and the M factor increased from 0.65 ± 0.06 to 0.77 ± 0.05 after application of HFS protocol.

Performing a HFS protocol in the presence of 200 nM GBZ produced a marked depression of IntgT and IntgI (expressed as percents of their respective control values), and relative contributions of IntgE and IntgI to IntgT were increased and decreased, respectively (Fig. 6D and 6E). 60 min after application of the HFS protocol, excitation was increased by 33 % while inhibition was decreased by the same ratio ($n = 15$, Fig. 6F) leading to an increased E/I ratio. Under these conditions, the M factor was equal to 0.995 ($p < 0.01$, t-test, $n = 14$), which indicates that no shunting inhibition occurred.

We conclude that a complete blockade of the shunting inhibition was obtained in the presence of 200 nM GBZ and after applying a HFS protocol. Under this condition, only the inhibitory component was decreased while the excitatory component did not change significantly. This strongly suggests that, the control of homeostatic plasticity was lost.

Effects of partial blockade of GABA_A receptors of layer 5 pyramidal neuron on the regulation of the E/I balance

The role of GABAergic inhibition in the control of the E/I ratio in the recorded layer 5 pyramidal neuron was studied by locally blocking of GABA_A receptors of this neuron with 4,4'-dinitro-stilbene-2,2'-disulfonic acid (DNDS), a partial blocker of GABA_A receptors (Dudek and Friedlander, 1996; Perrett et al., 2001). DNDS (0.5 mM) was introduced in the pyramidal neuron *via* the recording electrode.

Representative recordings under control conditions ($n = 318$) and in the presence of 0.5 mM DNDS ($n = 54$) of two independent sets of experiments are presented in Figure 4A and 4B. A marked decrease of outward current, recorded from a layer 5 pyramidal neuron in response to an electrical stimulation of layer 2/3, was observed in the presence of intracellular DNDS.

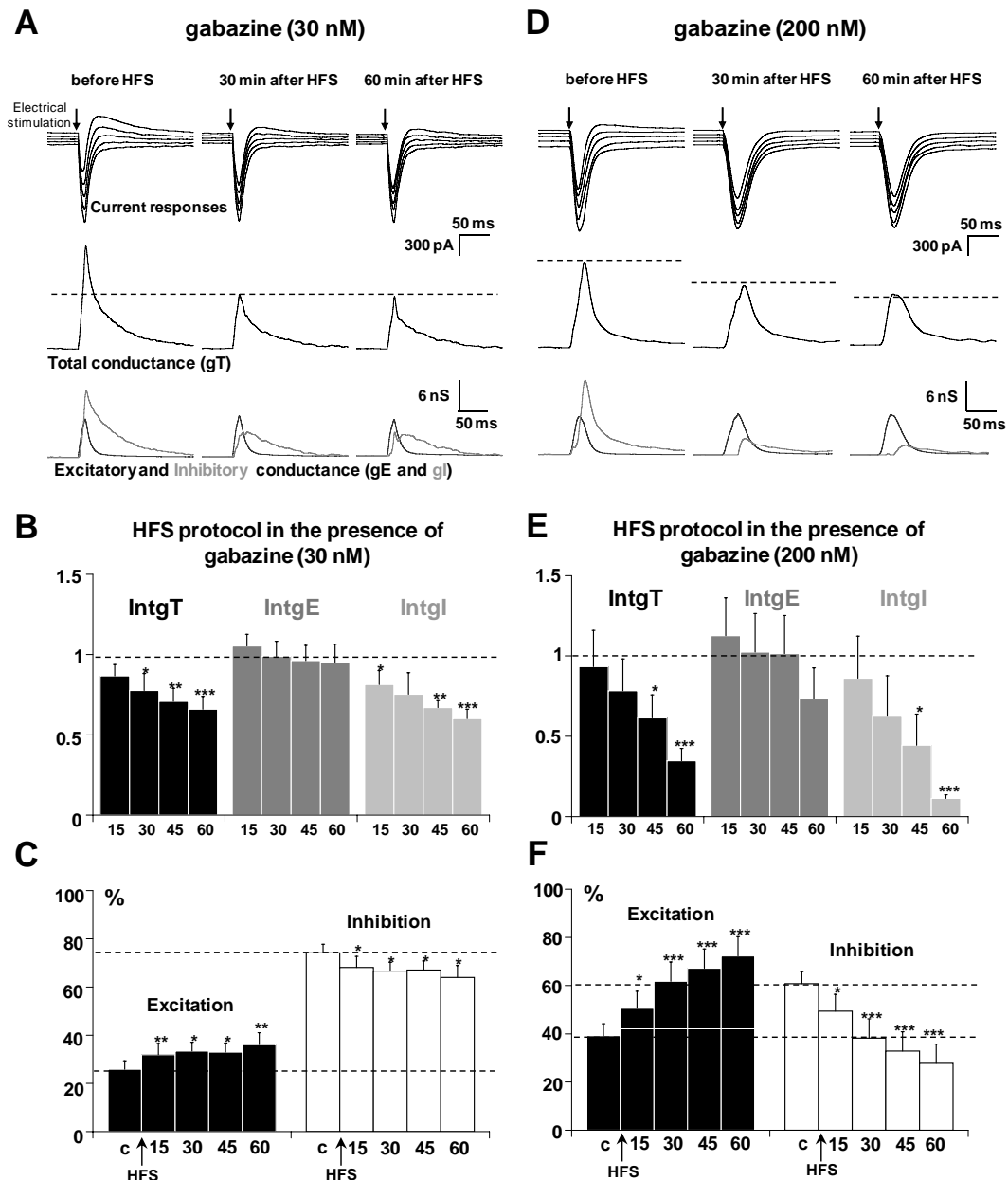


Figure 6. Effects of a HFS protocol in the presence of GBZ.

(A) The left column shows a representative recording from the statistical analysis of $n = 13$ experiments in the presence of 30 nM GBZ before HFS application, the middle column 30 min after application of HFS protocol and the right column 60 min after application of HFS in layer 2/3. **Upper traces:** current responses of a layer 5 pyramidal neuron to electrical stimulation. Imposed membrane potential ranged for -55 to -75 mV. The inward current was not modified whereas the outward component was decreased. **Medium traces:** decomposition of the responses in total conductance change (gT). **Lower traces:** decomposition of gT in excitatory and inhibitory conductance changes (gE, dark grey and gI, light grey). The total and inhibitory conductance changes were decreased after HFS application.

(B) Relative changes (compared to control) of IntgT (black bars), IntgE (dark grey bars) and Intgl (light grey bars), after HFS protocol in layer 2/3 ($n = 14$) in the presence of 30 nM GBZ. (** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$, t-test).

(C) Relative contribution of excitation and inhibition conductance changes to the total conductance change, after application of HFS protocol in the presence of 200 nM GBZ (c: control before HFS protocol). Note that the E/I ratio strongly increased.

(D-E-F) Application of HFS protocol in the presence of 200 nM GBZ ($n = 14$). Legends are identical than in A-B-C. The total and inhibitory conductance changes were decreased (D-E) and the E/I ratio was increased (F).

The total conductance change of the pyramidal neuron (compared Fig. 7A and 7B) was also significantly decreased (from 494.2 ± 20.5 a.u. to 258.3 ± 27 a.u. for DNDS neuronal population) due to a marked decrease of the inhibitory conductance (from 407.1 ± 17.6 a.u. to 174.7 ± 22.6 a.u.), the excitatory conductance being statistically unchanged (87.1 ± 4.0 a.u. for control population and 83.6 ± 7.8 a.u. for DNDS population). Expressed as percent of total conductance change, inhibitory conductance change was significantly decreased from 80.4 ± 0.6 % to 62.5 ± 2.3 %, and excitatory conductance change increased from 19.6 ± 0.6 % to 38.5 ± 2.3 %, in the presence of DNDS ($p < 0.001$, U-test). Thus, the E/I ratio was disrupted in favour of excitation, as expected after blocking partially GABA_A receptors of layer 5 pyramidal neurons. The M factor was enhanced from 0.65 ± 0.01 under control conditions to 0.82 ± 0.02 in the presence of DNDS. This significant change ($p < 0.001$, U-test) shows that the shunting inhibition was decreased, possibly due to the blockade of GABA_A receptors of recorded pyramidal neurons.

Application of a HFS protocol in the presence of 0.5 mM DNDS ($n = 21$) shows that the blockade of GABA_A receptors of layer 5 pyramidal neuron prevents the potentiation of inhibitory inputs but also, and surprisingly, of excitatory inputs (Fig. 7C). Consequently, no significant change of the E/I balance was detected (Fig. 7D). It is worth noting that, under these conditions the M factor was unaffected, whereas it was decreased when HFS protocol was applied in the absence of DNDS (Le Roux et al., 2006).

In the presence of DNDS, the potentiation of, not only inhibitory inputs but also excitatory induced by a HFS protocol was blocked. Thus, it appears that functional integrative processes along the apical dendrite of pyramidal neurons are a prerequisite condition, which indicates that these neurons are able to sense and regulate the strength of their inputs probably by feedback mechanisms acting on layer 2/3 circuits.

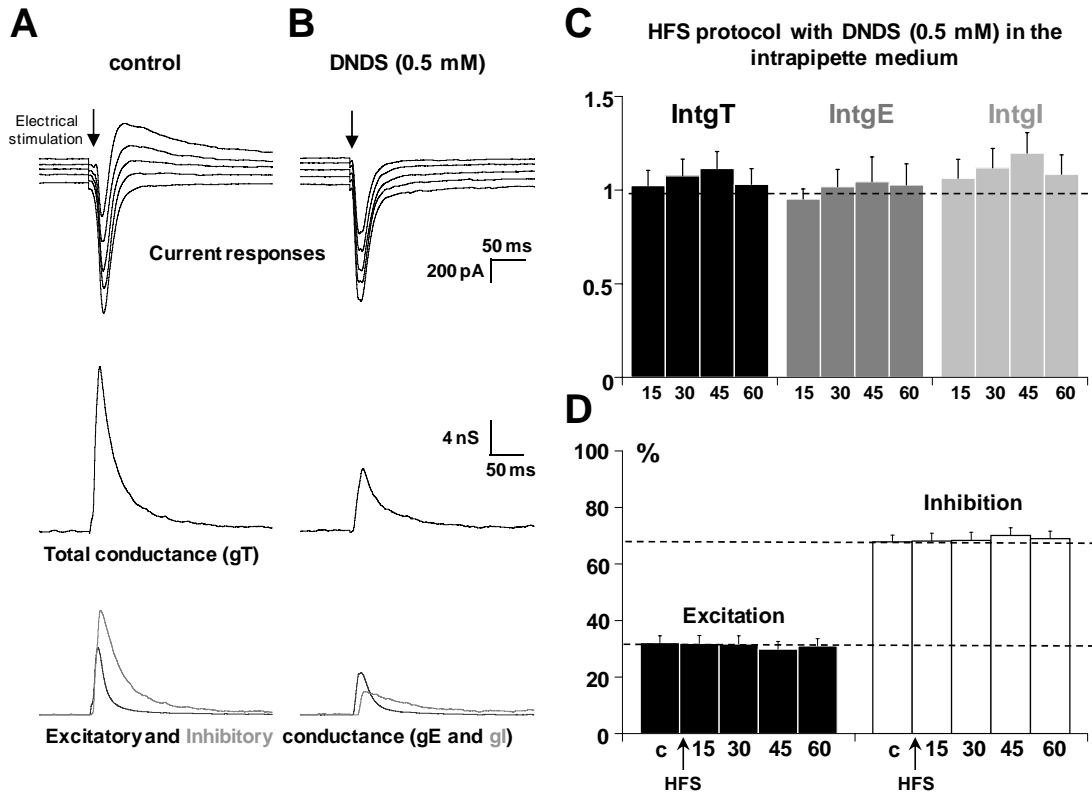


Figure 7. Effects of DNDS on the E/I balance of layer 5 pyramidal neurons.

(A) The left column shows representative recordings from the statistical analysis of $n = 318$ experiments in control conditions in response to the electrical stimulation applied in layer 2/3. **Upper traces:** current responses at imposed membrane potential ranging from -60 mV to -80 mV. **Medium traces:** decomposition of the responses in total conductance change (gT). **Lower traces:** decomposition of gT in excitatory and inhibitory conductance changes (gE, dark grey and gI, light grey).

(B) Representative recordings from $n = 54$ experiments with 0.5 mM DNDS in the patch pipette. Same legends than in A.

Discussion

Our data show that a HFS protocol applied to layer 2/3 induces a homeostatic potentiation of excitatory and inhibitory inputs on layer 5 pyramidal neurons leading to an unchanged E/I ratio, provided GABAergic receptors are normally functional. This strongly suggests that the homeostatic control of the E/I balance depends on the activation of GABA_A receptors recruited on layer 5 pyramidal neurons and/or upstream in recurrent neuronal network regulating the activity of pyramidal neurons.

Involvement of GABA_A receptors in the homeostatic control of the E/I balance

Our experiments show that the blockade or the over-activation of GABA_A receptors leads to an enhanced E/I ratio. At a first glance, these observations join the question of up- or down-regulation of GABA-mediated inhibition supporting conflicting data in animal models of epilepsy (Mody, 1998). However, our data allow a distinction between an enhancement of the E/I ratio resulting from a misregulation (*i.e.* a more important decrease of I than of E) or resulting from the disruption (*i.e.* an increased E and a decreased I) of neuronal interactions between excitation and inhibition. Blocking GABA_A receptors (with 200 nM GBZ) leads to dissymmetric effects, an enhanced excitation and a reduced, probably due to loss of homeostatic control. Over-activation of GABA_A receptors (with 10 μM THIP) decreased both, the inhibitory and excitatory conductance changes recorded at the somatic level of layer 5 pyramidal neurons. This may be explained by the fact that prolonged GABA_A receptors activation induces a switch of GABAergic responses from a hyperpolarizing to a depolarizing response in mature cortical neurons (Gulledge and Stuart, 2003; Kaila et al., 1997; Taira et al., 1997; Staley and Proctor, 1999; Lambert et al., 1991; Staley et al., 1995). This is likely due to a positive shift of the reversal potential of Cl⁻ current as the result of Cl⁻ accumulation in neurons, as previously reported (Staley et al., 1995; Backus et al., 1998; Dallwig et al., 1999; Frech et al., 1999; Jedlicka and Backus, 2006). In this line, we cannot exclude the possibility that continuous application of THIP induces a depolarising response of some GABAergic synapses in the neuronal network possibly resulting in a decrease of the strength of inhibitory inputs on layer 5 pyramidal neurons. However, in the presence of 10 μM THIP, the strength of excitatory inputs on layer 5 pyramidal neuron was reduced but in a lower proportion than that of inhibition leading thus to an enhanced E/I balance. This result suggests that the homeostatic control was less efficient.

One form of homeostatic control of the E/I balance is linked to homeostatic plasticity which can be achieved by compensatory potentiations of excitation and inhibition in response to HFS protocols. We observed that application of a HFS protocol in the presence of THIP or GBZ failed to induce a homeostatic potentiation of excitatory and inhibitory inputs but on the contrary led to a depression of the total conductance change (*i.e.*, a LTD-like effect). However, application of a HFS protocol in the presence of THIP depressed the strength of inhibitory and excitatory inputs on layer 5 pyramidal neurons whereas, in the presence of GBZ, it decreased only the strength of inhibitory inputs. This confirms that the blockade of GABA_A receptors prevents the homeostatic plasticity, whereas their over-activation misregulates the homeostatic plasticity process in such a way that the orientation of the plasticity turns from potentiation to depression.

These results raise the question of the mechanisms used to control the E/I balance, shunting inhibition and/or recurrent interactions between excitatory and inhibitory circuits.

Shunting inhibition

Shunting inhibition is assumed to mainly results from extrasynaptic GABAergic receptors located in the proximal part of the apical dendrite (Petrini, 2004; Mody 2005). It may increase the membrane conductance to modify spatial and temporal integration of excitatory signals (Brickley et al., 2001; Semyanov et al., 2003). Shunting inhibition was thus proposed to be involved in the control of excitability and information processing (Mitchell and Silver, 2003; Semyanov et al., 2003; Petrini et al., 2004; Le Roux et al., 2006), and in the prevention of hyper-excitability during epilepsy (Dibbens et al., 2004; Peng et al., 2004; Maguire et al., 2005; Feng et al., 2006). The application of a HFS protocol led to a partial blockade of shunting inhibition in the presence of 30 nM GBZ, a concentration which was proposed to specifically block extrasynaptic GABA_A receptors (Cope et al., 2005). We show that, whatever the concentration of GBZ was, the shunting inhibition was not blocked unless a HFS protocol was applied in the presence of a high concentration (*i.e.* 200 nM) of drug. This result indicates that an important part of shunting inhibition depends on GABA_A synaptic receptors and on the frequency of stimulation.

The enhanced E/I ratio observed in the presence of THIP or GBZ was attended by a decrease of the shunting inhibition. Thus, the shunting inhibition appears to be important to control the excitability of layer 5 pyramidal neurons. However, we showed that under conditions where the homeostatic control was misregulated or disrupted (over-activation or blockade of

GABA_A receptors, respectively) the shunting inhibition was decreased. This indicates that the regulation of homeostatic control involved also neuronal interactions independently of the shunting inhibition at the level of layer 5 pyramidal neurons.

Interactions between excitatory and inhibitory neurons

In the presence of DNDS, which locally reduces the shunting inhibition of layer 5 pyramidal neurons, the E/I balance was increased. Moreover, under these conditions, application of a HFS protocol failed to potentiate inhibitory and, surprisingly, excitatory inputs. This may be due to the recurrent organization of cortical networks. Indeed, layer 5 neurons make feedback projections on layer 2/3 neurons which are assumed to constitute an upstream regulation of the network (Thomson and Bannister, 1998; Callaway, 2002; Bannister, 2005). In addition, layer 5 pyramidal neurons receive inputs from other layer 5 pyramidal neurons on their proximal basal dendrites (Markram et al., 1997) and from layer 2/3 neurons (Thomson and Bannister, 1998), especially interneurons that project on the proximal part of apical dendrites, on secondary dendrites or on the soma of layer 5 pyramidal neurons (Cipolloni et al., 1998; Bannister, 2005) *i.e.* on cellular *loci* where a direct modulation of shunting inhibition will be efficient (Wells et al., 2000). Such a recurrent organization gives the possibility to finely regulate the strength of individual synapses (Turrigiano et al., 1998).

In conclusion, our results indicate that a major involvement of GABA_A receptors occurs to control the homeostasis of the E/I balance. This control is achieved by recurrent interactions between excitatory and inhibitory neurons, mainly due to feedback projections of layer 5 pyramidal neurons on layer 2/3 interneurons, and by functional integrative processes (involving shunting inhibition) along the apical dendrite of layer 5 pyramidal neurons.

Acknowledgments

The authors thank Dr. E. Benoit and Dr. S. O'Regan for critical reading of the manuscript.

References

- Abraham WC, Huggett A (1997) Induction and reversal of long-term potentiation by repeated high-frequency stimulation in rat hippocampal slices. *Hippocampus* 7: 137-145.
- Anderson JS, Carandini M, Ferster D (2000) Orientation tuning of input conductance, excitation, and inhibition in cat primary visual cortex. *J Neurophysiol* 84: 909-926.
- Backus KH, Deitmer JW, Friauf E (1998) Glycine-activated currents are changed by coincident membrane depolarization in developing rat auditory brainstem neurones. *J Physiol* 507 (Pt 3): 783-794.
- Bai D, Zhu G, Pennefather P, Jackson MF, MacDonald JF, Orser BA (2001) Distinct functional and pharmacological properties of tonic and quantal inhibitory postsynaptic currents mediated by gamma-aminobutyric acid(A) receptors in hippocampal neurons. *Mol Pharmacol* 59: 814-824.
- Bannister AP (2005) Inter- and intra-laminar connections of pyramidal cells in the neocortex. *Neurosci Res* 53: 95-103.
- Beierlein M, Gibson JR, Connors BW (2000) A network of electrically coupled interneurons drives synchronized inhibition in neocortex. *Nat Neurosci* 3: 904-910.
- Borg-Graham LJ (2001) The computation of directional selectivity in the retina occurs presynaptic to the ganglion cell. *Nat Neurosci* 4: 176-183.
- Borg-Graham LJ, Monier C, Fregnac Y (1998) Visual input evokes transient and strong shunting inhibition in visual cortical neurons. *Nature* 393: 369-373.
- Bradler JE, Barrioneuvo G (1989) Long-term potentiation in hippocampal CA3 neurons: tetanized input regulates heterosynaptic efficacy. *Synapse* 4: 132-142.
- Brickley SG, Revilla V, Cull-Candy SG, Wisden W, Farrant M (2001) Adaptive regulation of neuronal excitability by a voltage-independent potassium conductance. *Nature* 409: 88-92.
- Callaway EM (2002) Cell type specificity of local cortical connections. *J Neurocytol* 31: 231-237.
- Cipolloni PB, Kimerer L, Weintraub ND, Smith DV, Keller A (1998) Distribution of inhibitory synapses on the somata of pyramidal neurons in cat motor cortex. *Somatosens Mot Res* 15: 276-286.
- Cline H (2005) Synaptogenesis: a balancing act between excitation and inhibition. *Curr Biol* 15: R203-205.
- Cope DW, Hughes SW, Crunelli V (2005) GABAA receptor-mediated tonic inhibition in thalamic neurons. *J Neurosci* 25: 11553-11563.
- Dallwig R, Deitmer JW, Backus KH (1999) On the mechanism of GABA-induced currents in cultured rat cortical neurons. *Pflugers Arch* 437: 289-297.
- Dantzker JL, Callaway EM (2000) Laminar sources of synaptic input to cortical inhibitory interneurons and pyramidal neurons. *Nat Neurosci* 3: 701-707.
- DeFelipe J (1997) Types of neurons, synaptic connections and chemical characteristics of cells immunoreactive for calbindin-D28K, parvalbumin and calretinin in the neocortex. *J Chem Neuroanat* 14: 1-19.
- Dibbens LM, Feng HJ, Richards MC, Harkin LA, Hodgson BL, Scott D, Jenkins M, Petrou S, Sutherland GR, Scheffer IE, Berkovic SF, Macdonald RL, Mulley JC (2004) GABRD

- encoding a protein for extra- or peri-synaptic GABAA receptors is a susceptibility locus for generalized epilepsies. *Hum Mol Genet* 13: 1315-1319.
- Drasbek KR, Hoestgaard-Jensen K, Jensen K (2007) Modulation of extrasynaptic THIP conductances by GABAA receptor modulators in mouse neocortex. *J Neurophysiol*.
- Drasbek KR, Jensen K (2006) THIP, a Hypnotic and Antinociceptive Drug, Enhances an Extrasynaptic GABAA Receptor-mediated Conductance in Mouse Neocortex. *Cereb Cortex* 16: 1134-1141.
- Dudek SM, Friedlander MJ (1996) Developmental down-regulation of LTD in cortical layer IV and its independence of modulation by inhibition. *Neuron* 16: 1097-1106.
- Feng HJ, Kang JQ, Song L, Dibbens L, Mulley J, Macdonald RL (2006) Delta subunit susceptibility variants E177A and R220H associated with complex epilepsy alter channel gating and surface expression of alpha4beta2delta GABAA receptors. *J Neurosci* 26: 1499-1506.
- Flames N, Marin O (2005) Developmental mechanisms underlying the generation of cortical interneuron diversity. *Neuron* 46: 377-381.
- Frech MJ, Deitmer JW, Backus KH (1999) Intracellular chloride and calcium transients evoked by gamma-aminobutyric acid and glycine in neurons of the rat inferior colliculus. *J Neurobiol* 40: 386-396.
- Freund TF (2003) Interneuron Diversity series: Rhythm and mood in perisomatic inhibition. *Trends Neurosci* 26: 489-495.
- Freund TF, Gulyas AI (1997) Inhibitory control of GABAergic interneurons in the hippocampus. *Can J Physiol Pharmacol* 75: 479-487.
- Galarreta M, Hestrin S (1998) Frequency-dependent synaptic depression and the balance of excitation and inhibition in the neocortex. *Nat Neurosci* 1: 587-594.
- Gulledge AT, Stuart GJ (2003) Action potential initiation and propagation in layer 5 pyramidal neurons of the rat prefrontal cortex: absence of dopamine modulation. *J Neurosci* 23: 11363-11372.
- Gulyas AI, Miles R, Hajos N, Freund TF (1993) Precision and variability in postsynaptic target selection of inhibitory cells in the hippocampal CA3 region. *Eur J Neurosci* 5: 1729-1751.
- Gupta A, Wang Y, Markram H (2000) Organizing principles for a diversity of GABAergic interneurons and synapses in the neocortex. *Science* 287: 273-278.
- Haider B, Duque A, Hasenstaub AR, McCormick DA (2006) Neocortical network activity in vivo is generated through a dynamic balance of excitation and inhibition. *J Neurosci* 26: 4535-4545.
- Higley MJ, Contreras D (2006) Balanced excitation and inhibition determine spike timing during frequency adaptation. *J Neurosci* 26: 448-457.
- Jedlicka P, Backus KH (2006) Inhibitory transmission, activity-dependent ionic changes and neuronal network oscillations. *Physiol Res* 55: 139-149.
- Kaila K, Lamsa K, Smirnov S, Taira T, Voipio J (1997) Long-lasting GABA-mediated depolarization evoked by high-frequency stimulation in pyramidal neurons of rat hippocampal slice is attributable to a network-driven, bicarbonate-dependent K⁺ transient. *J Neurosci* 17: 7662-7672.
- Kawaguchi Y, Kondo S (2002) Parvalbumin, somatostatin and cholecystokinin as chemical markers for specific GABAergic interneuron types in the rat frontal cortex. *J Neurocytol* 31: 277-287.

- Koch C, Douglas R, Wehmeier U (1990) Visibility of synaptically induced conductance changes: theory and simulations of anatomically characterized cortical pyramidal cells. *J Neurosci* 10: 1728-1744.
- Lambert NA, Borroni AM, Grover LM, Teyler TJ (1991) Hyperpolarizing and depolarizing GABAA receptor-mediated dendritic inhibition in area CA1 of the rat hippocampus. *J Neurophysiol* 66: 1538-1548.
- Le Roux N, Amar M, Baux G, Fossier P (2006) Homeostatic control of the excitation-inhibition balance in cortical layer 5 pyramidal neurons. *Eur J Neurosci* 24: 3507-3518.
- Liang J, Zhang N, Cagetti E, Houser CR, Olsen RW, Spigelman I (2006) Chronic intermittent ethanol-induced switch of ethanol actions from extrasynaptic to synaptic hippocampal GABAA receptors. *J Neurosci* 26: 1749-1758.
- Maguire JL, Stell BM, Rafizadeh M, Mody I (2005) Ovarian cycle-linked changes in GABA(A) receptors mediating tonic inhibition alter seizure susceptibility and anxiety. *Nat Neurosci* 8: 797-804.
- Marder E, Prinz AA (2002) Modeling stability in neuron and network function: the role of activity in homeostasis. *Bioessays* 24: 1145-1154.
- Markram H, Lubke J, Frotscher M, Roth A, Sakmann B (1997) Physiology and anatomy of synaptic connections between thick tufted pyramidal neurones in the developing rat neocortex. *J Physiol* 500 (Pt 2): 409-440.
- Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C (2004) Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci* 5: 793-807.
- McBain CJ, Fisahn A (2001) Interneurons unbound. *Nat Rev Neurosci* 2: 11-23.
- Mitchell SJ, Silver RA (2003) Shunting inhibition modulates neuronal gain during synaptic excitation. *Neuron* 38: 433-445.
- Mody I (1998) Ion channels in epilepsy. *Int Rev Neurobiol* 42: 199-226.
- Mody I (2005) Aspects of the homeostatic plasticity of GABAA receptor-mediated inhibition. *J Physiol* 562: 37-46.
- Monier C, Chavane F, Baudot P, Graham LJ, Fregnac Y (2003) Orientation and direction selectivity of synaptic inputs in visual cortical neurons: a diversity of combinations produces spike tuning. *Neuron* 37: 663-680.
- Peng Z, Huang CS, Stell BM, Mody I, Houser CR (2004) Altered expression of the delta subunit of the GABAA receptor in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* 24: 8629-8639.
- Perrett SP, Dudek SM, Eagleman D, Montague PR, Friedlander MJ (2001) LTD induction in adult visual cortex: role of stimulus timing and inhibition. *J Neurosci* 21: 2308-2319.
- Petrini EM, Marchionni I, Zacchi P, Sieghart W, Cherubini E (2004) Clustering of extrasynaptic GABA(A) receptors modulates tonic inhibition in cultured hippocampal neurons. *J Biol Chem* 279: 45833-45843.
- Scimemi A, Semyanov A, Sperk G, Kullmann DM, Walker MC (2005) Multiple and plastic receptors mediate tonic GABAA receptor currents in the hippocampus. *J Neurosci* 25: 10016-10024.
- Semyanov A, Walker MC, Kullmann DM (2003) GABA uptake regulates cortical excitability via cell type-specific tonic inhibition. *Nat Neurosci* 6: 484-490.

- Shu Y, Hasenstaub A, Badoual M, Bal T, McCormick DA (2003) Barrages of synaptic activity control the gain and sensitivity of cortical neurons. *J Neurosci* 23: 10388-10401.
- Shu Y, Hasenstaub A, McCormick DA (2003) Turning on and off recurrent balanced cortical activity. *Nature* 423: 288-293.
- Somogyi P, Tamas G, Lujan R, Buhl EH (1998) Salient features of synaptic organisation in the cerebral cortex. *Brain Res Brain Res Rev* 26: 113-135.
- Staley KJ, Proctor WR (1999) Modulation of mammalian dendritic GABA(A) receptor function by the kinetics of Cl⁻ and HCO₃⁻ transport. *J Physiol* 519 Pt 3: 693-712.
- Staley KJ, Soldo BL, Proctor WR (1995) Ionic mechanisms of neuronal excitation by inhibitory GABAA receptors. *Science* 269: 977-981.
- Steele PM, Mauk MD (1999) Inhibitory control of LTP and LTD: stability of synapse strength. *J Neurophysiol* 81: 1559-1566.
- Taira T, Lamsa K, Kaila K (1997) Posttetanic excitation mediated by GABA(A) receptors in rat CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 77: 2213-2218.
- Tamas G, Buhl EH, Lorincz A, Somogyi P (2000) Proximally targeted GABAergic synapses and gap junctions synchronize cortical interneurons. *Nat Neurosci* 3: 366-371.
- Thomson AM, Bannister AP (1998) Postsynaptic pyramidal target selection by descending layer III pyramidal axons: dual intracellular recordings and biocytin filling in slices of rat neocortex. *Neuroscience* 84: 669-683.
- Thomson AM, West DC, Hahn J, Deuchars J (1996) Single axon IPSPs elicited in pyramidal cells by three classes of interneurons in slices of rat neocortex. *J Physiol* 496 (Pt 1): 81-102.
- Turrigiano GG, Leslie KR, Desai NS, Rutherford LC, Nelson SB (1998) Activity-dependent scaling of quantal amplitude in neocortical neurons. *Nature* 391: 892-896.
- Wehr M, Zador AM (2003) Balanced inhibition underlies tuning and sharpens spike timing in auditory cortex. *Nature* 426: 442-446.
- Wells JE, Porter JT, Agmon A (2000) GABAergic inhibition suppresses paroxysmal network activity in the neonatal rodent hippocampus and neocortex. *J Neurosci* 20: 8822-8830.
- Yeh JH, Jeng CJ, Chen YW, Lin HM, Wu YS, Tang CY (2005) Selective enhancement of tonic inhibition by increasing ambient GABA is insufficient to suppress excitotoxicity in hippocampal neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 338: 1417-1425.
- Zilberter Y (2000) Dendritic release of glutamate suppresses synaptic inhibition of pyramidal neurons in rat neocortex. *J Physiol* 528: 489-496.

2. Marquages immunocytochimiques des récepteurs GABA_A contenant la sous-unité δ .

Les récepteurs GABA_A contenant la sous-unité δ sont supposés être exclusivement extrasynaptique et engendrer une inhibition de type shuntante (Sperk et al., 1997 ; Wei et al., 2003 ; Caraiscos et al., 2004 ; Petrini et al., 2004 ; Mody, 2005). Le marquage de ces récepteurs sur tranche de cortex visuel de rat montre que ces récepteurs sont majoritairement localisés au niveau des couches 2/3 et 5 (figure 38A). Au niveau des neurones pyramidaux de couche 5, ces récepteurs sont présents au niveau du soma et de la partie proximale de la dendrite apicale (figure 38B). Au niveau de la couche 2/3, un co-marquage entre l'enzyme de synthèse du GABA, la « Glutamic Acid Decarboxylase » (GAD-67), qui permet de marquer spécifiquement les interneurones (figure 38C), et les récepteurs GABA_A δ (figure 38D) montrent que tous les neurones positifs pour GAD-67, le sont aussi pour les récepteurs GABA_A δ (figure 38E). Ces résultats montrent que les récepteurs sont non seulement présents au niveau des neurones pyramidaux mais aussi des neurones en couche 2/3 où une inhibition shuntante pourrait aussi permettre de réguler leur activité.

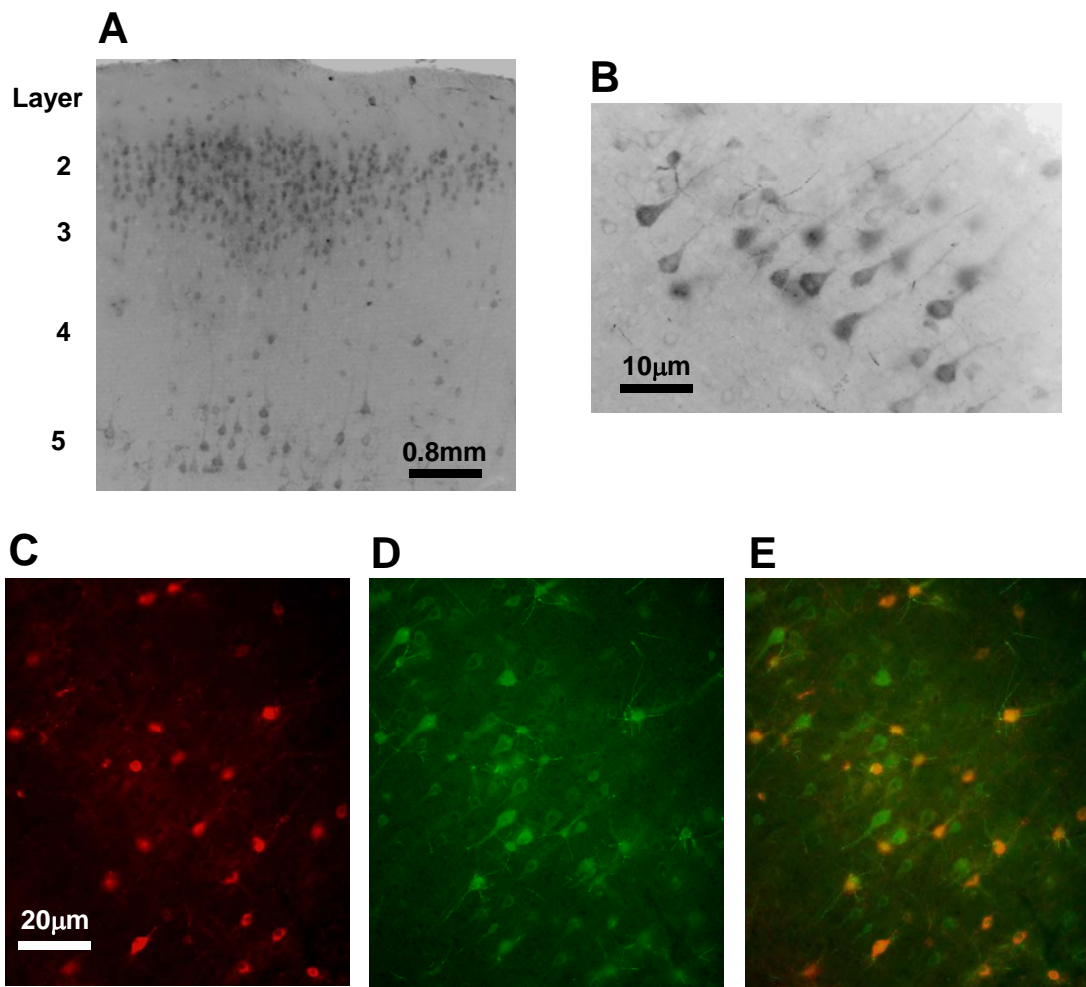


Figure 38. Marquage immunocytochimique des récepteurs $GABA_A$ contenant la sous-unité δ .

- A. Marquage des récepteurs $GABA_A\delta$ du cortex visuel de rat.
- B. Marquage des récepteurs $GABA_A\delta$ des neurones pyramidaux de couche 5 du cortex visuel de rat. Le soma et la partie proximale de la dendrite apicale sont fortement marqués.
- C. Marquage des interneurons du cortex visuel de rat en couche 2/3 à l'aide d'un anticorps dirigé contre la protéine GAD-67.
- D. Marquage des récepteurs $GABA_A\delta$ en couche 2/3 du cortex visuel de rat.
- E. Superposition des marquages GAD-67 (rouge) et des récepteurs $GABA_A\delta$ (vert) du cortex visuel de rat en couche 2/3.

3. Rôle des récepteurs GABA_B dans la régulation de la balance E/I

Nous avons utilisé un bloqueur spécifique des récepteurs GABA_B, le CGP 52-432, pour étudier leur rôle dans la régulation de la balance E/I. Des enregistrements représentatifs pour un neurone pyramidal de couche 5 à la suite d'une stimulation électrique en couche 2/3 sont présentés en [figure 39A](#). En présence de CGP la composante inhibitrice sortante de la réponse en courant du neurone pyramidal est augmentée. La décomposition en conductance montre une augmentation significative des changements de conductances totale et inhibitrice alors que les changements de conductance excitatrice ne sont pas modifiés. L'analyse statistique de $n = 24$ neurones ([figure 39B1](#)) montrent que IngT et IntgI sont significativement augmentés, respectivement de 19 % ($p < 0.01$) et de 32 % ($p < 0.001$). Aucun changement significatif d' IntgE n'est observé.

La forte augmentation de l'inhibition induit une réduction significative de la balance E/I ($p < 0.001$; [figure 39B2](#)). Dans ces conditions, nous observons également une diminution significative du facteur M de 0.72 ± 0.02 à 0.68 ± 0.02 ($p < 0.05$) indiquant une augmentation de l'inhibition shuntante.

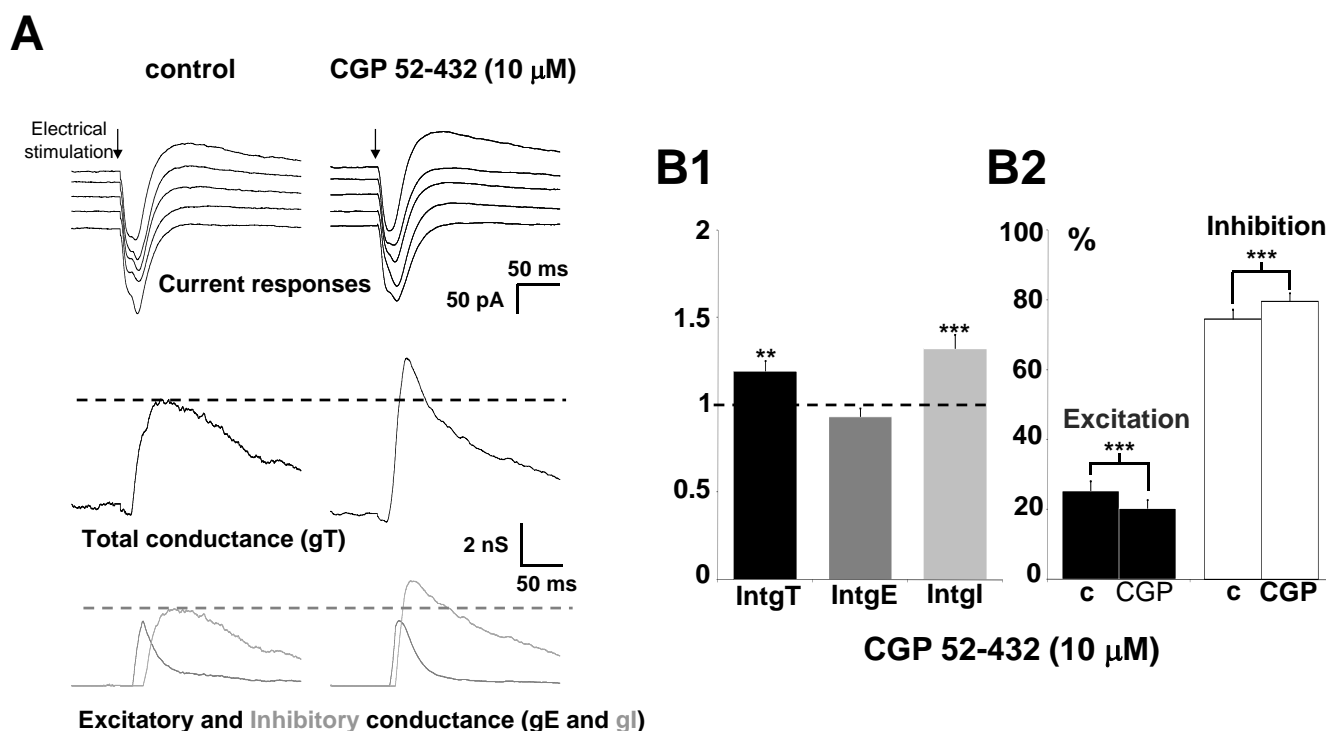


Figure 39. Effets du blocage des récepteurs GABA_B sur la balance E/I des neurones pyramidaux de couche 5.

- A. La colonne de gauche présente un enregistrement d'un neurone pyramidal de couche 5 en condition contrôle et la colonne de droite en présence de 10 μ M de CGP en réponse à une stimulation électrique en couche 2/3. La partie haute présente les enregistrements en courant pour des potentiels imposés entre - 45 mV et - 65 mV. Les parties médiane et basse présentent les décompositions en changements de conductances totale, excitatrice et inhibitrice.
- B1. Changements relatifs de IntgT (noir), IntgE (gris foncé) et Intgl (gris clair) après perfusion de CGP 52-432 à 10 μ M (n = 24).
- B2. Variation du pourcentage d'excitation et d'inhibition à la suite de la perfusion de 10 μ M CGP 52-432 (c: contrôle).

4. Rôle des récepteurs GABA_B dans la potentiation homéostatique

En présence de CGP 52-432, une augmentation de la réponse en courant suite à l'application d'un protocole de HFS en couche 2/3 est observée ainsi qu'une augmentation des conductances totale et inhibitrice (figure 40A). L'analyse statistique de l'ensemble de la population neuronale (n = 9 ; figure 40B) confirme l'augmentation à long terme d'IntgT et d'IntgI respectivement de 23 % (p < 0.05) et de 28 % (p < 0.05). Par contre, aucune modification significative d'IntgE n'est observée. De plus, dans ces conditions, l'inhibition shuntante est significativement augmentée dans les mêmes proportions que lors de l'application d'un protocole de HFS en condition contrôle. Finalement, la balance E/I n'est pas modifiée (figure 40C).

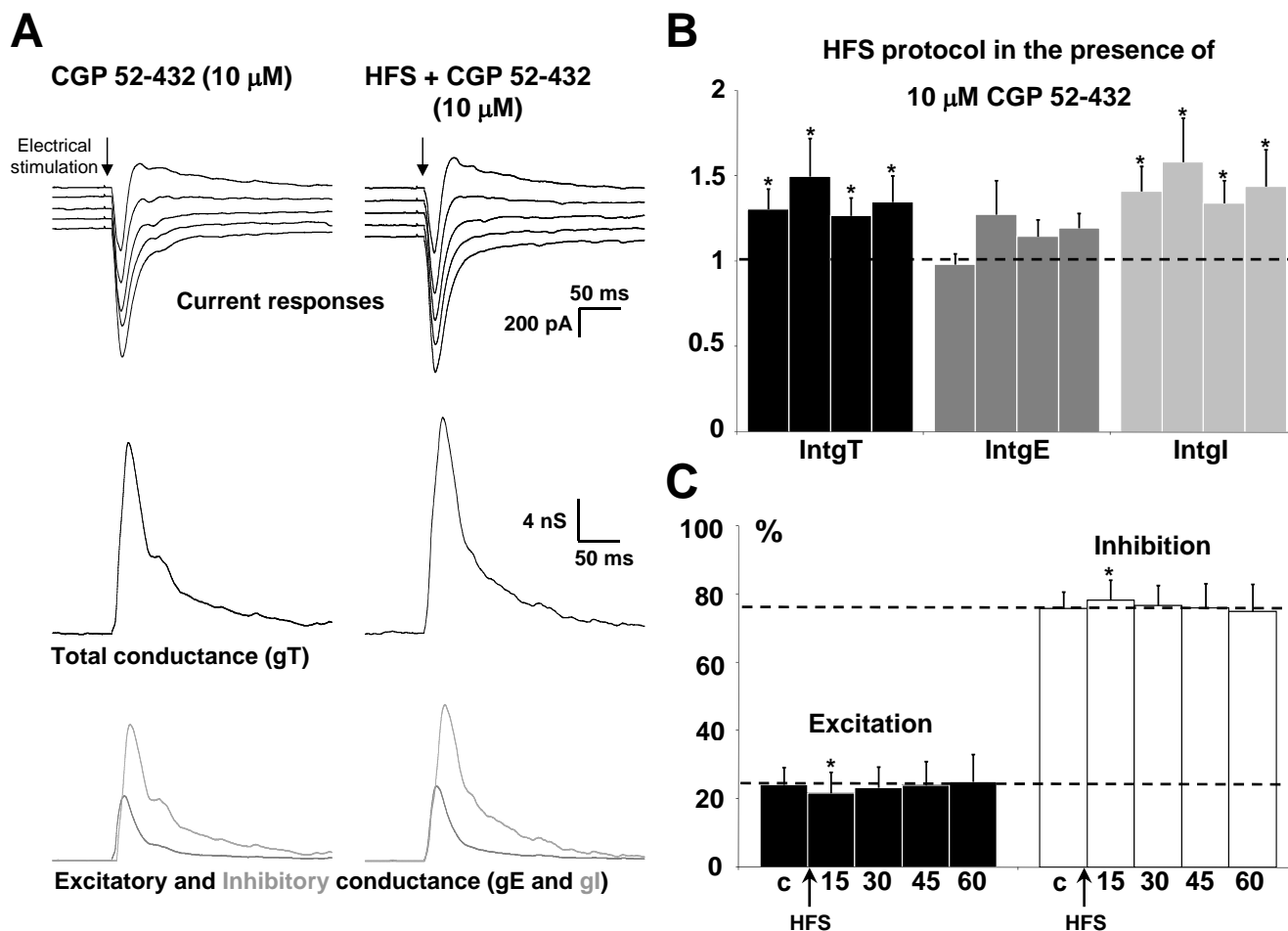


Figure 40. Application d'un protocole de HFS en présence de 10 μ M de CGP 52-432.

- A. La colonne de gauche présente un enregistrement contrôle en présence de 10 μ M de CGP avant application d'un protocole de HFS et la colonne de droite après application d'un protocole de HFS. La partie haute présente les enregistrements en courant pour des potentiels imposés entre - 55 mV et - 75 mV. Les parties médiane et basse présentent les décompositions en changement de conductances totale, excitatrice et inhibitrice.
- B. Changements relatifs de IntgT (noir), IntgE (gris foncé) et Intgl (gris clair) après application d'un protocole de HFS en couche 2/3 (n = 9) en présence de CGP à 10 μ M.
- C. Variation du pourcentage d'excitation et d'inhibition à la suite de l'application d'un protocole de HFS en couche 2/3 (c: contrôle avant HFS).

C) Conclusions

Nos résultats mettent clairement en évidence l'importance du système inhibiteur GABAergique dans le fonctionnement cortical.

1. Le contrôle GABAergique de la balance E/I

Nous avons observé que la sur-activation ou le blocage des récepteurs GABA_A corticaux provoquent une augmentation significative de la balance E/I ce qui est en faveur de l'hypothèse proposant que, quel que soit le sens de la dérégulation, un dysfonctionnement du système GABAergique est à l'origine d'une augmentation de l'excitabilité neuronale de type épileptique (Mody, 1998).

Néanmoins une différenciation des effets du blocage et de la sur-activation des récepteurs GABA_A sur le contrôle de la balance E/I des neurones pyramidaux de couche 5 peut être faite. En effet, le blocage des récepteurs GABA_A entraîne des effets opposés sur l'excitation et l'inhibition, à savoir une augmentation de l'excitation et une diminution de l'inhibition. La sur-activation des récepteurs GABA_A entraîne par contre des effets similaires sur les deux composantes, une diminution significative de l'excitation et une diminution plus importante de l'inhibition à l'origine de l'augmentation de la balance E/I. On peut ainsi supposer que dans le cas du blocage des récepteurs GABA_A, le contrôle homéostatique de la balance E/I est inopérant alors que dans le cas d'une sur-activation, le contrôle est toujours présent (effets similaires sur E et I) mais dépassé (augmentation de la balance E/I).

A l'inverse, une diminution de la balance E/I est observée suite au blocage des récepteurs GABA_B. Cette diminution est liée à une augmentation de l'inhibition (GABA_A) du neurone pyramidal sans changement d'efficacité de l'excitation. Les récepteurs GABA_B pourraient par conséquent avoir une action spécialisée uniquement au niveau des interneurons inhibiteurs.

2. Le contrôle GABAergique de la potentiation homéostatique

L'application d'un protocole de stimulation à haute fréquence en présence d'un bloqueur ou d'un agoniste des récepteurs GABA_A empêche l'induction d'une potentiation de l'excitation et de l'inhibition et prévient donc l'induction de la potentiation homéostatique.

Au contraire, l'application d'un protocole à haute fréquence en présence d'un agoniste des récepteurs GABA_A entraînent une dépression de l'excitation et de l'inhibition. La dépression

en parallèle de l'excitation et de l'inhibition permet de réduire les modifications de la balance E/I. Par conséquent, la sur-activation du système GABA_A cortical n'empêcherait pas l'induction d'un contrôle homéostatique mais le rendrait inefficace.

L'application d'un protocole de stimulation à haute fréquence en présence d'un bloqueur des récepteurs GABA_A provoque une dépression de l'inhibition sans changement de la composante excitatrice. Dans ce cas de figure, il apparaît que l'induction d'un contrôle homéostatique est impossible.

En présence d'un bloqueur des récepteurs GABA_B, le protocole de stimulation à haute fréquence permet toujours l'induction d'une potentiation de l'inhibition mais sans changement significatif de l'excitation.

Ces résultats confirment l'importance des récepteurs GABA dans l'induction de la potentiation homéostatique. Des dérèglements d'activité des récepteurs GABA_A peuvent même résulter en une plasticité « aberrante » (l'induction par un protocole de LTP d'une LTD), que ce soit pour la composante inhibitrice ou pour la composante excitatrice.

3. Les mécanismes du contrôle inhibiteur de l'activité corticale

La sur-activation ou le blocage des récepteurs GABA_A corticaux entraîne une diminution importante de l'inhibition shuntante et par conséquent une augmentation de la composante excitatrice perçue au niveau du soma du neurone pyramidal. De plus, il est intéressant de noter qu'un blocage total de l'inhibition shuntante n'est observé qu'en présence d'une forte concentration d'antagoniste GABAergique qui bloque à la fois les récepteurs synaptiques et extrasynaptiques. Par conséquent mon étude montre que l'inhibition shuntante ne peut être reliée à un type de récepteurs GABA_A particulier mais doit reposer sur les récepteurs GABAergiques synaptiques et extrasynaptiques.

Une augmentation de l'inhibition shuntante a aussi été observée en présence d'un bloqueur des récepteurs GABA_B. Le blocage de ces récepteurs entraîne un renforcement de l'inhibition perçue au niveau des neurones pyramidaux de couche 5 et pourrait par conséquent expliquer l'augmentation du shunt.

Enfin, en présence de DNDS (un bloqueur intracellulaire des canaux Cl⁻) dans le neurone pyramidal de couche 5, l'induction de la potentiation des entrées inhibitrices et excitatrices devient impossible. Par conséquent, il doit exister des connexions rétrogrades qui permettent

aux neurones pyramidaux de couche 5 de réguler l'efficacité des afférences qu'ils reçoivent afin de maintenir une balance E/I stable. Ces résultats mettent en évidence le rôle important dans la régulation de l'activité corticale de l'inhibition shuntante et des interactions réciproques entre le neurone pyramidal et les circuits neuronaux excitateurs et inhibiteurs en amont.

III. Etude du rôle des récepteurs NMDA dans l'induction de la plasticité homéostatique.

A) Position du problème

Je me suis ensuite plus particulièrement intéressé à l'implication des récepteurs NMDA dans l'induction et l'expression de la potentiation homéostatique des afférences excitatrice et inhibitrice. En effet, la participation de ces récepteurs dans l'induction des phénomènes de potentiation et de dépression de synapses excitatrice ou inhibitrice est largement reconnue au niveau du système nerveux central (Dudek & Bear, 1992 ; Mulkey & Malenka, 1992 ; Bliss & Collingridge, 1993 ; Bear & Malenka, 1994 ; Kano, 1995 ; Wang & Stelzer, 1996 ; Caillard et al., 1999b). Cependant, la question de savoir comment les récepteurs NMDA peuvent « orienter » la plasticité vers des formes de potentiation ou de dépression reste d'actualité. Il est admis que l'activation des récepteurs NMDA au niveau postsynaptique entraîne une augmentation de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire. Une faible augmentation de concentration en Ca^{2+} provoquerait l'induction de la LTD alors qu'une plus forte augmentation de concentration en Ca^{2+} serait à l'origine de l'induction de la LTP (Bear & Malenka, 1994 ; Yang et al., 1999). Ainsi, l'activation de voies signalisations différentes serait à l'origine de la différenciation entre phénomènes de LTP et de LTD.

L'activation des récepteurs NMDA nécessite la fixation de glutamate sur sa sous-unité NR2 et la fixation d'un co-agoniste sur sa sous-unité NR1. Mon objectif était d'abord de déterminer si les récepteurs NMDA sont impliqués dans l'induction de la potentiation homéostatique des afférences excitatrice et inhibitrice et ensuite de déterminer le sous-type de récepteur NMDA (ceux contenant les sous-unités NR2A et/ou ceux contenant les sous-unités NR2B) à l'origine des potentiations de l'excitation et de l'inhibition.

L'activation des récepteurs NMDA nécessite également la fixation d'un co-agoniste sur un site spécifique de la sous-unité NR1, appelé site « de liaison à la glycine ». Si pendant longtemps la glycine a été considérée comme « le » co-agoniste des récepteurs NMDA, cette notion a été contestée par la découverte dans le cerveau des mammifères de grandes quantités de D-sérine (Hashimoto et al., 1992). La D-sérine est synthétisée dans les astrocytes (Wolosker et al., 1999) par la sérine racémase qui convertit la L-sérine en D-sérine (Wolosker et al., 1999). La D-sérine est dégradée par la D-amino acide oxydase (DAAO), une enzyme

spécifique de la dégradation des acides aminés dextrogyres (Wang & Zhu, 2003) et qui possède un fort degré de colocalisation avec les récepteurs NMDA (Hashimoto et al., 1993 ; Schell et al., 1995) et particulièrement avec les sous-unités NR2A et NR2B (Snyder & Kim, 2000). De plus, plusieurs études ont démontré que la D-sérine possède une meilleure affinité pour le site de liaison à la glycine des récepteurs NMDA que la glycine (Matsui et al., 1995 ; Priestley et al., 1995 ; Furukawa & Gouaux, 2003) et cette molécule apparaît donc comme un important modulateur de la plasticité synaptique. Il a été récemment montré que le blocage du site de fixation du co-agoniste est capable de renverser la potentiation d'une forme de LTP en une forme de LTD (Krasteniakov et al., 2005).

Mon objectif a été également de déterminer la nature et le rôle de la fixation d'un co-agoniste sur la sous-unité NR1 du récepteur NMDA dans la potentiation homéostatique.

B) Résultats

1. Rôles des sous-unités NR2A et NR2B des récepteurs NMDA dans la potentiation homéostatique des afférences excitatrices et inhibitrices.

“Involvement of NR2A or NR2B-containing NMDA receptors in the potentiation of cortical layer 5 pyramidal neurons inputs depends on the developmental stage”

LE ROUX Nicolas, AMAR Muriel, MOREAU Alexandre et FOSSIER Philippe.

(Soumis à publication).

Abstract

In the cortex, NMDA receptors (NMDARs) play a critical role in the control of synaptic plasticity processes. We have previously shown in rat visual cortex that the application of a high frequency of stimulation (HFS) protocol used to induce long-term potentiation (LTP) in layer 2/3 leads to a parallel potentiation of excitatory and inhibitory inputs received by cortical layer 5 pyramidal neurons without changing the excitation/inhibition (E/I) balance of the pyramidal neuron, indicating a homeostatic control of this parameter.

We show here that the blockade of NMDARs of the neuronal network prevents the potentiation of excitatory and inhibitory inputs and this result opens to question the role of the NMDAR isoform involved in the induction of LTP, actually being strongly debated. In P18-P23 rat cortical slices, the blockade of synaptic NR2B-containing NMDARs prevents the induction of the potentiation induced by the HFS protocol, whereas the blockade of NR2A-containing NMDARs reduced the potentiation itself. In P29-P32 cortical slices, the specific activation of NR2A-containing receptors fully ensures the potentiation of excitatory and inhibitory inputs. These results constitute the first report of a functional shift in subunit composition of NMDARs during the critical period (P12-P36) which explains the relative contribution of both NR2B- and NR2A-containing NMDARs in synaptic plasticity processes. These effects of HFS protocol are mediated by the activation of synaptic NMDARs but our results also indicate that the homeostatic control of the E/I balance is independent of NMDARs activation and is due to specialized recurrent interactions between excitatory and inhibitory networks.

Keywords: NMDA receptors, LTP, NR2A, NR2B, critical period, cortical networks.

Introduction

N-methyl D-aspartate receptors (NMDARs) are among the most important receptors in the central nervous system. Largely expressed in the brain, they play a major role in glutamatergic transmission due to their unique functional properties, which include a high Ca^{2+} permeability, slow activation and deactivation kinetics, and a voltage-sensitive block by external Mg^{2+} (Jahr & Stevens, 1990; Lester *et al.*, 1990). As a result of these properties, NMDARs play key roles in numerous physiological and pathological brain processes such as synaptic plasticity (Choi & Rothman, 1990), schizophrenia (Coyle *et al.*, 2002; Coyle *et al.*, 2003) or epilepsy (Dingledine *et al.*, 1990).

The role of NMDARs in the two major forms of synaptic plasticity, long-term potentiation (LTP) and long-term depression (LTD), that contribute to phenomena of learning and memory has been largely explored. To simplify the present view, a modest elevation of intracellular calcium due to NMDARs activation is thought to trigger depression, whereas large increases of intracellular calcium trigger potentiation (Bear & Malenka, 1994; Yang *et al.*, 1999).

NMDARs are heterotetramers that consist of the NMDA receptor 1 (NR1) subunit which binds glycine or D-serine and one or more of the NR2 subunits: NR2A-NR2D which bind glutamate (Forrest *et al.*, 1994; Hollmann & Heinemann, 1994). While, NR3A (Ciabarra *et al.*, 1995; Sucher *et al.*, 1995) and NR3B (Chatterton *et al.*, 2002; Matsuda *et al.*, 2002) have also been recently identified, it is reported that NR2A and NR2B subunits dominate in the forebrain (Monyer *et al.*, 1994).

The functional properties of the receptor strongly depend on the type of NR2 subunit incorporated (Cull-Candy *et al.*, 2001; Cull-Candy & Leszkiewicz, 2004). The pattern of NR2 subunit distribution changes with age. In the cortex, the NR2B subunit is predominantly expressed early in development (Babb *et al.*, 2005) whereas expression of the NR2A subunit increases later. According to the NR2 composition, NMDARs will have different roles in synaptic plasticity, and it has been proposed that potentiation and depression are differentially mediated by NR2A and NR2B, respectively (Liu *et al.*, 2004a; Massey *et al.*, 2004). This differential effect could be related to the specific localization of NMDARs subtypes; the NR1/NR2A complex, characterized by rapid offset kinetics, would be present at the synapse, while the NR1/NR2B complex, characterized by slow kinetics, would mainly lie in extrasynaptic sites (Rumbaugh & Vicini, 1999; Tovar & Westbrook, 1999). However, recent studies contradict this hypothesis and support the idea that NR2A and NR2B both can

contribute equally to the induction of potentiation and depression (Toyoda *et al.*, 2005; Weitlauf *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2005).

In the rat visual cortex it has been shown that the NR1 subunit is co-expressed with both the NR2A and NR2B subunits (Hawkins *et al.*, 1999; Tongiorgi *et al.*, 2003; Babb *et al.*, 2005). The role of NMDARs in the induction of potentiation is well established (Bear & Kirkwood, 1993; Bliss & Collingridge, 1993) but which particular NR2 subunits are involved in this plasticity process is still a matter of controversy. We have previously shown that application of a high frequency stimulation (HFS) protocol in layer 2/3 does not change the excitatory/inhibitory (E/I) ratio due to parallel potentiation of excitatory and inhibitory inputs received by pyramidal neurons (Le Roux *et al.*, 2006). Here, we investigate the role of NMDARs in the induction of the potentiation of excitatory and inhibitory inputs of layer 5 pyramidal neurons after application of a HFS protocol in layer 2/3 in rat visual cortex (between P18 and P23 or between P29 and P32). We find that for young rats (between P18 and P32) the potentiation of excitatory and inhibitory inputs by a HFS protocol mainly depends on the activation of NR2B-containing receptors, whereas for P29-P32 old rats this plasticity becomes dependent on NR2A-containing receptors. We show that the prevention of potentiating effects on excitation and inhibition by blockade of NMDARs did not change the E/I ratio. Our results bring direct evidence of a functional shift in subunit composition of NMDARs during the critical period (P12-P36) which would explain the relative contribution of both NR2B- and NR2A-containing NMDARs in synaptic plasticity processes.

Materials and Methods

Slice preparation

Parasagittal slices containing primary visual cortex were obtained from P18-P23 or P29-P32 day-old Wistar rats. Briefly, in accordance with the guidelines of the American Neuroscience Association, a rat was decapitated, its brain quickly removed and placed in chilled (5°C) artificial cerebrospinal extracellular solution. Slices of 250 µm thickness were made using a vibratome from the primary visual cortex and then incubated for at least 1 hr at 36°C in a solution containing (in mM) : 126 NaCl, 26 NaHCO₃, 10 Glucose, 2 CaCl₂, 1.5 KCl, 1.5 MgSO₄ and 1.25 KH₂PO₄ (pH 7.5, 310-330 mOsm). This solution was bubbled continuously with a mixture of 95 % O₂ and 5 % CO₂.

Electrophysiological recordings and cell identification

Current-clamp and voltage-clamp recordings were performed using an Axopatch 1D (Axon Instruments, USA); filtered by a low-pass Bessel filter with a cut-off frequency set at 2 kHz, and digitally sampled at 4 kHz. Layer 5 pyramidal neurons, identified from the shape of their soma and primary dendrites and from their current-induced excitability pattern, were studied using the patch-clamp technique in whole-cell configuration. Somatic whole-cell recordings were performed at room temperature using borosilicate glass pipettes (of 3-5 MΩ resistance in the bath) filled with a solution containing (in mM) : 140 K-gluconate, 10 HEPES, 4 ATP, 2 MgCl₂, 0.4 GTP, 0.5 EGTA (pH 7.3 adjusted with KOH, 270-290 mOsm). The membrane potential was corrected off-line by -10 mV to account for the junction potential. Estimation of the access resistance (R_s) is critical to quantitatively evaluate the relative change of input conductance in response to synaptic activation. After capacitance neutralisation, bridge balancing was done on-line in current-clamp conditions, which provided us with an initial estimate of R_s. This value was checked and revised as necessary off-line by fitting the voltage response to a hyperpolarizing current pulse with the sum of two exponentials. Under voltage-clamp conditions, the holding potential was corrected off-line using this R_s value. Only cells with a resting membrane potential more negative than -55 mV and recordings with an access resistance lower than 25 MΩ were kept for further analysis. The firing behavior of neurons was determined in response to depolarizing current pulses ranging from -100 to 200 pA under current-clamp conditions.

The stimulating electrodes were positioned in layer 2-3. Electrical stimulations (1-10 μ A, 0.2 ms duration) were delivered in these layers using 1 M Ω impedance bipolar tungsten electrodes (TST33A10KT, WPI). The intensity of the stimulation was adjusted in current-clamp conditions to induce a subthreshold postsynaptic response due to coactivation of excitatory and inhibitory circuits. Under voltage-clamp conditions, the frequency of stimulation was 0.05 Hz and five to eight trials were repeated for a given holding potential.

A control recording was made after 15 min of patch-clamp equilibration at 0.05 Hz, and then drugs were continuously superfused during 20 min, a “drug recording” was made in the same conditions. We next applied a HFS (high frequency of stimulation) protocol in order to induce long term modifications of synaptic strength in the recruited circuits. The HFS protocol was elicited with theta burst stimulation known to induce long term potentiation (LTP) at the synaptic level. It consists of 3 trains of 13 bursts applied at a frequency of 5 Hz, each burst containing 4 pulses at 100 Hz (Abraham & Huggett, 1997). Recordings were made at 0.05 Hz after 15, 30, 45 and 60 min application of HFS protocol. A LFS (low frequency of stimulation) protocol was also used, it consists of a 1 Hz stimulation applied during 15 min.

Drugs

D-AP5, Ro-256981 were purchased from Sigma (St-Louis, Missouri), NVP-AAM077 was a gift from Dr. Y.P. Auberson (Novartis Institutes for BioMedical Research, Basel Switzerland) and CP 101,606 was a gift from Pfizer (Groton, Connecticut, USA). Drugs were dissolved in the perfusate for at least 15 min before recordings.

Synaptic response analysis

Data were analyzed off-line with specialized software (Acquis1TM and ElphyTM: written by Gérard Sadoc, Biologic UNIC-CNRS, France). The method is based on the continuous measurement of conductance dynamics during stimulus-evoked synaptic responses, as primarily described *in vivo* on cat cortex (Borg-Graham *et al.*, 1998; Monier *et al.*, 2003) and recently validated on rat visual cortex (Le Roux *et al.*, 2006). This method has received further validation on other experimental models (Shu *et al.*, 2003; Wehr & Zador, 2003; Higley & Contreras, 2006; Le Roux *et al.*, 2006). Evoked synaptic currents were measured and averaged at a given holding potential. In I-V curves for each delay (t), the value of the holding potential (V_h) was corrected (V_{hc}) from the ohmic drop due to the leakage current through R_s, by the equation: $V_{hc}(t) = V_h(t) - I(t) \times R_s$. An average estimate of the input conductance waveform of the cell was calculated from the best linear fit (mean least square

criterion) of the I-V curve for each delay (t) following the stimulation onset. Only cells showing a Pearson correlation coefficient for the I-V linear regression higher than 0.95 between -90 and -40 mV were considered in order to calculate the conductance change of the recorded pyramidal neuron from the slope of the linear regression.

The evoked synaptic conductance term ($g_T(t)$) was derived from the input conductance by subtracting the resting conductance (g_{rest}) estimated 90 ms before the electrical stimulation. The apparent reversal potential of the synaptic current at the soma ($E_{syn}(t)$) was taken as the voltage abscissa of the intersection point between the I-V curve obtained at a given time (t) and that determined at rest. Assuming that the evoked somatic conductance change reflects the composite synaptic input reaching the soma, $E_{syn}(t)$ characterizes the stimulation-locked dynamics of the balance between excitation and inhibition.

Decomposition of the synaptic conductance

To decompose the global evoked synaptic conductance ($g_T(t)$) into excitatory and inhibitory components ($g_E(t)$ and $g_I(t)$), we used the following simplifications: $I_{syn}(t) = g_E(t) (E_{syn}(t) - E_{exc}) + g_I(t) (E_{syn}(t) - E_{inh})$ and $g_T(t) = g_E(t) + g_I(t)$ where $I_{syn}(t)$ is the total synaptic current, $E_{syn}(t)$ is the apparent reversal potential at the soma (see the previous paragraph), $g_E(t)$ and $g_I(t)$ are excitatory and inhibitory conductances respectively and E_{exc} and E_{inh} are the reversal potentials for excitation and inhibition. Values of these reversal potentials were equal to 0 mV for excitation (E_{exc}) and to -80 mV for inhibition (E_{inh}). The value of -80 mV used in the decomposition method is the reversal potential of $GABA_A$ (and not an intermediate value between $GABA_A$ and $GABA_B$) because in the presence of QX314 (which blocks K^+ efflux), no variation of the synaptic response was observed.

We showed that the I-V curve in the presence of excitatory synaptic transmission blockers (CNQX, D-AP5) is linear between -80 to +10 mV with a reversal potential equal to -80 mV (Le Roux *et al.*, 2006; supplementary material). In the presence of bicuculline, which blocks the inhibitory inputs on the layer 5 pyramidal neuron, the I/V curve for excitation is linear between -80 to +10 mV with a reversal potential equal to 0 mV (data not shown) as already shown by other studies (Wehr & Zador, 2003; Higley & Contreras, 2006). Under our experimental conditions of stimulation of cortical layers leading to subthreshold postsynaptic responses, $E_{syn}(t)$ which was extrapolated from I-V curves took any intermediate values between -80 mV and -40 mV (Le Roux *et al.*, 2006; supplementary material) *i.e.* within the limits of our voltage excursion (-90 to -40 mV) corresponding to the linearity of I-V curves

and between the respective values of E_{inh} and E_{exc} in such a way that the mathematical conditions of the oversimplification used to calculate $g_I(t)$ and $g_E(t)$ were fulfilled.

Like all somatic recordings, our recordings cannot make rigorous estimates of synaptic events in the distal dendrites and the conductance estimates are ratios of the overall excitatory and inhibitory drive contained in the local stimulated network (Haider *et al.*, 2006). However, our measurements give relative changes in conductance magnitude which reflect the cumulative contributions of excitation and inhibition arriving at proximal portions of the neuron. These relative conductance changes at the somatic level is precisely the result of synaptic dendritic integration that we wish to record at the somatic level because it determines the output signal from the neuron (Wehr & Zador, 2003; Higley & Contreras, 2006).

To quantify the synaptic conductance changes we calculate the integral (int) over a time window of 200 ms. The contribution of each component was expressed by the ratio of its integral value (intgE or intgI) to that of total conductance change (intgT).

Statistical analysis

Data are expressed as the mean \pm the standard deviation of the mean (SD) of n cells. Statistical analyses were performed using the parametrical t -test for paired samples. In this latter case, data were expressed as percents of control values. Data were considered statistically significant for $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**), and $p \leq 0.001$ (***)

Results

Involvement of NMDARs in the potentiation of excitatory and inhibitory inputs on cortical layer 5 pyramidal neurons induced by HFS protocol application in layer 2/3.

Figure 1A-C presents representative current recordings in a layer 5 voltage-clamped pyramidal neuron to electrical stimulation (0.05 Hz) in layer 2/3. Current responses show a strong inward current followed by an outward component (Fig. 1A). Decomposition of these current responses into distinct conductance changes showed that, as already reported (Le Roux *et al.*, 2006), inhibition (gI) represents roughly 80 % (light grey trace) and excitation (gE) 20 % (dark grey trace) of the global conductance change (black trace, Fig. 1A1). Application of 50 μ M D-AP5, a specific antagonist of NMDA receptors (Yoshimura *et al.*, 2003; Huemmeke *et al.*, 2004), for 20 min did not induce significant differences in the global, excitatory and inhibitory conductance changes (Fig. 1A2). These results clearly show that the excitatory and inhibitory components recorded in a layer 5 pyramidal neuron in response to a low frequency of stimulation (0.05 Hz) of layer 2/3 does not depend on activation of NMDA receptors but corresponds to the activation of AMPA and GABA_A receptors mainly located on the apical dendrite of the layer 5 pyramidal neuron.

In the brain, information is encoded as action potential trains of higher frequency than that used in our protocol (0.05 Hz). We applied a HFS protocol with a higher frequency (see methods), usually used to induce LTP in numerous preparations. Application of this HFS protocol in layer 2/3 induced a long term potentiation of both excitatory and inhibitory inputs on layer 5 pyramidal neurons. Figure 1B shows representative current recordings in a voltage clamp pyramidal neuron, in control condition (Fig. 1B1) and 15 minutes after application of a HFS protocol (Fig. 1B2). HFS application elicits enhanced current responses and increases conductance changes. The statistical analysis of the global population (n = 24) is presented on figure 1D and shows that 15, 30, 45 and 60 min after the HFS protocol, the total, excitatory and inhibitory conductance changes are potentiated by about 45, 35 and 48 %, respectively. However, no significant change in excitation (intgE) and inhibition (intgI) conductance integrals expressed as percent of intgT was measured (Fig 1D, right part) in such a way that the E/I balance was unchanged.

In order to examine the involvement of NMDARs activation in these potentiating effects of HFS on excitatory and inhibitory inputs, HFS protocol was applied in the presence of 50 μ M D-AP5.

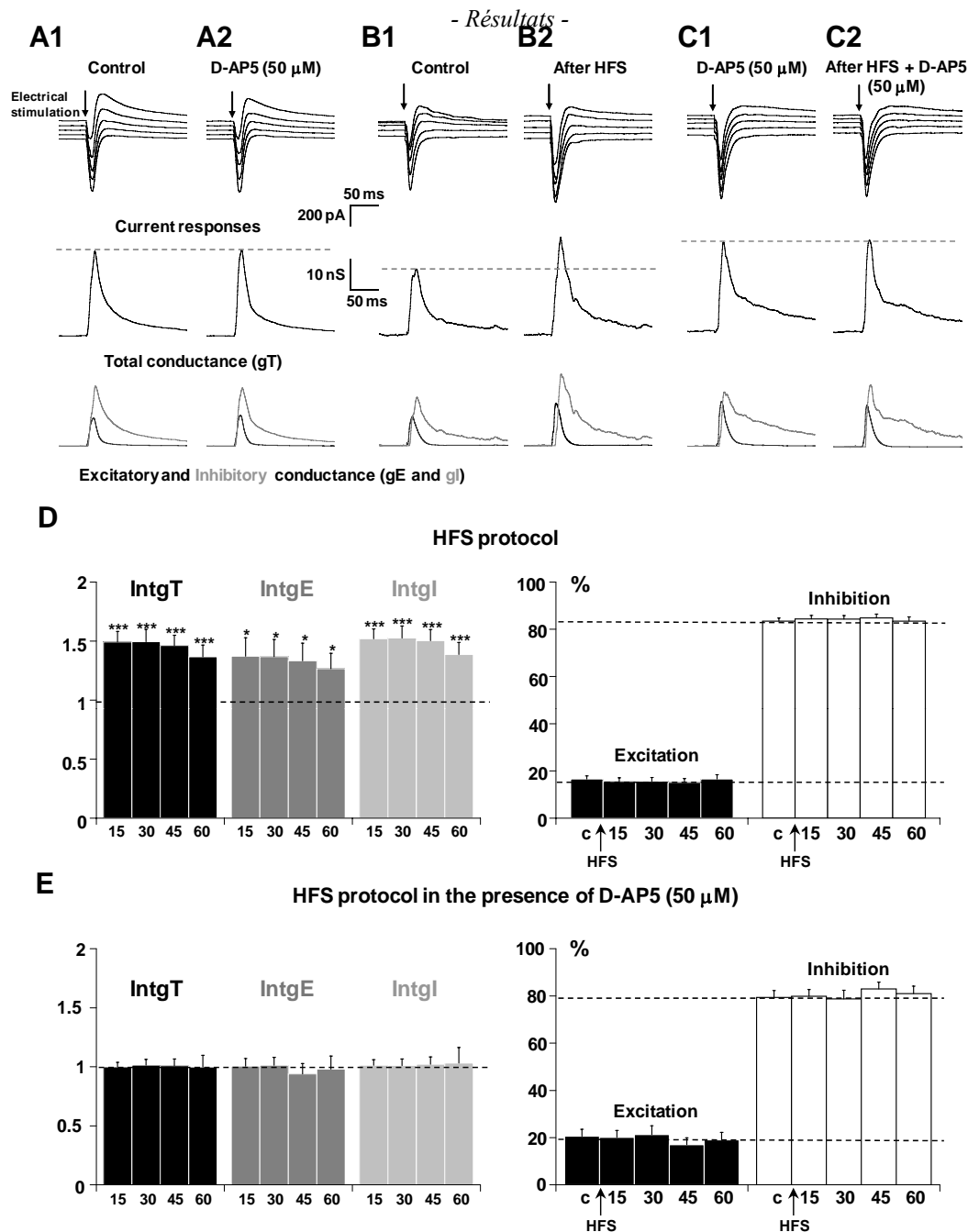


Figure 1. Effects of NMDA receptor blockade on the potentiation of layer 5 pyramidal neurons inputs.

(A-C) **Upper traces:** current responses of a layer 5 pyramidal neuron to electrical stimulation (black arrow) applied in layer 2/3: (A1) in control conditions and (A2) 20 min after perfusion of 50 μ M D-AP5; holding potentials scaled from -75 (bottom trace) to -55 mV (top trace, steps equal to 5 mV). (B1) In control conditions and (B2) 15 min after HFS protocol; holding potentials scaled from -70 (bottom trace) to -50 mV (top trace, steps equal to 5 mV). (C1) 20 min after application of 50 μ M D-AP5 and (C2) 15 min after HFS protocol in the presence of D-AP5; holding potentials scaled from -75 (bottom trace) to -55 mV (top trace, steps equal to 5 mV). **Medium traces:** decomposition of the responses in total conductance change (gT). **Lower traces:** decomposition of gT in excitatory (gE, dark grey) and inhibitory (gI, light grey) conductance changes. Note that, for stimulation in layer 2/3 in the presence of D-AP5, no significant change of the response was observed. HFS protocol induced an increase of total, excitatory and inhibitory conductance changes which was prevented in the presence of D-AP5.

(D) Left part: relative changes (compared to control) of intgT (black), intgE (dark grey) and intgI (light grey), after application of HFS protocol in layer 2/3 in control conditions ($n = 26$) (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, and * $p < 0.05$, t-test). Right part: relative contribution of excitatory and inhibitory conductances to the total conductance change, after HFS (c: control before HFS protocol).

(E) Left part: relative changes (compared to control) of intgT (black), intgE (dark grey) and intgI (light grey), after HFS in layer 2/3 ($n = 15$) in the presence of 50 μ M D-AP5. Right part: relative contribution of excitatory and inhibitory conductances to the total conductance change, after HFS in the presence of 50 μ M D-AP5 (c: control before HFS protocol).

No significant increase of current responses and conductance changes was measured (Fig. 1C1 and 1C2). No variation of the total conductance change and of inhibitory or excitatory conductance changes was observed through the statistical analysis of the total neuronal population ($n = 15$; Fig. 1E). Under this condition, the HFS protocol failed to induce potentiation of excitatory and inhibitory inputs. No significant changes in excitation (intgE) and inhibition (intgI) conductance integrals expressed as percent of intgT was measured (Fig. 1E) and the E/I ratio did not change. These results indicate that NMDARs are recruited by high frequency of stimulation applied in layer 2/3.

Involvement of NR2A and/or NR2B-containing receptors in the potentiation of excitatory and inhibitory inputs of cortical layer 5 pyramidal neurons induced by HFS protocol application in layer 2/3.

The involvement of NR2A and/or NR2B-containing receptors in synaptic plasticity is presently strongly debated (Liu *et al.*, 2004b; Massey *et al.*, 2004; Berberich *et al.*, 2005; Weitlauf *et al.*, 2005). To further characterise whether NMDA currents in layer 2/3 pyramidal neurons were due to the activation of NR2A- or NR2B-containing receptors, we then used antagonists for each of these receptors.

Role of NR2B-containing receptors in P18-P23 old rats

Ro 25-6981 (Yang *et al.*, 2006) or CP101,606 (Traxoprodil, (Chenard *et al.*, 1995; Menniti *et al.*, 1997) were used to specifically block NR2B-containing receptors. Representative recordings in the presence of 1 μ M of Ro 25-6981 before and after application of HFS protocol showed that the HFS effect was blocked by the NR2B antagonist (Fig. 2A). The statistical analysis of the global population ($n = 12$; Fig.2B) confirms that no significant variations of the global, excitatory and inhibitory conductance changes were observed after application of HFS protocol in layer 2/3 in the presence of Ro 25-6981. Consequently, the E/I ratio was unchanged (Fig. 2C). Identical results were obtained after application of HFS protocol in the presence of CP101,606 ($n = 18$; Fig. 2D, 2E, 2F). These results reproduced those observed in the presence of D-AP5 and provide evidence for an involvement of NR2B-containing receptors in the HFS-induced potentiation of both excitatory and inhibitory inputs on layer 5 pyramidal neurons.

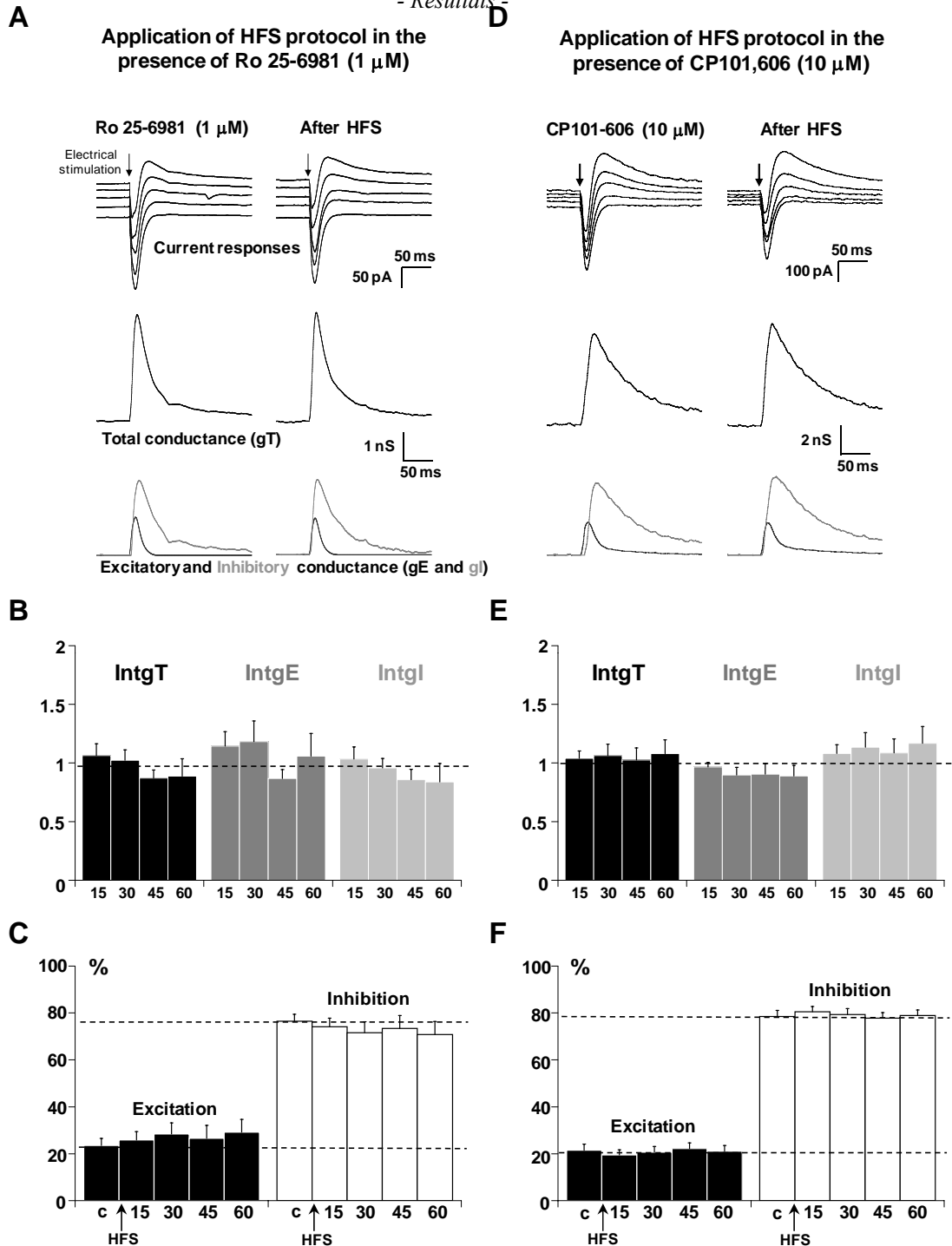


Figure 2. Effects of the blockade of NR2B-containing receptors on the potentiation of layer 5 pyramidal neurons inputs for P18-P23 old rats.

(A) The left column shows representative recordings before HFS application and the right column 60 min after application of HFS in layer 2/3 in the presence of 1 μ M Ro 25-6981. **Upper traces:** current responses of a layer 5 pyramidal neuron to electrical stimulation. Imposed membrane potential ranged for -55 to -75 mV. The amplitude of current responses was unchanged after HFS application in the presence of Ro 25-6981. **Medium traces:** decomposition of the responses in total conductance change (gT). **Lower traces:** decomposition of gT in excitatory and inhibitory conductance changes (gE, dark grey and gI, light grey).

(B) Relative changes (compared to control) of intgT (black bars), intgE (dark grey bars) and intgI (light grey bars), after HFS in layer 2/3 ($n = 12$) in the presence of 1 μ M Ro 25-6981.

(C) Relative contribution of excitation and inhibition conductance changes to the total conductance change, after HFS in the presence of 1 μ M Ro 25-6981 (c: control before HFS protocol).

(D-E-F) Application of HFS protocol in the presence of 10 μ M CP101,606 ($n = 18$). Legends are identical to those in A-B-C. No variations of total, excitatory and inhibitory conductance changes were observed after HFS (D-E) and the E/I ratio was unchanged (F).

Role of NR2A-containing receptors

NVP-AAM077 (Izumi *et al.*, 2006) or Zn^{2+} (Paoletti & Neyton, 2006) were used to block NR2A-containing receptors. Representative recordings in the presence of 0.1 μ M of NVP-AAM077, before and after application of HFS protocol showed an increase in the amplitude of current recordings (Fig. 3A, upper traces). Decomposition in conductance showed an increase of total, excitatory and inhibitory conductance changes (Fig. 3A, middle and lower traces). The statistical analysis of the global population ($n = 13$; Fig 3B) indicated that application of HFS protocol in the presence of NVP-AAM077 still induced a significant potentiation of the global and inhibitory conductance changes for 45 min. IntgT was enhanced by 26 % ($p < 0.01$), 21 % ($p < 0.05$) and 34 % ($p < 0.05$), 15, 30 and 45 min respectively after HFS protocol. IntgI was significantly enhanced in the same proportions but IntgE was not significantly increased ($p > 0.05$). In any case, no potentiating effect remains 60 min after HFS protocol. Consequently, the E/I ratio was decreased ($p < 0.01$, Fig. 3C) 15 min after HFS protocol but recovered its control value 30, 45 and 60 min after HFS protocol.

$ZnCl_2$ was also used to block selectively NR2A-containing receptors because low concentrations of Zn^{2+} block NR2A receptors more than NR2B receptors (Amar *et al.*, 2001; Kohr, 2006; Neyton & Paoletti, 2006). As observed for NVP-AAM077, similar results were obtained in the presence of 200 nM of $ZnCl_2$. We showed for a representative recordings presented on figure 3D that current recordings, total, excitatory and inhibitory conductance changes were all increased. This result was confirmed by the statistical analysis of the global population ($n = 13$; Fig. 3E), which showed that HFS application in the presence of Zn^{2+} leads to a mean increase by 26 %, 18 % and 30 % for the total, excitatory and inhibitory conductance changes respectively. In this case, a slight but not significant ($p > 0.05$) decrease of the E/I ratio was observed (Fig. 3F). In the presence of NR2A-containing receptors blockers, the potentiating effects of the HFS protocol on layer 5 pyramidal neurons still occurred but were reduced.

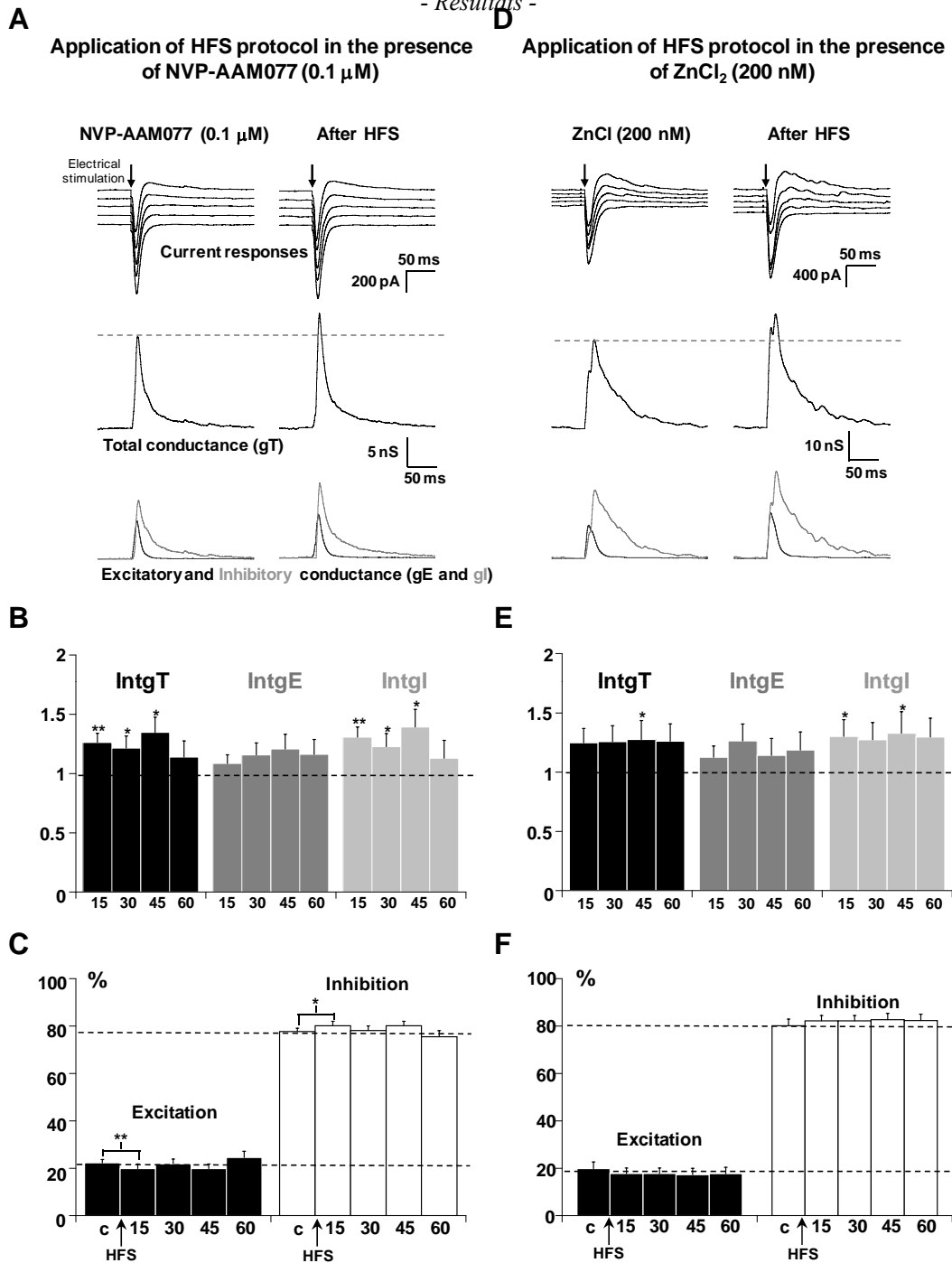


Figure 3. Effects of the blockade of NR2A-containing receptors on the potentiation of layer 5 pyramidal neurons inputs for P18-P23 old rats.

(A) The left column shows representative recordings before HFS application and the right column 60 min after application of HFS in layer 2/3 in the presence of 0.1 μ M NVP-AAM077. **Upper traces:** current responses of a layer 5 pyramidal neuron to electrical stimulation. Imposed membrane potential ranged for -55 to -75 mV. The amplitudes of current responses were slightly increased after HFS application. **Medium traces:** decomposition of the responses in total conductance change (gT). **Lower traces:** decomposition of gT in excitatory and inhibitory conductance changes (gE, dark grey and gI, light grey). Total, excitatory and inhibitory conductance changes were all increased.

(B) Relative changes (compared to control) of intgT (black bars), intgE (dark grey bars) and intgI (light grey bars), after HFS in layer 2/3 ($n = 13$) in the presence of 0.1 μ M NVP-AAM077. (** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$, t-test).

(C) Relative contribution of excitation and inhibition conductance changes to the total conductance change, after HFS in the presence of 0.1 μ M NVP-AAM077 (c:control before HFS protocol).

(D-E-F) Application of HFS protocol in the presence of 200 nM ZnCl₂ ($n = 13$). Legends are identical to those in A-B-C. (D) Imposed membrane potential ranged for -60 to -80 mV. (E-F) Total, excitatory and inhibitory conductance changes were increased after HFS.

Involvement of extrasynaptic NR2B-containing receptors in potentiation of excitatory and inhibitory inputs on layer 5 pyramidal neurons.

NR2B receptors are known to be present in both synaptic and extrasynaptic domains at glutamatergic synapses (Cull-Candy *et al.*, 2001). To check the involvement of synaptic and/or extrasynaptic NR2B-containing receptors in HFS induced-potentiation of excitatory and inhibitory inputs on layer 5 pyramidal neurons, synaptic NMDARs were blocked according to the protocol described by Massey *et al.* (2004) using MK-801, an antagonist of NMDARs that acts only on open channels. MK-801 (10 μ M) was bath-applied and a low frequency stimulation protocol (LFS) was delivered in order to activate synaptic NMDARs which can then be blocked whereas extrasynaptic receptors are not activated by this protocol of stimulation. MK-801 was then washed out for 30 min and HFS protocol of stimulation was applied in layer 2/3.

To start, a control condition (omitting MK-801) was used in order to check that application of LFS protocol does not prevent the potentiation induced by the HFS protocol. Significant potentiations were observed for IntgT (by 39 %, $p < 0.05$), for IntgI (by 42 %, $p < 0.05$) and for IntgE (by 22 %, $p < 0.05$) (Fig 4A for representative recordings and Fig. 4B for the statistical analysis of the global population, $n = 14$) and the E/I ratio slightly decreases (Fig. 4C). However, the increased percentage of intgE was lower than that obtained after a direct HFS protocol. This discrepancy might be due to the prolonged depressive effects (beyond 30 min) of LFS protocols (mainly on intgE) that we have shown (Le Roux *et al.*, 2006). Nevertheless, it was possible to obtain a potentiating effect with a HFS protocol, and we could thus test the HFS protocol in the presence of MK801. In the presence of MK-801, no potentiation of excitatory and inhibitory inputs was obtained, but a slight decrease of IntgT, IntgE and IntgI was observed (Fig. 4D for representative recordings and Fig. 4E for statistical analysis of the global population, $n = 13$) and the E/I ratio remains stable (Fig. 4F), indicating that synaptic NMDARs can account for the potentiation of excitatory and inhibitory inputs of layer 5 pyramidal neurons.

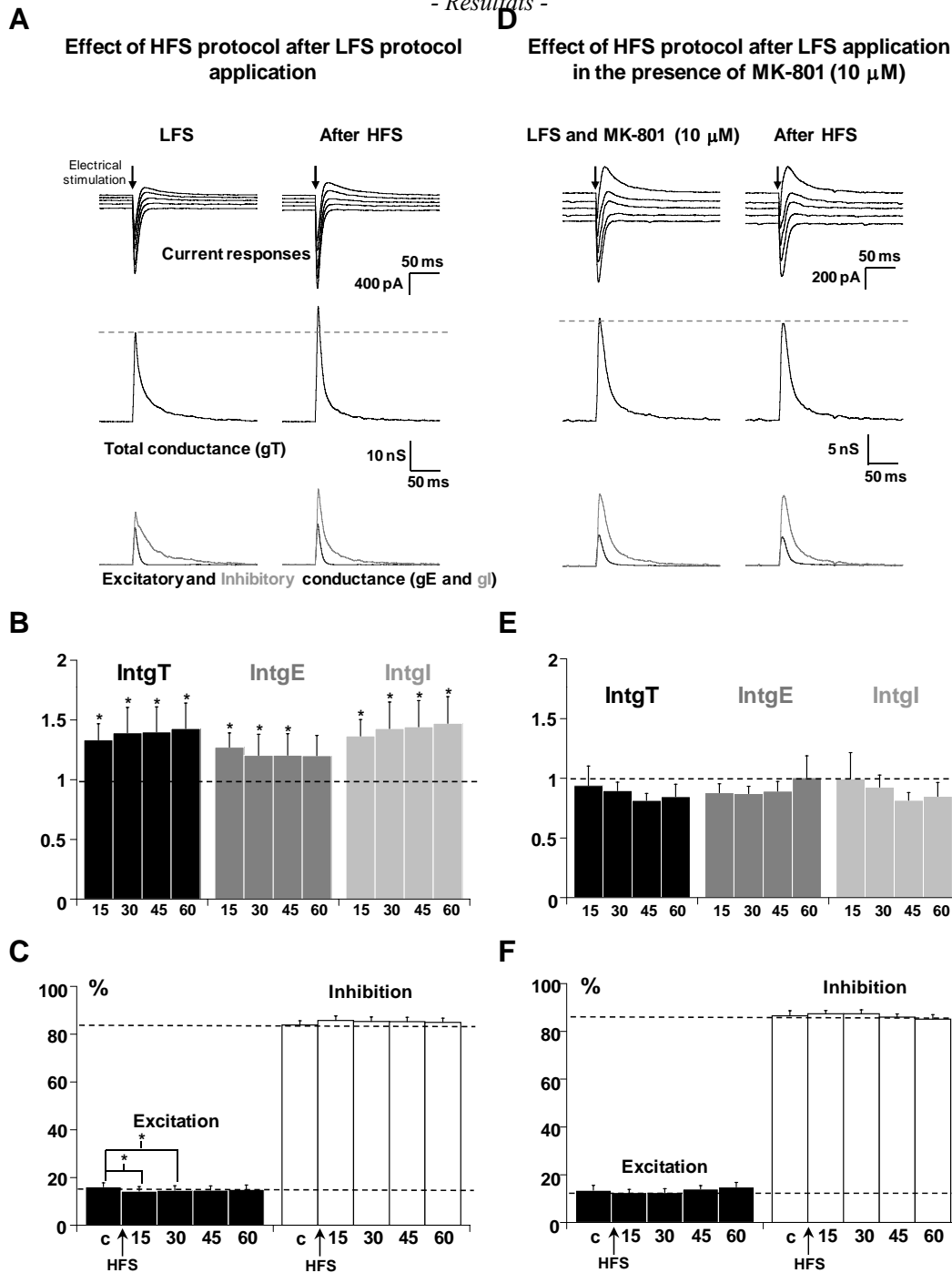


Figure 4. Effect of synaptic NMDARs blockade on the potentiation of layer 5 pyramidal neurons inputs.

(A) Left column: representative recordings after application of LFS protocol in layer 2/3. Right column: the LFS protocol was followed by a HFS protocol and recordings were done 60 min after the HFS protocol. **Upper traces:** current responses of a layer 5 pyramidal neuron to electrical stimulation. Imposed membrane potential ranged for -60 to -80 mV. The amplitudes of current responses were increased after HFS application. **Medium traces:** decomposition of the responses in total conductance change (gT). **Lower traces:** decomposition of gT in excitatory and inhibitory conductance changes (gE, dark grey and gI, light grey). Total, excitatory and inhibitory conductance changes were all increased.

(B) Relative changes (compared to control) of intgT (black bars), intgE (dark grey bars) and intgI (light grey bars), after HFS in layer 2/3 ($n = 14$) after application of LFS protocol. (***) $p < 0.001$, (**) $p < 0.01$ and (*) $p < 0.05$, t-test).

(C) Relative contribution of excitation and inhibition conductance changes to the total conductance change, after application of LFS protocol, without MK 801. (c:control before HFS protocol).

(D-E-F) Application of HFS after application of a LFS protocol in the presence of $10 \mu\text{M}$ MK-801 ($n = 13$). Legends are identical to those in A-B-C. No significant variations of total, excitatory and inhibitory conductance changes were observed after HFS.

Role of NR2A and/or NR2B-containing receptors in the potentiation of excitatory and inhibitory inputs in P29-P32 old rats.

Some studies suggest that the activation of NR2A but not of NR2B induces long-term potentiation (Liu *et al.*, 2004b; Massey *et al.*, 2004) while other studies proposed that both types of NMDARs can contribute to the induction of LTP (Berberich *et al.*, 2005; Weitlauf *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2005). These discrepancies may be related to temporal regulation of NR2 subunits (Monyer *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 2004b). The NR2A/NR2B ratio increases with maturation (Yoshimura *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004c). Our results indicate that for rats between P18 and P23, synaptic NR2B-containing receptors are functional while NR2A-containing receptors may not yet be fully functional. To check this hypothesis, a new series of experiments was done on P29-P32 old rats.

Role of NR2B-containing receptors in P29-P32 rats

Representative recordings in the presence of 1 μM Ro 25-6981, before and after application of HFS protocol showed an increase of the amplitude of current recordings (Fig. 5A, upper traces). Decomposition in conductance changes showed an increase of total, excitatory and inhibitory conductance changes (Fig. 5A, middle and lower traces). The statistical analysis of the global population ($n = 12$; Fig 5B) indicated that application of HFS protocol in the presence of Ro 25-6981 still induced a significant potentiation of the global and inhibitory conductance changes for 45 min. IntgT was enhanced by 42 %, intgE by 40 % and intgI by 51 % after HFS protocol application. Due to parallel potentiation of intgE and intgI, no significant change of the E/I ratio was observed (Fig. 5C).

Role of NR2A-containing receptors in P29-P32 rats

Representative recordings in the presence of 0.1 μM NVP-AAM077 before and after application of HFS protocol showed no significant variation (Fig. 5D). The statistical analysis of the global population ($n = 13$; Fig.5E) confirms the block of the effects of the HFS protocol in the presence of the NR2A-containing receptors blocker for P29-P32 old rats. Consequently, the E/I ratio was unchanged (Fig. 5F).

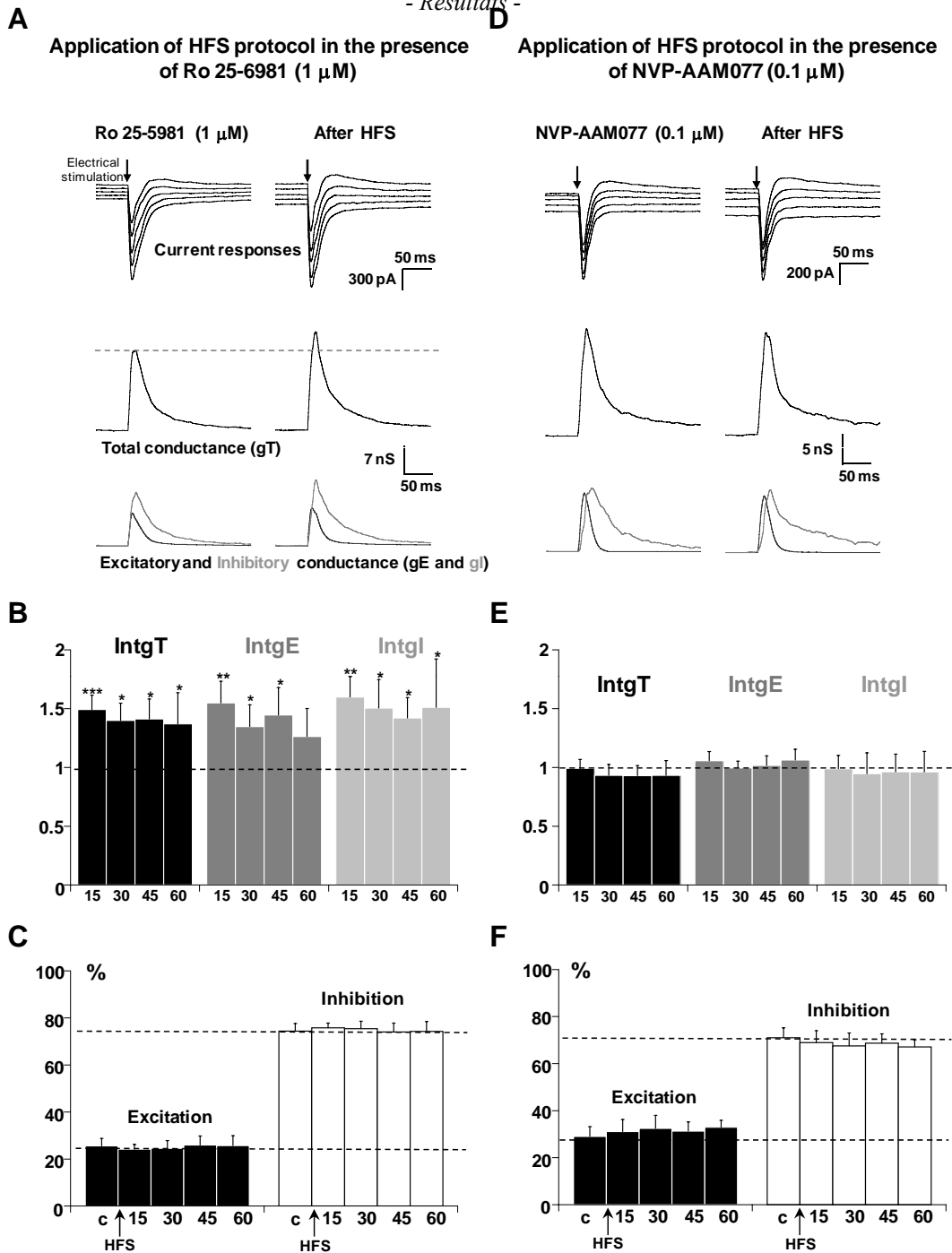


Figure 5. Effects of the blockade of NR2B or NR2A-containing receptors on the potentiation of layer 5 pyramidal neurons inputs for P29-P32 old rats.

(A) The left column shows representative recordings from the statistical analysis of $n = 12$ experiments before HFS application and the right column 60 min after application of HFS in layer 2/3 in the presence of 1 μ M Ro 25-6981. **Upper traces:** current responses of a layer 5 pyramidal neuron to electrical stimulation. Imposed membrane potential ranged for -55 to -75 mV. The amplitude of current responses was increased after HFS application. **Medium traces:** decomposition of the responses in total conductance change (gT). **Lower traces:** decomposition of gT in excitatory and inhibitory conductance changes (gE, dark grey and gI, light grey). Total, excitatory and inhibitory conductance changes were all increased.

(B) Relative changes (compared to control) of $IntgT$ (black bars), $IntgE$ (dark grey bars) and $IntgI$ (light grey bars), after HFS in layer 2/3 ($n = 12$) in the presence of 1 μ M Ro 25-6981.

(C) Relative contribution of excitation and inhibition conductance changes to the total conductance change, after HFS in the presence of 1 μ M Ro 25-6981 (c: control before HFS protocol).

(D-E-F) Application of HFS protocol in the presence of 0.1 μ M NVP-AAM077 ($n = 13$). Legends are identical to those in A-B-C. No variations of total, excitatory and inhibitory conductance changes were observed after HFS (D-E) and the E/I ratio was unchanged (F).

Discussion

NMDAR activation is required for the potentiation of excitatory and inhibitory inputs on layer 5 pyramidal neurons after application of a HFS protocol in layer 2/3 and our results provide evidence for a major recruitment of synaptic NR2B-containing receptors in P18-P23 old rats, compared to the involvement of NR2A-receptors. As well as their possible differential role in physiological processes such as learning and memory (Collingridge *et al.*, 2004), NR2A or NR2B-containing receptors are thought to be differentially involved in some central disorders such as chronic pain or dementia (Kemp & McKernan, 2002; Chazot, 2004; Paoletti & Neyton, 2006). It therefore becomes important to determine the contribution and the function of distinct NMDAR subtypes. However, this physiological classification is highly dependent on the selectivity of antagonists that can be used. Ro 25-6981 (ifenprodil) and CP,101-606 (traxoprodil) which bind the N-terminal lysine/isoleucine/valine-binding protein (LIVBP)-like domain of NR2B are now considered as selective antagonists of NR2B-containing receptors (Fischer *et al.*, 1997; Berberich *et al.*, 2005; Kohr, 2006). On the contrary, the specific blockade of NR2A-containing receptors is strongly debated (Feng & Macdonald, 2004; Paoletti & Neyton, 2006). First, Zn^{2+} binds the (LIVBP)-like domain of NR2A and displays a better selectivity for NR2A than for NR2B with a maximal selectivity of 70 % (Amar *et al.*, 2001; Kohr, 2006; Neyton & Paoletti, 2006). Second, NVP-AAM077 was originally described as a highly selective antagonist of NR2A-containing receptors (Auberson *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2004b; Massey *et al.*, 2004) but later studies on rodents indicate that this compound lacks selectivity for NR2A vs NR2B receptors (Berberich *et al.*, 2005; Weitlauf *et al.*, 2005; Neyton & Paoletti, 2006). Other studies reported that NVP-AAM077 presents some selectivity at concentrations lower than 1 μ M (Bartlett *et al.*, 2006; Izumi *et al.*, 2006) and concluded that it was not possible to find a concentration of NVP-AAM077 that fully block the NR2A receptors whilst sparing NR2B. According to the work by Bartlett *et al.* (2006), we used 0.1 μ M NVP-AAM077 to check the specific blockade of NR2A receptors. Indeed, whatever the NR2A antagonist used, the potentiation of excitatory and inhibitory inputs of layer 5 pyramidal neurons occurred but was reduced by about 40 % in P18-P23 old rats. This result could be due to the blockade of NR2A, but also to an unspecific blockade of NR2B subunits.

Recent studies suggest that the activation of NR2A but not NR2B induces long-term potentiation (Liu *et al.*, 2004b; Massey *et al.*, 2004) although other studies proposed that both types of NMDARs can contribute to the induction of LTP (Berberich *et al.*, 2005; Weitlauf *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2005). These discrepancies could be related to the differential distribution of NMDARs subtypes. For example, an important role for extrasynaptic receptors exclusively containing the NR2B subunit (Cull-Candy *et al.*, 2001) is reported in synaptic plasticity (Massey *et al.*, 2004) or in neuronal cell death (Hardingham *et al.*, 2002; Hardingham, 2006). However a recent work suggests that both NR2A- or NR2B-NMDAR subtypes can be located either on synaptic or extrasynaptic sites (Thomas *et al.*, 2006). Here, we show that predominantly synaptic NMDARs are implicated in the observed potentiating effects. Another possibility is to consider changes in the spatial distribution of NMDA receptors during the developmental stages. While NR1 subunit is ubiquitously expressed in the CNS, NR2 subunit expression is temporally regulated (Monyer *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 2004b). The NR2A/NR2B ratio increase with maturation (Yoshimura *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004c). In the rat visual cortex, morphological studies showed that NR1 and NR2B subunits are already expressed at birth and reach their highest level of expression during the second and third postnatal week (Kew *et al.*, 1998; Tongiorgi *et al.*, 2003; Babb *et al.*, 2005). In contrast, the NR2A subunit is poorly expressed at birth but progressively increases as development proceeds (Kew *et al.*, 1998) and the insertion of NR2A receptors displace NR2B receptors at extrasynaptic sites (Liu *et al.*, 2004c). Our results clearly show that the potentiation mainly depends on NR2B-containing receptors for P18-P23 old rats, but becomes NR2A dependent for P29-P32 old rats. Thus in order to understand the particular role of NR2A or NR2B in the potentiation process, it is crucial to consider the temporal and spatial NMDARs expression. Hence, rather than a differential role for NR2A- or NR2B-containing receptors in the induction of LTP supposed by recent works (Berberich *et al.*, 2005, Weitlauf *et al.*, 2005, Zhao *et al.*, 2005), we proposed that both types can be involved in the potentiation but their respective involvement depends on the developmental stage of the cortex.

Our results reinforce our hypothesis about the selectivity of the antagonists of NR2A or NR2B-containing receptors. Indeed, we show that without under estimating the problem of selectivity of the molecules, it is necessary to consider the developmental stages of the animal, and for instance we can't raise the possibility that, for P18-P23 old rats, NR2A-containing receptors were present but not yet fully functional, whereas for P29-P32 old rats specific blockers were rather efficient.

The blockade of NMDA receptors prevents the potentiation of excitatory and inhibitory inputs on layer 5 pyramidal neurons to HFS in layer 2/3 resulting in an unchanged E/I ratio. These results suggest that the NMDARs activation is not required for the induction of the homeostatic control of the E/I balance but is necessary for the homeostatic plasticity expression. Only a few studies report a similar observation in which the blockade of NMDARs prevents the potentiation of inhibitory synapses (IPSCs recorded in cerebellar stellate cells, (Liu & Lachamp, 2006)). It is obvious that we cannot localize facilitated synapses in the stimulated networks by HFS protocol and we observed that the stimulation of inhibitory interneurons is mainly disynaptic, involving a synapse between a glutamatergic terminal and the interneuron (Le Roux *et al.*, 2006; Supplementary materials). Thus the potentiation of inhibitory inputs following HFS protocol in layer 2/3 is likely indirect, but in any case parallel increases of the strength of excitatory and inhibitory inputs on the layer 5 pyramidal neuron were observed resulting in a close control of the E/I ratio. Indeed, normal brain function requires a delicate balance between excitation and inhibition in neuronal networks, an imbalance of excitation and inhibition underlies various neurological diseases such as epilepsy (Cossart *et al.*, 2005), Parkinson's disease (Llinas *et al.*, 1999) or schizophrenia (Wassef *et al.*, 2003). A correlation between excitatory and inhibitory neuronal responses to sensory stimuli has been found in many cortical neurons in adult mammalian sensory cortices. For example, in cat primary visual cortex, excitation and inhibition exhibit similar tuning preference and tuning width in orientation-selective neurons (Anderson *et al.*, 2000; Martinez *et al.*, 2002; Monier *et al.*, 2003; Hirsch *et al.*, 2003; Marino *et al.*, 2005). In addition, a proportionality of recurrent excitation and inhibition in cortical networks has been demonstrated to be associated with the persistent activity, which is thought to underlie the working memories (Shu *et al.*, 2003). So, neuronal networks adapt to environmental changes by learning and memory, in which the strength of excitatory or inhibitory synapses were changed. We show a proportionality of the modification of the strength of excitatory and inhibitory synapses induced by a protocol of stimulation classically used in long-term plasticity, leading to an unchanged E/I ratio. So, we provide evidence that activation the homeostatic control of the E/I balance previously reported (Le Roux *et al.*, 2006) is independent of the activation of NMDARs but is rather linked to recurrent interactions between excitatory and inhibitory circuits through layer 2/3 and layer 5 pyramidal neurons. This cortical organization can underlie the HFS-induced potentiation of some excitatory and inhibitory synapses (the imprinting of some information) and may control the main output

pathway of the cortex, layer 5 pyramidal neuron, through a homeostatic mechanism avoiding hyper- or hypo-excitability.

Acknowledgments

The authors are grateful to Dr. Y.P. Auberson (Novartis Institutes for BioMedical Research, Basel) for the kind gift of NVP-AAM077. We are grateful to Dr. D.W. Owens (Pfizer global research and development) for the kind gift of CP101,606. The authors thank Dr. S. O'Regan for critical reading of the manuscript.

Abbreviations

E, excitation; GABA, gamma amino butyric acid; HFS, high frequency of stimulation; I, inhibition; intgE, excitatory conductance integral; intgI, inhibitory conductance integral; intgT, total conductance integral; LTP, long-term potentiation; NMDAR, N-methyl D-aspartate receptor.

References

- Abraham, W.C. & Huggett, A. (1997) Induction and reversal of long-term potentiation by repeated high-frequency stimulation in rat hippocampal slices. *Hippocampus*, **7**, 137-145.
- Amar, M., Perin-Dureau, F. & Neyton, J. (2001) High-affinity Zn block in recombinant N-methyl-D-aspartate receptors with cysteine substitutions at the Q/R/N site. *Biophys J*, **81**, 107-116.
- Anderson, J.S., Carandini, M. & Ferster, D. (2000) Orientation tuning of input conductance, excitation, and inhibition in cat primary visual cortex. *J Neurophysiol*, **84**, 909-926.
- Auberson, Y.P., Allgeier, H., Bischoff, S., Lingenhoehl, K., Moretti, R. & Schmutz, M. (2002) 5-Phosphonomethylquinoxalinediones as competitive NMDA receptor antagonists with a preference for the human 1A/2A, rather than 1A/2B receptor composition. *Bioorg Med Chem Lett*, **12**, 1099-1102.
- Babb, T.L., Mikuni, N., Najm, I., Wylie, C., Olive, M., Dollar, C. & MacLennan, H. (2005) Pre- and postnatal expressions of NMDA receptors 1 and 2B subunit proteins in the normal rat cortex. *Epilepsy Res*, **64**, 23-30.
- Bartlett, T.E., Bannister, N.J., Collett, V.J., Dargan, S.L., Massey, P.V., Bortolotto, Z.A., Fitzjohn, S.M., Bashir, Z.I., Collingridge, G.L. & Lodge, D. (2006) Differential roles of NR2A and NR2B-containing NMDA receptors in LTP and LTD in the CA1 region of two-week old rat hippocampus. *Neuropharmacology*.
- Bear, M.F. & Kirkwood, A. (1993) Neocortical long-term potentiation. *Curr Opin Neurobiol*, **3**, 197-202.
- Bear, M.F. & Malenka, R.C. (1994) Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Curr Opin Neurobiol*, **4**, 389-399.
- Berberich, S., Punnakkal, P., Jensen, V., Pawlak, V., Seeburg, P.H., Hvalby, O. & Kohr, G. (2005) Lack of NMDA receptor subtype selectivity for hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci*, **25**, 6907-6910.
- Bliss, T.V. & Collingridge, G.L. (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, **361**, 31-39.
- Borg-Graham, L.J., Monier, C. & Fregnac, Y. (1998) Visual input evokes transient and strong shunting inhibition in visual cortical neurons. *Nature*, **393**, 369-373.
- Chatterton, J.E., Awobuluyi, M., Premkumar, L.S., Takahashi, H., Talantova, M., Shin, Y., Cui, J., Tu, S., Sevarino, K.A., Nakanishi, N., Tong, G., Lipton, S.A. & Zhang, D. (2002) Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature*, **415**, 793-798.
- Chazot, P.L. (2004) The NMDA receptor NR2B subunit: a valid therapeutic target for multiple CNS pathologies. *Curr Med Chem*, **11**, 389-396.
- Chenard, B.L., Bordner, J., Butler, T.W., Chambers, L.K., Collins, M.A., De Costa, D.L., Ducat, M.F., Dumont, M.L., Fox, C.B., Mena, E.E. & et al. (1995) (1S,2S)-1-(4-hydroxyphenyl)-2-(4-hydroxy-4-phenylpiperidino)-1-propanol: a potent new neuroprotectant which blocks N-methyl-D-aspartate responses. *J Med Chem*, **38**, 3138-3145.
- Choi, D.W. & Rothman, S.M. (1990) The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu Rev Neurosci*, **13**, 171-182.
- Ciabarra, A.M., Sullivan, J.M., Gahn, L.G., Pecht, G., Heinemann, S. & Sevarino, K.A. (1995) Cloning and characterization of chi-1: a developmentally regulated member of a novel class of the ionotropic glutamate receptor family. *J Neurosci*, **15**, 6498-6508.

- Collingridge, G.L., Isaac, J.T. & Wang, Y.T. (2004) Receptor trafficking and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci*, **5**, 952-962.
- 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.
- Coyle, J.T., Tsai, G. & Goff, D. (2003) Converging evidence of NMDA receptor hypofunction in the pathophysiology of schizophrenia. *Ann N Y Acad Sci*, **1003**, 318-327.
- Coyle, J.T., Tsai, G. & Goff, D.C. (2002) Ionotropic glutamate receptors as therapeutic targets in schizophrenia. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*, **1**, 183-189.
- Cull-Candy, S., Brickley, S. & Farrant, M. (2001) NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol*, **11**, 327-335.
- Cull-Candy, S.G. & Leszkiewicz, D.N. (2004) Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Sci STKE*, **2004**, re16.
- Dingledine, R., McBain, C.J. & McNamara, J.O. (1990) Excitatory amino acid receptors in epilepsy. *Trends Pharmacol Sci*, **11**, 334-338.
- Feng, H.J. & Macdonald, R.L. (2004) Proton modulation of alpha 1 beta 3 delta GABAA receptor channel gating and desensitization. *J Neurophysiol*, **92**, 1577-1585.
- Fischer, G., Mutel, V., Trube, G., Malherbe, P., Kew, J.N., Mohacsi, E., Heitz, M.P. & Kemp, J.A. (1997) Ro 25-6981, a highly potent and selective blocker of N-methyl-D-aspartate receptors containing the NR2B subunit. Characterization in vitro. *J Pharmacol Exp Ther*, **283**, 1285-1292.
- Forrest, D., Yuzaki, M., Soares, H.D., Ng, L., Luk, D.C., Sheng, M., Stewart, C.L., Morgan, J.I., Connor, J.A. & Curran, T. (1994) Targeted disruption of NMDA receptor 1 gene abolishes NMDA response and results in neonatal death. *Neuron*, **13**, 325-338.
- Haider, B., Duque, A., Hasenstaub, A.R. & McCormick, D.A. (2006) Neocortical network activity in vivo is generated through a dynamic balance of excitation and inhibition. *J Neurosci*, **26**, 4535-4545.
- Hardingham, G.E. (2006) 2B synaptic or extrasynaptic determines signalling from the NMDA receptor. *J Physiol*.
- Hardingham, G.E., Fukunaga, Y. & Bading, H. (2002) Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci*, **5**, 405-414.
- Hawkins, L.M., Chazot, P.L. & Stephenson, F.A. (1999) Biochemical evidence for the co-association of three N-methyl-D-aspartate (NMDA) R2 subunits in recombinant NMDA receptors. *J Biol Chem*, **274**, 27211-27218.
- Higley, M.J. & Contreras, D. (2006) Balanced excitation and inhibition determine spike timing during frequency adaptation. *J Neurosci*, **26**, 448-457.
- Hirsch, J.A., Martinez, L.M., Pillai, C., Alonso, J.M., Wang, Q. & Sommer, F.T. (2003) Functionally distinct inhibitory neurons at the first stage of visual cortical processing. *Nat Neurosci*, **6**, 1300-1308.
- Hollmann, M. & Heinemann, S. (1994) Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci*, **17**, 31-108.
- Huemmeke, M., Eysel, U.T. & Mittmann, T. (2004) Lesion-induced enhancement of LTP in rat visual cortex is mediated by NMDA receptors containing the NR2B subunit. *J Physiol*, **559**, 875-882.
- Izumi, Y., Auberson, Y.P. & Zorumski, C.F. (2006) Zinc modulates bidirectional hippocampal plasticity by effects on NMDA receptors. *J Neurosci*, **26**, 7181-7188.
- Jahr, C.E. & Stevens, C.F. (1990) Voltage dependence of NMDA-activated macroscopic conductances predicted by single-channel kinetics. *J Neurosci*, **10**, 3178-3182.

- Kemp, J.A. & McKernan, R.M. (2002) NMDA receptor pathways as drug targets. *Nat Neurosci*, **5 Suppl**, 1039-1042.
- Kew, J.N., Richards, J.G., Mutel, V. & Kemp, J.A. (1998) Developmental changes in NMDA receptor glycine affinity and ifenprodil sensitivity reveal three distinct populations of NMDA receptors in individual rat cortical neurons. *J Neurosci*, **18**, 1935-1943.
- Kohr, G. (2006) NMDA receptor function: subunit composition versus spatial distribution. *Cell Tissue Res*, **326**, 439-446.
- Le Roux, N., Amar, M., Baux, G. & Fossier, P. (2006) Homeostatic control of the excitation-inhibition balance in cortical layer 5 pyramidal neurons. *Eur J Neurosci*, **24**, 3507-3518.
- Lester, R.A., Clements, J.D., Westbrook, G.L. & Jahr, C.E. (1990) Channel kinetics determine the time course of NMDA receptor-mediated synaptic currents. *Nature*, **346**, 565-567.
- Liu, H.N., Kurotani, T., Ren, M., Yamada, K., Yoshimura, Y. & Komatsu, Y. (2004) Presynaptic activity and Ca²⁺ entry are required for the maintenance of NMDA receptor-independent LTP at visual cortical excitatory synapses. *J Neurophysiol*, **92**, 1077-1087.
- Liu, L., Wong, T.P., Pozza, M.F., Lingenhoehl, K., Wang, Y., Sheng, M., Auberson, Y.P. & Wang, Y.T. (2004) Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity. *Science*, **304**, 1021-1024.
- Liu, S.J. & Lachamp, P. (2006) The activation of excitatory glutamate receptors evokes a long-lasting increase in the release of GABA from cerebellar stellate cells. *J Neurosci*, **26**, 9332-9339.
- Liu, X.B., Murray, K.D. & Jones, E.G. (2004) Switching of NMDA receptor 2A and 2B subunits at thalamic and cortical synapses during early postnatal development. *J Neurosci*, **24**, 8885-8895.
- Llinas, R.R., Ribary, U., Jeanmonod, D., Kronberg, E. & Mitra, P.P. (1999) Thalamocortical dysrhythmia: A neurological and neuropsychiatric syndrome characterized by magnetoencephalography. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 15222-15227.
- Marino, J., Schummers, J., Lyon, D.C., Schwabe, L., Beck, O., Wiesing, P., Obermayer, K. & Sur, M. (2005) Invariant computations in local cortical networks with balanced excitation and inhibition. *Nat Neurosci*, **8**, 194-201.
- Martinez, L.M., Alonso, J.M., Reid, R.C. & Hirsch, J.A. (2002) Laminar processing of stimulus orientation in cat visual cortex. *J Physiol*, **540**, 321-333.
- Massey, P.V., Johnson, B.E., Moulton, P.R., Auberson, Y.P., Brown, M.W., Molnar, E., Collingridge, G.L. & Bashir, Z.I. (2004) Differential roles of NR2A and NR2B-containing NMDA receptors in cortical long-term potentiation and long-term depression. *J Neurosci*, **24**, 7821-7828.
- Matsuda, K., Kamiya, Y., Matsuda, S. & Yuzaki, M. (2002) Cloning and characterization of a novel NMDA receptor subunit NR3B: a dominant subunit that reduces calcium permeability. *Brain Res Mol Brain Res*, **100**, 43-52.
- Menniti, F., Chenard, B., Collins, M., Ducat, M., Shalaby, I. & White, F. (1997) CP-101,606, a potent neuroprotectant selective for forebrain neurons. *Eur J Pharmacol*, **331**, 117-126.
- Monier, C., Chavane, F., Baudot, P., Graham, L.J. & Fregnac, Y. (2003) Orientation and direction selectivity of synaptic inputs in visual cortical neurons: a diversity of combinations produces spike tuning. *Neuron*, **37**, 663-680.
- 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**, 529-540.

- Nagy, J., Horvath, C., Farkas, S., Kolok, S. & Szombathelyi, Z. (2004) NR2B subunit selective NMDA antagonists inhibit neurotoxic effect of alcohol-withdrawal in primary cultures of rat cortical neurones. *Neurochem Int*, **44**, 17-23.
- Neyton, J. & Paoletti, P. (2006) Relating NMDA receptor function to receptor subunit composition: limitations of the pharmacological approach. *J Neurosci*, **26**, 1331-1333.
- Paoletti, P. & Neyton, J. (2006) NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol*.
- Rumbaugh, G. & Vicini, S. (1999) Distinct synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in developing cerebellar granule neurons. *J Neurosci*, **19**, 10603-10610.
- Shu, Y., Hasenstaub, A. & McCormick, D.A. (2003) Turning on and off recurrent balanced cortical activity. *Nature*, **423**, 288-293.
- Sucher, N.J., Akbarian, S., Chi, C.L., Leclerc, C.L., Awobuluyi, M., Deitcher, D.L., Wu, M.K., Yuan, J.P., Jones, E.G. & Lipton, S.A. (1995) Developmental and regional expression pattern of a novel NMDA receptor-like subunit (NMDAR-L) in the rodent brain. *J Neurosci*, **15**, 6509-6520.
- Thomas, C.G., Miller, A.J. & Westbrook, G.L. (2006) Synaptic and extrasynaptic NMDA receptor NR2 subunits in cultured hippocampal neurons. *J Neurophysiol*, **95**, 1727-1734.
- Tongiorgi, E., Ferrero, F., Cattaneo, A. & Domenici, L. (2003) Dark-rearing decreases NR2A N-methyl-D-aspartate receptor subunit in all visual cortical layers. *Neuroscience*, **119**, 1013-1022.
- Tovar, K.R. & Westbrook, G.L. (1999) The incorporation of NMDA receptors with a distinct subunit composition at nascent hippocampal synapses in vitro. *J Neurosci*, **19**, 4180-4188.
- Toyoda, H., Zhao, M.G. & Zhuo, M. (2005) Roles of NMDA receptor NR2A and NR2B subtypes for long-term depression in the anterior cingulate cortex. *Eur J Neurosci*, **22**, 485-494.
- Wassef, A., Baker, J. & Kochan, L.D. (2003) GABA and schizophrenia: a review of basic science and clinical studies. *J Clin Psychopharmacol*, **23**, 601-640.
- Wehr, M. & Zador, A.M. (2003) Balanced inhibition underlies tuning and sharpens spike timing in auditory cortex. *Nature*, **426**, 442-446.
- Weitlauf, C., Honse, Y., Auberson, Y.P., Mishina, M., Lovinger, D.M. & Winder, D.G. (2005) Activation of NR2A-containing NMDA receptors is not obligatory for NMDA receptor-dependent long-term potentiation. *J Neurosci*, **25**, 8386-8390.
- Yang, J., Woodhall, G.L. & Jones, R.S. (2006) Tonic facilitation of glutamate release by presynaptic NR2B-containing NMDA receptors is increased in the entorhinal cortex of chronically epileptic rats. *J Neurosci*, **26**, 406-410.
- Yang, S.N., Tang, Y.G. & Zucker, R.S. (1999) Selective induction of LTP and LTD by postsynaptic [Ca²⁺]_i elevation. *J Neurophysiol*, **81**, 781-787.
- Yoshimura, Y., Ohmura, T. & Komatsu, Y. (2003) Two forms of synaptic plasticity with distinct dependence on age, experience, and NMDA receptor subtype in rat visual cortex. *J Neurosci*, **23**, 6557-6566.
- Zhao, M.G., Toyoda, H., Lee, Y.S., Wu, L.J., Ko, S.W., Zhang, X.H., Jia, Y., Shum, F., Xu, H., Li, B.M., Kaang, B.K. & Zhuo, M. (2005) Roles of NMDA NR2B subtype receptor in prefrontal long-term potentiation and contextual fear memory. *Neuron*, **47**, 859-872.

2. Rôles des co-agonistes D-serine et glycine de la sous-unité NR1 des récepteurs NMDA dans la potentiation homéostatique des afférences excitatrices et inhibitrices.

“Regulation of the excitation / inhibition balance of cortical pyramidal neurons by two gliotransmitters: D-serine and taurine”

LE ROUX Nicolas, MOTHET Jean-Pierre, AMAR Muriel et FOSSIER Philippe.

(En préparation).

Introduction

NMDARs play crucial role in a variety of physiological and pathological processes in the central nervous system (Dingledine et al., 1999). The role of these receptors in the establishment and the regulation of synaptic plasticity is particularly considered (Bliss and Collingridge, 1993). NMDARs are organized as heteromeric assemblies composed of NR1 subunit, associated with at least one of the four NR2 (A-D) subunits (Kemp and McKernan, 2002). NMDAR activation requires the binding of glutamate on the NR2 subunit and co-activation of the ‘glycine binding site’ also called ‘strychnine insensitive site’ on the NR1 subunit.

We previously showed that application of a high-frequency of stimulation (HFS) protocol in layer 2/3 causes parallel long-term potentiation of excitatory (eLTP) and inhibitory (iLTP) inputs perceived by layer 5 pyramidal neurons without changing the excitation/inhibition (E/I) balance. We proposed that the control of the E/I balance is due to the recurrent connectivity between excitatory and inhibitory circuits and to shunting inhibition (Le Roux et al., 2006). We also showed that the activation of NMDARs is required for the induction of the eLTP and of the iLTP observed (*cf.* article précédent). Moreover the induction of the potentiation depends on the developmental stage, we found that NR2B-containing NMDARs support the potentiation for P18-P23 old rats whereas NR2A-containing NMDARs support the potentiation for P29-P32 old rats (*cf.* article précédent). However, recent studies also reported that the induction of cortical long-term plasticity depends on the activation of the ‘glycine binding site’ of NMDARs (Martina et al., 2003; Yang et al., 2003; Krasteniakov et al., 2005). Several evidences in many brain regions established that the ‘glycine-binding’ site of NMDARs is not saturated and the activation of NMDARs required the binding of a co-agonist on the NR1 subunit (Bergeron et al., 1998; Danysz and Parsons, 1998; Panatier et al., 2006). Glycine was assumed to be the endogenous ligand of NR1, but this notion has been challenged by the discovery of high levels of endogenous D-serine in the mammalian forebrain (Hashimoto et al., 1992). Furthermore, it has been reported that D-serine is a more potent endogenous agonist than glycine for the ‘glycine-binding site’ (Matsui et al., 1995; Priestley et al., 1995; Furukawa and Gouaux, 2003). In this view, we paid a particular attention to the role of endogenous D-serine. In the brain, D-serine was synthesized in astrocytes by serine racemase which converts L-serine into D-serine (Wolosker et al., 1999; Mothet et al., 2000) and was selectively destroyed by D-amino acid oxidase (DAAO), an

enzyme which metabolizes D-amino acids (Wang and Zhu, 2003) and which shows a high degree of colocalization with NMDARs (Hashimoto et al., 1993; Schell et al., 1995). Not only D-serine represents a new and important source of glial modulation of neurons, but it has important clinical implications, particularly for addressing psychiatric and neurodegenerative disorders. D-serine has been a therapeutic tool for treating schizophrenic patients (Sawa and Snyder, 2003), based on the idea that widespread disorder reflects hypoactivation of NMDARs (Coyle et al., 2002; Coyle et al., 2003).

Here we investigate the role of NMDARs co-agonists and glycinergic receptors (GlyRs) in the induction of eLTP and iLTP previously described (Le Roux et al., 2006). Our results underline the crucial role of glia in the cortex and in particular of two gliotransmitters, D-serine and taurine, in the control of neuronal excitability. D-serine, by ensuring the plasticity of excitatory and inhibitory synapses, and taurine, by controlling the integration process, appear to play crucial roles in the homeostatic plasticity of the cortical network in order to keep the level of excitability of pyramidal neurons in a functional range.

Methods

Les méthodes sont identiques à celles utilisées pour les articles précédents.

Results

Role of the glycine binding site of NMDARs in the induction of eLTP and iLTP

To characterize the involvement of the 'glycine binding site' in eLTP and iLTP recorded in layer 5 pyramidal neuron (Le Roux et al., 2006), we applied 7-chlorokynurenic acid (7Cl-KYN), an antagonist of the 'strychnine-insensitive glycine binding site' (Krasteniakov et al., 2005). Figure 1A presents representative current recordings in a layer 5 voltage-clamped pyramidal neuron to electrical stimulation (0.05 Hz) in layer 2/3 in the presence of 50 μ M 7-Chlorokynurenic acid (7Cl-KYN), before and after application of HFS protocol. The amplitude of Current responses were decreased after application of HFS protocol compared to control conditions (Fig.1A, upper part). Decomposition of current responses into total conductance changes (gT, black traces), excitatory conductance changes (gE, dark grey traces) and inhibitory conductance changes (gI, light grey traces) showed a time dependent decrease of these parameters following HFS application (Fig. 1A).

The statistical analysis of the global population (n = 18) showed a decrease in the total conductance integral (IntgT, black bars) from 261.5 ± 36.8 a.u. to 168.7 ± 20.3 a.u., in the excitatory conductance integral (IntgE, dark grey bars) from 29.8 ± 4.8 a.u. to 22.1 ± 3.2 a.u. and in the inhibitory conductance integral (IntgI, light grey bars) from 231.7 ± 33.9 a.u. to 146.6 ± 20.2 after HFS application compared to control (Fig. 1B). So, in the presence of 7Cl-KYN, HFS application induced a significant depression by 31.5 ± 6.3 % ($p < 0.001$) of IntgT, by 23.2 ± 6.2 % ($p < 0.01$) of IntgE and by 32.3 ± 6.8 % ($p < 0.001$) of IntgI compared to control. Whereas, under control conditions (without 7Cl-KYN) HFS application induced a potentiation of IntgT by about 45 %, of IntgE by about 35 % and of IntgI by about 45 % (Le Roux et al., 2006). Changes in excitation (IntgE) and inhibition (IntgI) expressed as percents of IntgT, showed no significant variations, indicating that the E/I ratio remained stable after application of HFS protocol in the presence of 7Cl-KYN (Fig. 1C).

So, the blockade of the 'glycine binding site' of the NMDARs not only prevents the eLTP and iLTP induced by HFS application but leads to the reversion of the plasticity in eLTD and iLTD.

These results clearly demonstrate that the binding of a co-agonist on the NR1 subunit is required for cortical plasticity process.

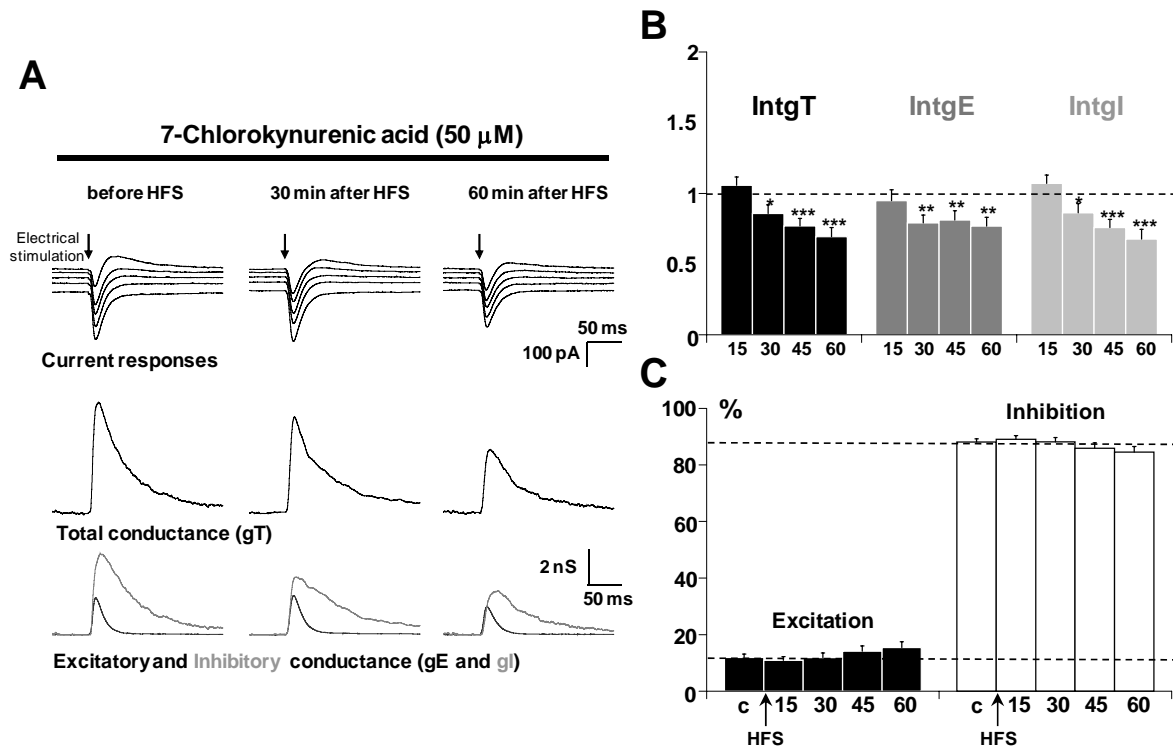


Figure 1. Effects of HFS in the presence of 7CI-KYN.

(A) The left column shows representative recordings from the statistical analysis of $n = 18$ experiments in the presence of $50 \mu\text{M}$ 7CI-KYN, the middle column 30 min after application of HFS protocol in layer 2/3 and the right column 60 min after application of HFS. **Upper traces:** current responses of a layer 5 pyramidal neuron to electrical stimulation. Imposed membrane potential ranged for -55 to -75 mV. Note that the amplitude of current responses was decreased after HFS application. **Medium traces:** decomposition of the responses in total conductance change (gT). **Lower traces:** decomposition of gT in excitatory and inhibitory conductance changes (gE, dark grey and gI, light grey). Total, excitatory and inhibitory conductance changes were decreased after HFS application.

(B) Relative changes (compared to control) of IntgT (black bars), IntgE (dark grey bars) and Intgl (light grey bars), after application of HFS protocol in layer 2/3 in the presence of $50 \mu\text{M}$ 7CI-KYN ($n = 18$). (** $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ and * $p < 0.05$, t-test).

(C) Relative contribution of excitation (black) and inhibition (white) conductance changes to the total conductance change, various times (15, 30, 45 and 60 min) after HFS (c: control before HFS protocol).

Characterization of the co-agonist of NMDARs on rat visual cortex

The nature of the co-agonist of NMDARs was actually under debates. Whereas glycine was considered as the sole ligand of the NR1 subunit of NMDARs, recent evidences involve a gliotransmitter, D-serine, as the main co-agonist of NMDARs (Mothet et al., 2000).

Role of D-serine in the induction of eLTP and iLTP on layer 5 pyramidal neurons

To reveal the presence of endogenous D-serine in rat visual cortex, immunohistochemical characterization of D-serine was done (Fig. 2)... *en cours de realisation*.

To test the role of endogenous D-serine in eLTP and iLTP, we applied HFS protocol in the presence of specific drugs acting on the metabolism of D-serine. In the presence of D-amino acid oxidase (DAAO), a flavoprotein enzyme which degrades D-serine, HFS failed to potentiate the global, excitatory and inhibitory conductance changes as shown on figure 3A for representative recordings and on figure 3B for the statistical analysis of the global population (n = 8). No significant changes in excitation (IntgE) and inhibition (IntgI) conductance integrals expressed as percents of IntgT was measured (Fig. 3C). Consequently no change of the E/I ratio was observed. To confirm that the prevention of the potentiation results from a specific effect of DAAO, we applied HFS protocol in the presence of an inactivated form of DAAO (iDAAO). Under this condition, we showed on representative recordings an increase of the current amplitude, the total conductance change and the excitatory and inhibitory conductance changes (Fig. 3D). The statistical analysis of the global population (n = 15) confirms that IntgT was enhanced by 54.8 ± 12.9 %, IntgE by 44.3 ± 10.5 % and IntgI by 62.1 ± 16.2 % (Fig. 3E) 15 min after application of the HFS protocol. It is worth noting that the potentiation of IntgT, IntgE and IntgI were similar to those observed under control conditions (Le Roux et al., 2006). The parallel potentiation of the excitatory and inhibitory inputs did not induce significant modification of the percentage of excitation and inhibition (Fig. 3F).

So, in the cortex, endogenous D-serine appears to be required for the induction of eLTP and iLTP.

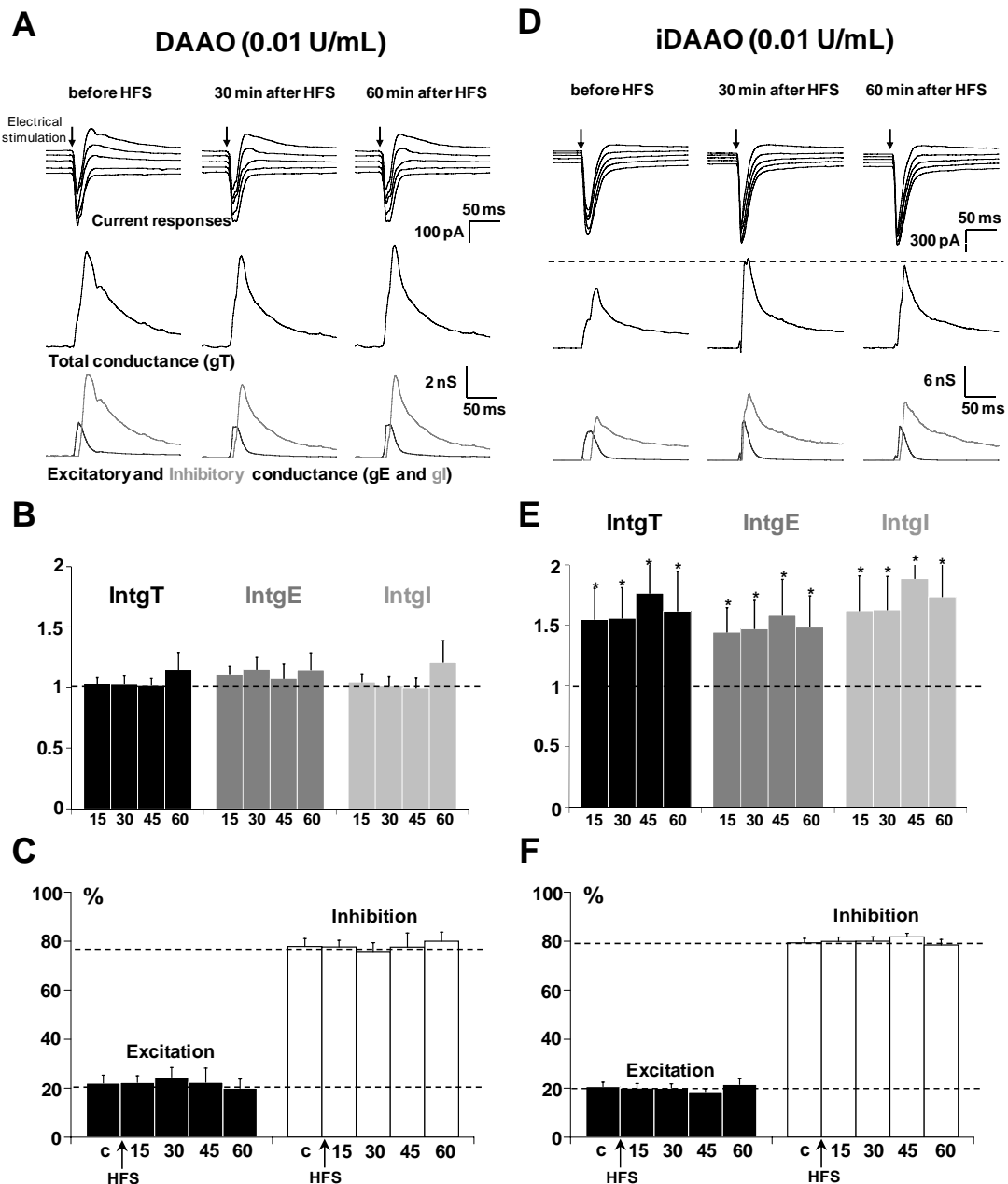


Figure 3. Effects of a HFS protocol in the presence of DAAO and inactivated DAAO (iDAAO).

(A) The left column shows a representative recordings from the statistical analysis of $n = 8$ experiments in the presence of 0.01 U/mL DAAO before HFS application, the middle column 30 min after application of HFS protocol and the right column 60 min after application of HFS in layer 2/3. **Upper traces:** current responses of a layer 5 pyramidal neuron to electrical stimulation. Imposed membrane potential ranged for -60 to -80 mV. Note that the amplitude of current responses did not change after HFS application. **Medium traces:** decomposition of the responses in total conductance change (gT). **Lower traces:** decomposition of gT in excitatory and inhibitory conductance changes (gE, dark grey and gI, light grey).

(B) Relative changes (compared to control) of IntgT (black bars), IntgE (dark grey bars) and IntgI (light grey bars), after HFS in layer 2/3 ($n = 8$) in the presence of 0.01 U/mL DAAO.

(C) Relative contribution of excitation and inhibition conductance changes to the total conductance change, after HFS in the presence of 0.01 U/mL DAAO (c:control before HFS protocol).

(D-E-F) Application of HFS protocol in the presence of 0.01 U/mL iDAAO ($n = 15$). Legends are identical than in A-B-C. Total, excitatory and inhibitory conductance changes were increased (D-E) and the E/I ratio was unchanged (F). (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and * $p < 0.05$, t-test).

To further validate this hypothesis, we applied a HFS protocol in the presence of a specific serine racemase inhibitor (SRI, 50 μ M). In the presence of SRI, representative recordings showed a decrease of the current responses corresponding after analysis in a decrease in the total, excitatory and inhibitory conductance changes (Fig. 4A). The statistical analysis of the global population ($n = 17$, Fig. 4B) showed that, 60 min after application of the HFS protocol, IntgT was significantly decreased by $24.1 \pm 7.4 \%$ ($p < 0.01$), IntgE by $22.7 \pm 7.6 \%$ ($p < 0.01$) and IntgI by $24.7 \pm 8.6 \%$ ($p < 0.01$). Due to parallel changes of the strength of excitatory and inhibitory inputs, no significant change of the E/I balance was observed (Fig. 4C).

These results clearly show that endogenous D-serine is necessary for the induction of long-term potentiation of excitatory and inhibitory inputs on layer 5 pyramidal neurons and as observed in the presence of 7Cl-KYN, the prevention of D-serine synthesis not only prevents the eLTP and iLTP induced by HFS application but leads to a reversion of the plasticity in eLTD and iTLD.

Role of glycine in the induction of eLTP and iLTP

To reveal the presence of glycine in rat visual cortex, immunohistochemical characterization of glycinergic fibers was done (Fig. 5A)... *en cours de realisation*.

Glycine oxidase (GO) an enzyme that degrades glycine was used to determine the involvement of endogenous glycine in the potentiation observed after application of HFS protocol. Representative recordings in the presence of GO showed that HFS application induced an increase in current amplitudes and consequently of total, excitatory and inhibitory conductance changes (Fig. 5B). The statistical analysis of the global population ($n = 19$) showed a significant potentiation of IntgT by $20.8 \pm 7.0 \%$ ($p < 0.01$), of IntgE by $35.4 \pm 9.4 \%$ ($p < 0.001$) and of IntgI by $19.0 \pm 8.8 \%$ ($p < 0.05$) until 30 min after application of HFS protocol. After 30 min, the increases of IntgT and IntgI were not significant, whereas the potentiation of IntgE was maintained (Fig. 5C). The percentage of excitation was significantly increased by $18.0 \pm 8.0 \%$ ($p < 0.05$; Fig. 5D) resulting in an enhancement of the E/I ratio 30 min after application of HFS.

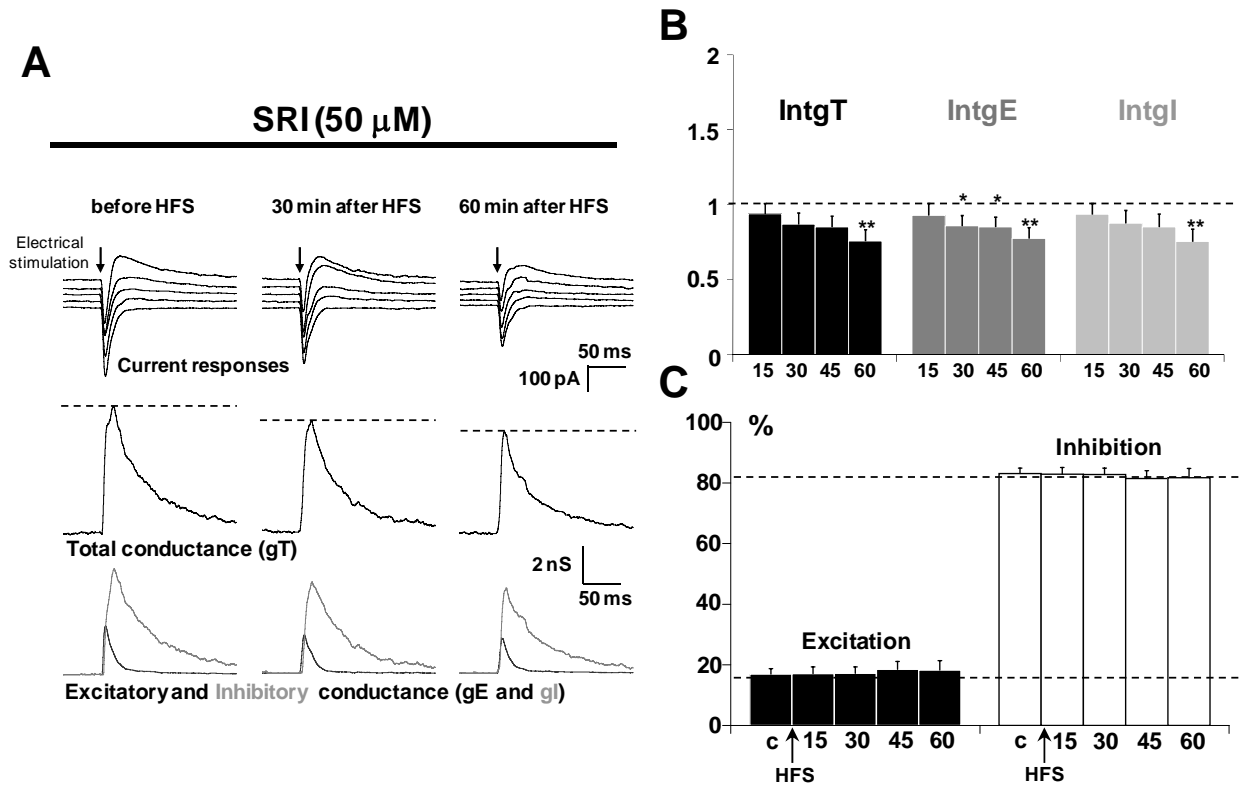


Figure 4. Effects of a HFS protocol in the presence of a Serine Racemase Inhibitor.

(A) The left column shows representative recordings from the statistical analysis of $n = 17$ experiments in the presence of 50 μ M SRI, the middle column 30 min after application of HFS protocol in layer 2/3 and the right column 60 min after application of HFS. **Upper traces:** current responses of a layer 5 pyramidal neuron to electrical stimulation. Imposed membrane potential ranged for -60 to -80 mV. Note that the amplitude of current responses was decreased after HFS application. **Medium traces:** decomposition of the responses in total conductance change (gT). **Lower traces:** decomposition of gT in excitatory and inhibitory conductance changes (gE, dark grey and gI, light grey). Total, excitatory and inhibitory conductance changes were decreased after HFS application.

(B) Relative changes (compared to control) of IntgT (black bars), IntgE (dark grey bars) and Intgl (light grey bars), after application of HFS protocol in layer 2/3 in the presence of 50 μ M SRI ($n = 17$). (***) $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$, t-test).

(C) Relative contribution of excitation (black) and inhibition (white) conductance changes to the total conductance change, various times (15, 30, 45 and 60 min) after HFS (c: control before HFS protocol).

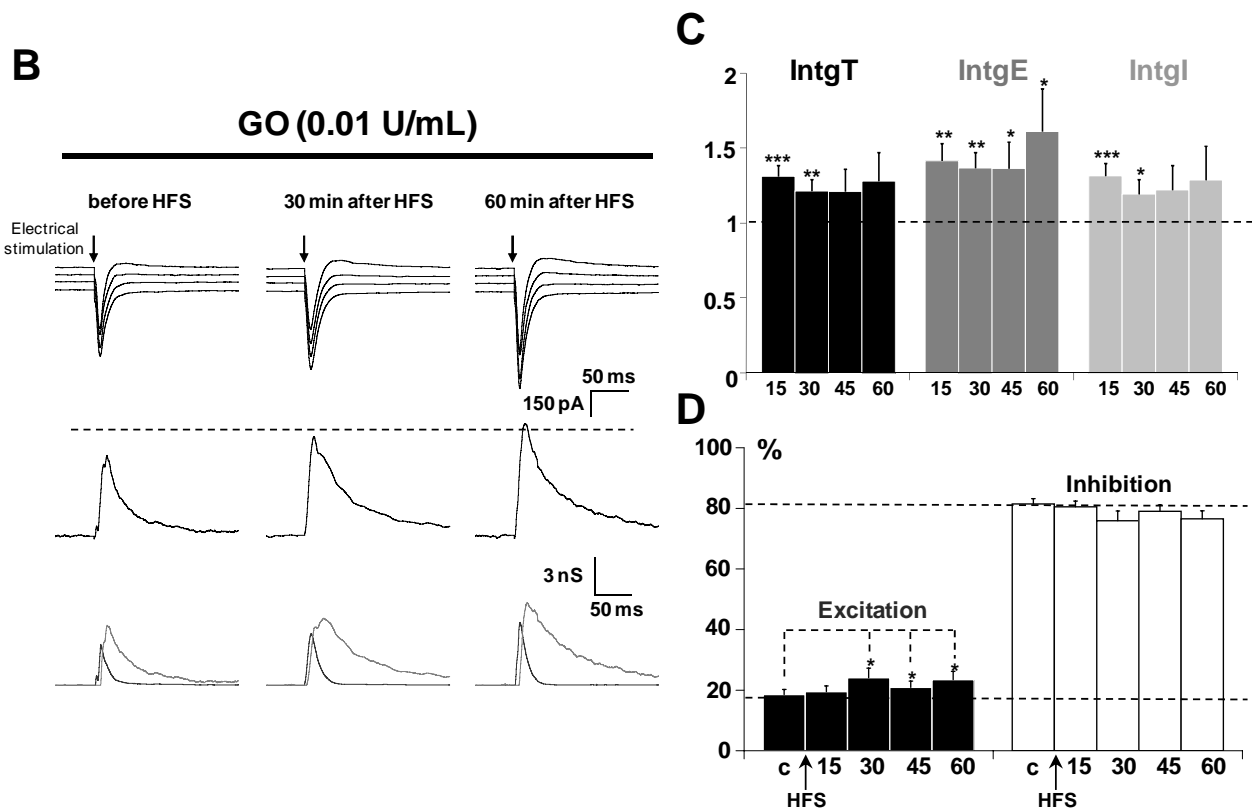


Figure 5. Effects of a HFS protocol in the presence of 0.01 U/mL Glycine Oxydase.

(B) The left column shows representative recordings from the statistical analysis of $n = 19$ experiments in the presence of 0.01 U/mL GO, the middle column 30 min after application of HFS protocol in layer 2/3 and the right column 60 min after application of HFS. **Upper traces:** current responses of a layer 5 pyramidal neuron to electrical stimulation. Imposed membrane potential ranged for -60 to -80 mV. Note that the amplitude of current responses was increased after HFS application. **Medium traces:** decomposition of the responses in total conductance change (gT). **Lower traces:** decomposition of gT in excitatory and inhibitory conductance changes (gE, dark grey and gI, light grey). Total, excitatory and inhibitory conductance changes were increased after HFS application.

(C) Relative changes (compared to control) of IntgT (black bars), IntgE (dark grey bars) and Intgl (light grey bars), after application of HFS protocol in layer 2/3 in the presence of 0.01 U/mL GO ($n = 19$). (** $p < 0.01$, ** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$, t-test).

(D) Relative contribution of excitation (black) and inhibition (white) conductance changes to the total conductance change, various times (15, 30, 45 and 60 min) after HFS (c:control before HFS protocol).

In the presence of GO, the eLTP induced by HFS application was sustained, but the inhibition was no longer potentiated 30 min after the application of HFS protocol in such a way that the E/I ratio was enhanced. On the contrary, the blockade of NMDARs with D-AP5 (*cf.* article précédent), or the blockade of the 'glycine binding site' with 7Cl-KYN or the blockade of the synthesis of D-serine were shown to prevent or reverse the potentiation induced by HFS without changing the E/I ratio. We propose that unexpected effect of GO could be independent of the simple action of glycine on NMDARs.

Role of glycinergic receptors in cortical processes

Characterization of GlyRs in rat visual cortex

Few information reports the presence of GlyRs in the cortex (Flint et al., 1998) but the precise function of these GlyRs is not yet clearly defined.

The immunocytochemical characterization of GlyRs on rat visual cortex slices showed (Fig. 6A)... *en cours de realisation.*

However it is reported that glycine is present at very low levels in the cortex, suggesting that another endogenous ligand might activate cortical GlyRs. Taurine, a gliotransmitter is known to activate GlyRs and also in a lower part GABA_A receptors (Schmieden et al., 1992; Hussy et al., 1997; Panatier et al., 2006) and is particularly abundant in the developing neocortex where it was suggested as the most likely endogenous ligand of GlyRs (Flint et al., 1998). We use specific antibodies against taurine to provide evidence of the presence of this ligand in visual cortex (Fig. 6B)... *en cours de realisation.*

Figure 7 shows current responses recorded from a voltage clamped (at - 50 mV) layer 5 pyramidal neuron in response to application of 100 µM taurine. Taurine elicited an outward current which was reduced in the presence of 10 µM strychnine, a GlyRs antagonist (Carrasco et al., 2007) or 10 µM bicuculline, a GABA_A receptors antagonist; and abolished in the presence of strychnine and bicuculline (Fig. 7A). The outward current elicited by taurine at - 50 mV was abolished at -80 mV (Fig. 7B) indicating that taurine is able to activate inhibitory receptors leading to activation of chloride channels. Moreover, the stronger decrease of the current response elicited by taurine in the presence of strychnine than in the presence of bicuculline indicates that the taurine effect is mainly supported by GlyRs in visual cortex.

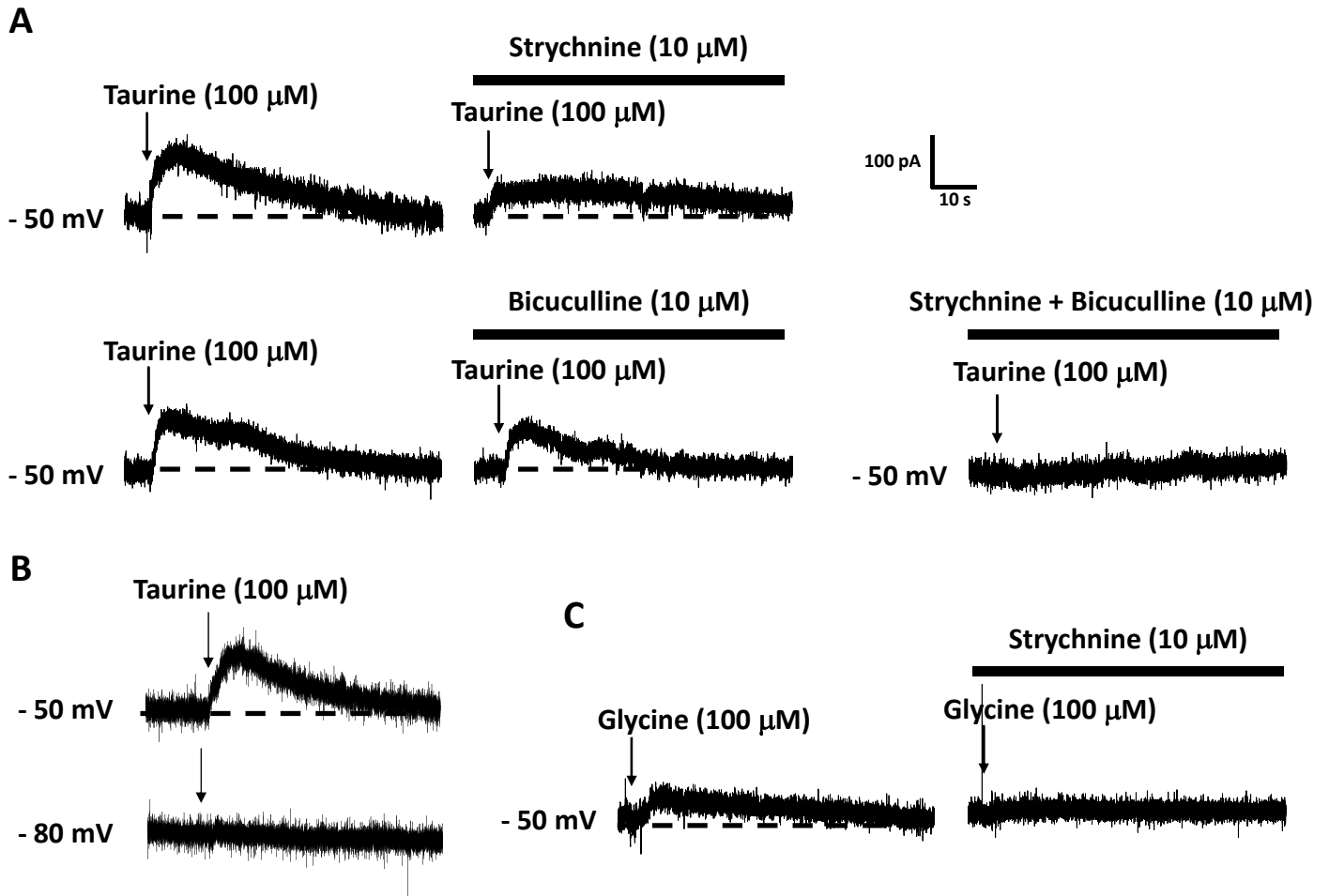


Figure 7. Activation of glycinergic receptors of a layer 5 pyramidal neuron by taurine or by glycine. (A) Current responses from a voltage clamped (-50 mV) layer 5 pyramidal neuron in response to application of 100 μ M taurine. Taurine elicited an outward current which was reduced in the presence of strychnine or bicuculline and abolished in the presence of strychnine and bicuculline. (B) The current response elicited by taurine was abolished at -80 mV (the reversal potential of chloride channels). (C) Current responses from a voltage clamped (-50 mV) layer 5 pyramidal neuron in response to application of 100 μ M glycine. The current elicited by glycine was prevented by application of strychnine.

Application of 100 μ M glycine elicited a weaker outward current than taurine which was fully blocked in the presence of strychnine (Fig. 7C), indicating that taurine seems to be a better agonist than glycine for the GlyRs activation.

Role of glycinergic receptors in the regulation of the E/I balance

In the presence of 100 μ M glycine, representative recordings showed that currents elicited by electrical stimulation in layer 2/3 were unchanged (Fig. 8A1) but were slightly reduced in the presence of 100 μ M taurine (Fig. 8B1). The total, excitatory and inhibitory conductance changes were unchanged in the presence of glycine (Fig. 8A1) and slightly reduced in the presence of taurine (Fig. 8B1). The statistical analysis for $n = 21$ neurons showed no significant variation of IntgT, IntgE or IntgI in the presence of glycine (Fig. 8A2) leading to an unchanged E/I ratio (Fig. 8A3). After taurine application, the statistical analysis of the global population ($n = 12$, Fig. 8B2) showed a significant decrease by 17.0 ± 6.1 % ($p < 0.05$) for IntgT and by 22.0 ± 3.4 % ($p < 0.001$) for IntgE, whereas IntgI was not significantly reduced ($p > 0.05$). No significant change of the E/I ratio was observed (Fig. 8B3).

In the presence of 10 μ M strychnine, a specific antagonist of GlyRs, a strong enhancement of the inward current elicited by electrical stimulation was recorded. This effect corresponded to an increase of the total conductance changes and of the excitatory conductance changes (Fig. 8C1). The statistical analysis of $n = 22$ neurons showed an increase by 59.5 ± 10 % ($p < 0.001$) of IntgE and an ensuing significant increase of IntgT by 22.2 ± 8 % ($p < 0.05$). However, no significant change of IntgI was observed (Fig. 8C2).

The percentage of excitation expressed as percent of the total conductance changes was significantly increased from 20.4 ± 2.1 % to 27.3 ± 2.4 % ($p < 0.001$) and the percentage of inhibition was decreased from 79.6 ± 2.1 % to 72.7 ± 2.4 % ($p < 0.05$) resulting in an increased E/I ratio (Fig. 8C3).

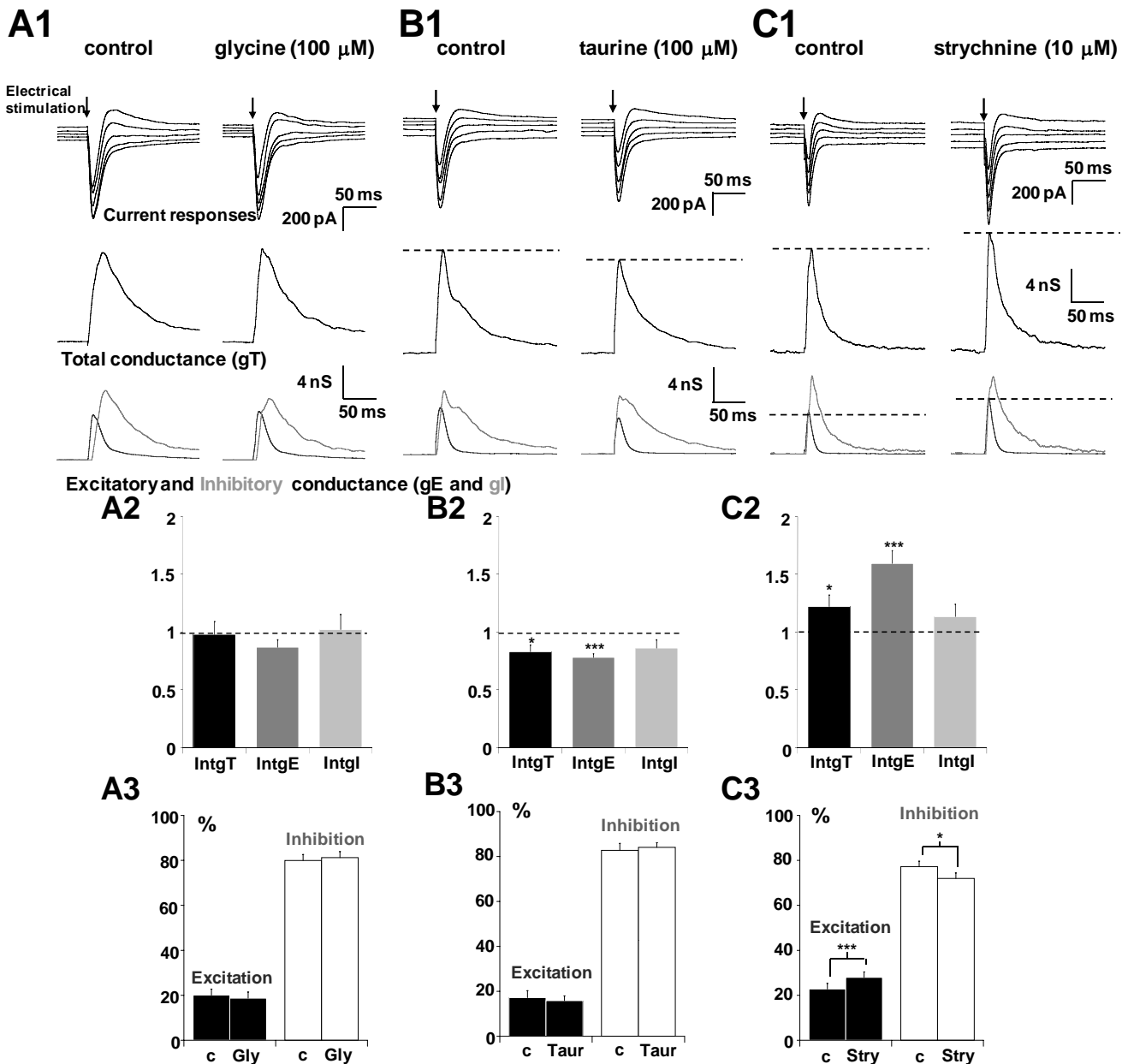


Figure 8. Effects of glycine, taurine and strychnine on the E/I balance of layer 5 pyramidal neurons.

(A1, B1, C1) Upper traces: current responses of a layer 5 pyramidal neuron to electrical stimulation (black arrow) applied in layer 2/3: left column in control conditions and right column, 20 min after perfusion of 100 μ M of glycine (**A**); 100 μ M of taurine (**B**) and 10 μ M of strychnine (**C**). Holding potentials scaled from -80 (bottom trace) to -60 mV (top trace, steps equal to 5 mV). **Medium traces:** decomposition of the responses in total conductance change (gT). **Lower traces:** decomposition of gT in excitatory and inhibitory conductance changes.

(A2) Relative changes (compared to control) of intgT (black), intgE (dark grey) and intgI (light grey), in the presence of 100 μ M of glycine (n = 21).

(A3) Relative contribution of excitatory and inhibitory conductance changes to the total conductance change in the presence of glycine (c: control).

(B2) Relative changes (compared to control) of intgT (black), intgE (dark grey) and intgI (light grey), in the presence of 100 μ M of taurine (n = 12) (c: control; *** p < 0.001, ** p < 0.01 and * p < 0.05).

(B3) Relative contribution of excitatory and inhibitory conductance changes to the total conductance change in the presence of taurine (c: control).

(C2) Relative changes (compared to control) of intgT (black), intgE (dark grey) and intgI (light grey), in the presence of 10 μ M of strychnine (n = 22).

(C3) Relative contribution of excitatory and inhibitory conductance changes to the total conductance change in the presence of strychnine (c: control).

These results showed that the activation or the blockade of GlyRs leads to significant changes of the excitatory component without changing the inhibitory component. Thus, it can be supposed that GlyRs are efficient to modulate excitation on glutamatergic neurons. GlyRs are believed to be located only at extrasynaptic sites (Flint et al., 1998; Mangin et al., 2002; Mori et al., 2002; Deleuze et al., 2005; Wang et al., 2005; Song et al., 2006) where they could be important mediators of tonic inhibition because activation of GlyRs opens a chloride permeability that may operate as a shunt for excitatory glutamate-induced currents.

In favour of this hypothesis the M factor shifted from 0.67 ± 0.04 in control conditions to 0.72 ± 0.03 in the presence of strychnine which corresponds to a significant reduction by $10.2 \pm 3.8 \%$ ($p < 0.05$) of the shunting inhibition.

Modulatory role of glycinergic receptors during HFS protocol

Application of HFS protocol in the presence of $100 \mu\text{M}$ taurine did not change current responses amplitude, total, excitatory or inhibitory conductance changes (Fig. 9A). The statistical analysis ($n = 9$) showed that application of HFS protocol failed to induce potentiation of excitatory or inhibitory inputs (Fig. 9B) leading to an unchanged E/I ratio (Fig. 9C). In the presence of $10 \mu\text{M}$ strychnine, representative recordings showed that application of HFS protocol led to a decrease of outward current responses amplitude (Fig. 9D). Total and inhibitory conductance changes were reduced, whereas the excitatory conductance change was increased (Fig. 9D). The statistical analysis ($n = 14$) showed that application of HFS protocol in the presence of strychnine induced a potentiation of IntgE by about 23 %, but IntgI was depressed by $15.6 \pm 7.7 \%$ ($p < 0.05$) 15 min after HFS application to $36.1 \pm 9.8 \%$ ($p < 0.01$) 60 min after application of HFS protocol. Under these conditions, a time dependent depression of IntgT was observed. IntgT was significantly reduced by $15.4 \pm 7.1 \%$ ($p < 0.05$) 45 min after HFS application (Fig. 9E). Consequently, the percentage of excitation is increased from $26.3 \pm 2.4 \%$ in the presence of strychnine to $37.5 \pm 5.8 \%$ after 60 min application of HFS protocol and the percentage of inhibition is decreased from $73.7 \pm 2.4 \%$ in the presence of strychnine to $62.5 \pm 5.8 \%$ after 60 min application of HFS protocol (Fig. 9F). The E/I ratio was then enhanced. The M factor was increased by $16.1 \pm 3.7 \%$ 60 min after HFS. Our results provide evidence for a main involvement of D-serine in the regulation of the NMDARs-dependent plasticity and for a role of taurine in the control of cortical network excitability.

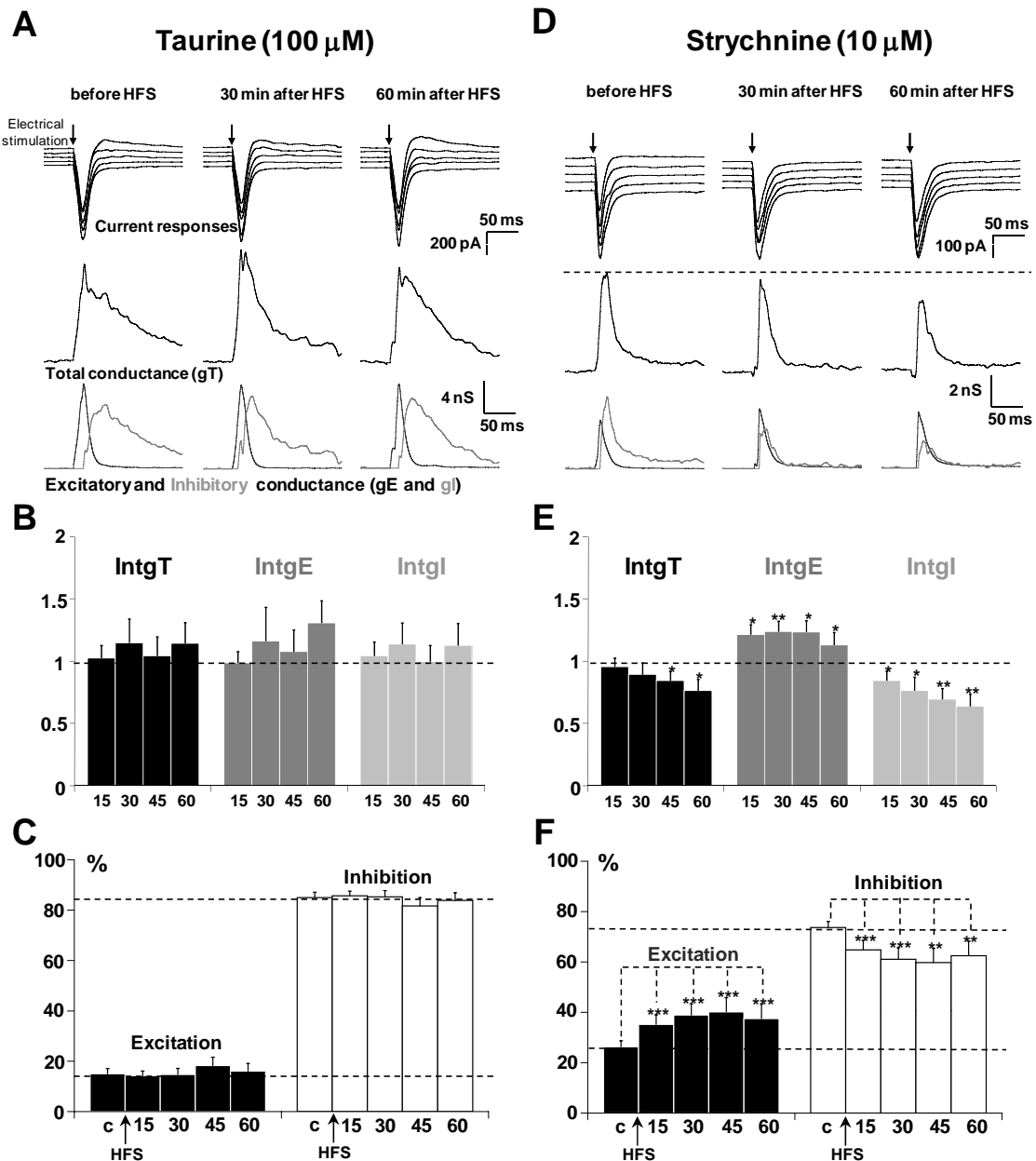


Figure 9. Effects of a HFS protocol in the presence of taurine and strychnine.

(A) The left column shows a representative recordings from the statistical analysis of $n = 9$ experiments in the presence of $100 \mu\text{M}$ taurine before HFS application, the middle column 30 min after application of HFS protocol and the right column 60 min after application of HFS in layer 2/3. **Upper traces:** current responses of a layer 5 pyramidal neuron to electrical stimulation. Imposed membrane potential ranged for -60 to -80 mV. Note that the amplitude of current responses did not change after HFS application. **Medium traces:** decomposition of the responses in total conductance change (gT). **Lower traces:** decomposition of gT in excitatory and inhibitory conductance changes (gE, dark grey and gI, light grey).

(B) Relative changes (compared to control) of IntgT (black bars), IntgE (dark grey bars) and Intgl (light grey bars), after HFS in layer 2/3 ($n = 9$) in the presence of $100 \mu\text{M}$ taurine.

(C) Relative contribution of excitation and inhibition conductance changes to the total conductance change, after HFS in the presence of $100 \mu\text{M}$ taurine (c:control before HFS protocol).

(D-E-F) Application of HFS protocol in the presence of $10 \mu\text{M}$ strychnine ($n = 14$). Legends are identical than in A-B-C. Total and inhibitory conductance changes were decreased, whereas excitatory conductance change was increased (D-E). The E/I ratio was enhanced (F). (** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$, t-test).

Discussion

In the brain, glial cells are closely associated with neurons (Auld and Robitaille, 2003), thus synapses are now considered as tripartite structures. Astrocytes, the most abundant glial cells in the brain are found in the close proximity of the synapse and this anatomical feature allows them to sense neuronal activity with specific receptors for various neurotransmitters (Haydon, 2001). Moreover, astrocytes activated by the release of neurotransmitters from the presynaptic neuronal element can respond to these inputs by releasing gliotransmitters such as glutamate, ATP, taurine or D-serine (Mothet et al., 2000; Araque et al., 2001; Nedergaard et al., 2002; Auld and Robitaille, 2003; Newman, 2003; Deleuze et al., 2005; Volterra and Meldolesi, 2005). Due to their involvement in the regulation of synaptic strength, gliotransmitters are involved in various physiological phenomena, they have been reported to modulate neuronal activity (Araque et al., 2001; Bezzi and Volterra, 2001; Haydon, 2001), to be involved in neurogenesis and synaptogenesis (Araque et al., 2001; Bezzi and Volterra, 2001; Haydon, 2001; Oliet et al., 2001) and also to contribute to the phenomenon of synaptic plasticity (Laming et al., 2000). They are also involved in pathological phenomena such as schizophrenia (Krasteniakov et al., 2005) or Alzheimer's disease (Kemp and McKernan, 2002). In the present report, we paid a particular attention to the role of two gliotransmitters D-serine and taurine on the cortical network activity.

In the visual cortex, layer 5 pyramidal neurons are involved in the elaboration and propagation of the output signal. So the level of excitability of these pyramidal neurons is crucial for the regulation of the cortical activity and is defined by the balance between excitatory and inhibitory inputs perceived. It was observed that a deregulation of this balance underlies various pathological phenomena such as epilepsy, neurodegenerative diseases (Cline, 2005). We have previously shown that the E/I balance is tightly regulated, the application of HFS protocol in layer 2/3 induces a parallel long term potentiation of excitatory and inhibitory inputs on layer 5 pyramidal neurons, called eLTP and iLTP. This homeostatic plasticity of the strength of the inputs did not change the level of excitability of layer 5 pyramidal neurons due to recurrent interactions between excitatory and inhibitory circuits and due to dendritic integration properties (*i.e.* shunting inhibition) (Le Roux et al., 2006). We also showed that the excitatory and inhibitory LTP observed required NMDARs activation and depend on the isoform of NR2 subunit. Indeed, we demonstrated that the eLTP and iLTP were supported by NR2B or NR2A-containing NMDARs according to the developmental

stage of the cortex. The potentiation was NR2B-containing NMDARs dependent for P18 and P23 old rats, but was supported by NR2A-containing NMDARs for P29-P32 old rats (*cf.* article précédent).

It is reported that the plasticity dependent on the activation of NMDARs requires the binding of a co-agonist on the 'glycine binding site' of NR1 subunit (Johnson and Ascher, 1987; Kleckner and Dingledine, 1988; Schell et al., 1995). In this view, we showed that the blockade of the 'glycine binding site' of NMDARs not only prevent the potentiation of excitatory and inhibitory inputs in response to a HFS protocol but furthermore led to eLTD and iLTD in the layer 5 pyramidal neuron. So as previously reported in the hippocampus (Krasteniakov et al., 2005), the 'glycine binding site' of NMDARs appears to be crucial to determine the direction and the magnitude of synaptic plasticity. More and more evidences report that the gliotransmitter D-serine is the main NMDARs co-agonist (Hashimoto et al., 1992; Mothet et al., 2000; Krasteniakov et al., 2005). D-serine has been also proposed as an endogenous ligand for the strychnine-insensitive glycine site of the NMDA receptor following the display of its ability to potentiate NMDA receptor mediated neurotransmission (Kleckner and Dingledine, 1988; Wroblewski et al., 1989; Matsui et al., 1995; Martina et al., 2003) by binding to the glycine site (Schell et al., 1995). However, the coagonist of NMDA receptors, was initially thought to be glycine (Johnson and Ascher, 1987; Kleckner and Dingledine, 1988). Glycine immunoreactivity is very low in the cortex and hippocampus, whereas D-serine immunostaining is high (Schell et al., 1995; Schell et al., 1997). Moreover D-serine was reported as a more potent endogenous ligand for the 'glycine-binding site' than glycine (Matsui et al., 1995; Priestley et al., 1995; Furukawa and Gouaux, 2003) although the affinity of this site seems to depend on the type of NR2 subunit co-assembled with NR1 (Kutsuwada et al., 1992; Priestley et al., 1995; Kew et al., 1998) and to vary in function of age and cerebral structure.

eLTP and iLTP induced by HFS protocol were prevented in the presence of DAAO, the enzyme that degrades D-serine (Mothet et al., 2000). Moreover, in the presence of a serine racemase inhibitor, which prevent the D-serine synthesis, HFS application led to the induction of an eLTD and an iLTD as observed in the presence of 7CI-KYN which is a selective blocker of the glycine binding site. This strongly suggests that the activation of NMDARs is D-serine dependent. The discrepancy of the results in the presence of DAAO and SRI can be related to

the fact that DAAO cannot fully degrade released D-serine whereas SRI by blocking the synthesis of D-serine synthesis prevents the activation of NMDARs.

These results question the role of glycine in NMDAR-dependent plasticity induced by HFS protocol. In the presence of glycine oxydase an eLTP was observed but inhibitory inputs were weakly potentiated in such a way that the E/I ratio was enhanced. This result is markedly different from other experiments in which the activation of NMDARs was prevented with D-AP5, 7CI-KYN, DAAO or SRI and in which the E/I ratio remains constant. Indeed the results obtained with glycine oxidase were similar to our previous observations which show that any modification of shunting inhibition disrupts the control of E/I balance. So, glycine does not appear in our cortical network as an effective co-agonist of NMDARs.

Glycine receptors (GlyRs) are reported to be the major provider of neuronal inhibition in spinal cord and brain stem but their role in the forebrain are largely ignored because GlyRs expression is misunderstood (Chattipakorn and McMahon, 2002) and only reported in the early developmental stages. Few studies report the expression of GlyRs in the cortex (Flint et al., 1998) or a role for GlyRs in the regulation of neuronal activity in the hippocampus of 3-4 weeks old rats (Chattipakorn and McMahon, 2002). Another point leading to the misconception of the role of GlyRs in the regulation of neuronal activity in the forebrain is due to the nature of the agonist and its pharmacology. The level of glycine in the cortex is weak (Schell et al., 1995; Schell et al., 1997) and it was reported that glycine is not the endogenous ligand of GlyRs (Hussy et al., 1997; Flint et al., 1998). Several studies show that taurine, synthesized by glial cells is found in high concentration in the cortex (Flint et al., 1998) and can serve as an agonist of GlyRs and GABA_A receptors (Schmieden et al., 1992; Hussy et al., 1997; McCool and Botting, 2000; Chattipakorn and McMahon, 2002; Xu et al., 2006; McCool and Chappell, 2007) although conflicting reports consider that the pharmacology of glycine receptors can change with brain regions (Farroni and McCool, 2004). In this view, we paid a particular attention to the strychnine-sensitive glycine-gated chloride channels (GlyRs) and we showed that GlyRs are present in rat visual cortex of P18-P23 old rats (*histologie en cours*). Moreover, strychnine can enhance the strength of excitatory inputs without changing the strength of inhibitory inputs leading to a strong enhancement of the E/I ratio and the application of HFS protocol in the presence of strychnine weakly potentiated excitatory inputs while inhibitory inputs were depressed. These results indicate that GlyRs are key component of the regulation of the E/I balance through the control of shunting inhibition because the M factor was enhanced in the presence of strychnine.

Finally, the blockade of GlyRs in the visual cortex leads to a form of anti-homeostatic plasticity as already observed in spinal cord (Carrasco et al., 2007). We previously reported that shunting inhibition due to GABA_A receptors activation is an important component controlling the efficiency of the recurrence of excitatory and inhibitory circuits in cortical network (*cf.* article précédent). Taurine, possibly released by glial cells, can participate to the regulation of shunting properties of layer 5 pyramidal neurons by activating GlyRs on the proximal part of the apical dendrite. We conclude that the release of two gliotransmitters, D-serine and taurine, by glia has a crucial role in the control of neuronal excitability in the cortex. D-serine is implicated in the plasticity of excitatory and inhibitory synapses and taurine can control the integration processes in order to maintain the homeostatic plasticity of cortical networks.

Bibliography

- Araque A, Carmignoto G, Haydon PG (2001) Dynamic signaling between astrocytes and neurons. *Annu Rev Physiol* 63:795-813.
- Auld DS, Robitaille R (2003) Glial cells and neurotransmission: an inclusive view of synaptic function. *Neuron* 40:389-400.
- Bergeron R, Meyer TM, Coyle JT, Greene RW (1998) Modulation of N-methyl-D-aspartate receptor function by glycine transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:15730-15734.
- Bezzi P, Volterra A (2001) A neuron-glia signalling network in the active brain. *Curr Opin Neurobiol* 11:387-394.
- Bliss TV, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361:31-39.
- Carrasco MA, Castro PA, Sepulveda FJ, Cuevas M, Tapia JC, Izaurieta P, Zundert B, Aguayo LG (2007) Anti-homeostatic synaptic plasticity of glycine receptor function after chronic strychnine in developing cultured mouse spinal neurons. *J Neurochem* 100:1143-1154.
- Chattipakorn SC, McMahon LL (2002) Pharmacological characterization of glycine-gated chloride currents recorded in rat hippocampal slices. *J Neurophysiol* 87:1515-1525.
- Cline H (2005) Synaptogenesis: a balancing act between excitation and inhibition. *Curr Biol* 15:R203-205.
- Coyle JT, Tsai G, Goff DC (2002) Ionotropic glutamate receptors as therapeutic targets in schizophrenia. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 1:183-189.
- Coyle JT, Tsai G, Goff D (2003) Converging evidence of NMDA receptor hypofunction in the pathophysiology of schizophrenia. *Ann N Y Acad Sci* 1003:318-327.
- Danysz W, Parsons AC (1998) Glycine and N-methyl-D-aspartate receptors: physiological significance and possible therapeutic applications. *Pharmacol Rev* 50:597-664.
- Deleuze C, Alonso G, Lefevre IA, Duvoid-Guillou A, Hussy N (2005) Extrasynaptic localization of glycine receptors in the rat supraoptic nucleus: further evidence for their involvement in glia-to-neuron communication. *Neuroscience* 133:175-183.
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF (1999) The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51:7-61.

- Farroni JS, McCool BA (2004) Extrinsic factors regulate partial agonist efficacy of strychnine-sensitive glycine receptors. *BMC Pharmacol* 4:16.
- Flint AC, Liu X, Kriegstein AR (1998) Nonsynaptic glycine receptor activation during early neocortical development. *Neuron* 20:43-53.
- Furukawa H, Gouaux E (2003) Mechanisms of activation, inhibition and specificity: crystal structures of the NMDA receptor NR1 ligand-binding core. *Embo J* 22:2873-2885.
- Hashimoto A, Nishikawa T, Oka T, Takahashi K (1993) Endogenous D-serine in rat brain: N-methyl-D-aspartate receptor-related distribution and aging. *J Neurochem* 60:783-786.
- Hashimoto A, Nishikawa T, Hayashi T, Fujii N, Harada K, Oka T, Takahashi K (1992) The presence of free D-serine in rat brain. *FEBS Lett* 296:33-36.
- Haydon PG (2001) GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci* 2:185-193.
- Hussy N, Deleuze C, Pantaloni A, Desarmenien MG, Moos F (1997) Agonist action of taurine on glycine receptors in rat supraoptic magnocellular neurones: possible role in osmoregulation. *J Physiol* 502 (Pt 3):609-621.
- Johnson JW, Ascher P (1987) Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* 325:529-531.
- Kemp JA, McKernan RM (2002) NMDA receptor pathways as drug targets. *Nat Neurosci* 5 Suppl:1039-1042.
- Kew JN, Richards JG, Mutel V, Kemp JA (1998) Developmental changes in NMDA receptor glycine affinity and ifenprodil sensitivity reveal three distinct populations of NMDA receptors in individual rat cortical neurons. *J Neurosci* 18:1935-1943.
- Kleckner NW, Dingledine R (1988) Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science* 241:835-837.
- Krasteniakov NV, Martina M, Bergeron R (2005) Role of the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor in synaptic plasticity induced by pairing. *Eur J Neurosci* 21:2782-2792.
- Kutsuwada T, Kashiwabuchi N, Mori H, Sakimura K, Kushiya E, Araki K, Meguro H, Masaki H, Kumanishi T, Arakawa M, et al. (1992) Molecular diversity of the NMDA receptor channel. *Nature* 358:36-41.
- Laming PR, Kimelberg H, Robinson S, Salm A, Hawrylak N, Muller C, Roots B, Ng K (2000) Neuronal-glia interactions and behaviour. *Neurosci Biobehav Rev* 24:295-340.
- Le Roux N, Amar M, Baux G, Fossier P (2006) Homeostatic control of the excitation-inhibition balance in cortical layer 5 pyramidal neurons. *Eur J Neurosci* 24:3507-3518.
- Mangin JM, Guyon A, Eugene D, Paupardin-Tritsch D, Legendre P (2002) Functional glycine receptor maturation in the absence of glycinergic input in dopaminergic neurones of the rat substantia nigra. *J Physiol* 542:685-697.
- Martina M, Krasteniakov NV, Bergeron R (2003) D-Serine differently modulates NMDA receptor function in rat CA1 hippocampal pyramidal cells and interneurons. *J Physiol* 548:411-423.
- Matsui T, Sekiguchi M, Hashimoto A, Tomita U, Nishikawa T, Wada K (1995) Functional comparison of D-serine and glycine in rodents: the effect on cloned NMDA receptors and the extracellular concentration. *J Neurochem* 65:454-458.
- McCool BA, Botting SK (2000) Characterization of strychnine-sensitive glycine receptors in acutely isolated adult rat basolateral amygdala neurons. *Brain Res* 859:341-351.
- McCool BA, Chappell A (2007) Strychnine and taurine modulation of amygdala-associated anxiety-like behavior is 'state' dependent. *Behav Brain Res* 178:70-81.
- Mori M, Gahwiler BH, Gerber U (2002) Beta-alanine and taurine as endogenous agonists at glycine receptors in rat hippocampus in vitro. *J Physiol* 539:191-200.

- Mothet JP, Parent AT, Wolosker H, Brady RO, Jr., Linden DJ, Ferris CD, Rogawski MA, Snyder SH (2000) D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:4926-4931.
- Nedergaard M, Takano T, Hansen AJ (2002) Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nat Rev Neurosci* 3:748-755.
- Newman EA (2003) New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission. *Trends Neurosci* 26:536-542.
- Oliet SH, Piet R, Poulain DA (2001) Control of glutamate clearance and synaptic efficacy by glial coverage of neurons. *Science* 292:923-926.
- Panatier A, Theodosis DT, Mothet JP, Touquet B, Pollegioni L, Poulain DA, Oliet SH (2006) Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory. *Cell* 125:775-784.
- Priestley T, Laughton P, Myers J, Le Bourdelles B, Kerby J, Whiting PJ (1995) Pharmacological properties of recombinant human N-methyl-D-aspartate receptors comprising NR1a/NR2A and NR1a/NR2B subunit assemblies expressed in permanently transfected mouse fibroblast cells. *Mol Pharmacol* 48:841-848.
- Sawa A, Snyder SH (2003) Schizophrenia: neural mechanisms for novel therapies. *Mol Med* 9:3-9.
- Schell MJ, Molliver ME, Snyder SH (1995) D-serine, an endogenous synaptic modulator: localization to astrocytes and glutamate-stimulated release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:3948-3952.
- Schell MJ, Brady RO, Jr., Molliver ME, Snyder SH (1997) D-serine as a neuromodulator: regional and developmental localizations in rat brain glia resemble NMDA receptors. *J Neurosci* 17:1604-1615.
- Schmieden V, Kuhse J, Betz H (1992) Agonist pharmacology of neonatal and adult glycine receptor alpha subunits: identification of amino acid residues involved in taurine activation. *Embo J* 11:2025-2032.
- Song W, Chattipakorn SC, McMahon LL (2006) Glycine-gated chloride channels depress synaptic transmission in rat hippocampus. *J Neurophysiol* 95:2366-2379.
- Volterra A, Meldolesi J (2005) Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci* 6:626-640.
- Wang F, Xiao C, Ye JH (2005) Taurine activates excitatory non-synaptic glycine receptors on dopamine neurones in ventral tegmental area of young rats. *J Physiol* 565:503-516.
- Wang LZ, Zhu XZ (2003) Spatiotemporal relationships among D-serine, serine racemase, and D-amino acid oxidase during mouse postnatal development. *Acta Pharmacol Sin* 24:965-974.
- Wolosker H, Sheth KN, Takahashi M, Mothet JP, Brady RO, Jr., Ferris CD, Snyder SH (1999) Purification of serine racemase: biosynthesis of the neuromodulator D-serine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:721-725.
- Wroblewski JT, Fadda E, Mazzetta J, Lazarewicz JW, Costa E (1989) Glycine and D-serine act as positive modulators of signal transduction at N-methyl-D-aspartate sensitive glutamate receptors in cultured cerebellar granule cells. *Neuropharmacology* 28:447-452.
- Xu H, Wang W, Tang ZQ, Xu TL, Chen L (2006) Taurine acts as a glycine receptor agonist in slices of rat inferior colliculus. *Hear Res* 220:95-105.
- Yang Y, Ge W, Chen Y, Zhang Z, Shen W, Wu C, Poo M, Duan S (2003) Contribution of astrocytes to hippocampal long-term potentiation through release of D-serine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:15194-15199.

C) Conclusions

1. Les récepteurs NMDA

Ces résultats montrent que l'induction de la potentiation des afférences excitatrices et des afférences inhibitrices sur les neurones pyramidaux de couche 5 dépend de l'activation des récepteurs NMDA soit du type NR2B soit du type NR2A selon le stade de développement. La potentiation de l'excitation et de l'inhibition dépend des récepteurs NMDA contenant la sous-unité NR2B au cours de la période critique du développement postnatal (pour des rats âgés de 17 à 23 jours) alors qu'en fin de période critique (pour des rats âgés de 29 à 32 jours), la potentiation dépend des récepteurs NMDA contenant la sous-unité NR2A. Ainsi, il apparaît que les mécanismes à l'origine de la plasticité synaptique au niveau des réseaux corticaux évoluent au cours du développement, ce qui expliquerait la variabilité des résultats quant au type de sous-unité NR2 impliqué dans l'induction de ce processus et quant à la spécificité des antagonistes.

Nous avons également observé que le blocage du site de fixation du co-agoniste des récepteurs NMDA sur sa sous-unité NR1 est capable de « renverser » la plasticité. En effet, l'application du protocole de stimulation à haute fréquence induisant la potentiation des entrées excitatrices et des entrées inhibitrices entraîne en présence d'un bloqueur, une dépression à long terme de l'efficacité de ces entrées. Par conséquent l'activation de la sous-unité NR1 par son co-agoniste apparaît central dans l'orientation de la plasticité vers des formes de LTP ou de LTD.

Ces résultats mettent en évidence le rôle central des récepteurs NMDA dans l'expression de la plasticité homéostatique des réseaux neuronaux corticaux. Toutefois, il est intéressant de noter que, quel que soit l'état d'activation des récepteurs NMDA, aucune modification de la balance E/I n'est observée du fait de la potentiation ou de l'absence de potentiation réciproque de l'excitation et de l'inhibition. Par conséquent, ces résultats excluent une implication des récepteurs NMDA dans la régulation du niveau d'excitabilité basale des neurones pyramidaux corticaux.

2. Les récepteurs glycinergiques

Nous avons ensuite montré que la dégradation de la glycine par la glycine oxydase entraîne une modification de la balance E/I. Ce résultat nous a conduit à étudier le rôle des récepteurs glycinergiques dans le contrôle du niveau d'excitabilité des neurones pyramidaux. Le blocage des récepteurs glycinergiques provoque une augmentation importante de la balance E/I et par conséquent la perte du contrôle de l'excitabilité neuronale. Cette augmentation de la balance E/I résulte de l'augmentation de la composante excitatrice sans changement de la composante inhibitrice, ce qui tend à signifier que les récepteurs glycinergiques sont localisés sur les neurones excitateurs. Toutefois, le blocage des récepteurs glycinergiques entraîne également une diminution de l'inhibition shuntante ce qui indique que comme pour les récepteurs GABA_A, les récepteurs glycinergiques participent à l'intégration des signaux excitateurs reçus par le neurone pyramidal.

Enfin, l'application d'un protocole de stimulation à haute fréquence en présence d'un bloqueur des récepteurs glycinergiques entraîne toujours une potentiation de l'excitation mais induit une dépression de l'inhibition, ce qui montre clairement que le système glycinergique possède un rôle important dans la régulation de l'activité des réseaux neuronaux corticaux.

3. Les gliotransmetteurs

Finalement, nous pouvons tenter de relier l'activation des récepteurs NMDA et glycinergiques à la libération de gliotransmetteurs spécifiques. La D-sérine synthétisée par les astrocytes apparaît sur notre modèle expérimental comme le principal co-agoniste des récepteurs NMDA. En empêchant la synthèse de D-sérine le protocole de stimulation à haute fréquence induit une dépression à long terme de l'excitation et de l'inhibition similaire à celles observées lors du blocage du site de fixation de la sous-unité NR1. Par ailleurs, la taurine un autre gliotransmetteur, est capable d'activer les récepteurs glycinergiques corticaux.

Il semble donc que les cellules gliales aient un rôle prépondérant dans le contrôle de l'activité corticale par action de la taurine sur les récepteurs glycinergiques et dans l'expression de la plasticité homéostatique par action de la D-sérine sur les récepteurs NMDA.

IV. Etude du rôle du monoxyde d'azote dans les processus corticaux.

A) Position du problème

L'activation des récepteurs NMDA par des protocoles de stimulation à haute fréquence provoque une augmentation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} . Cette augmentation est à l'origine de l'induction des phénomènes de potentiation par des mécanismes très débattus. Il a été montré que le signal Ca^{2+} active la calmoduline, ce qui permet d'activer les deux formes de NOS présentes dans les neurones : les NO-Synthase neuronale et endothéliale (nNOS et eNOS). Le NO est synthétisé à la demande par ces enzymes et de par ses propriétés particulières, molécule très réactive, apolaire, ayant une demi-vie de quelques secondes dans les milieux biologiques, le NO semble impliqué dans de nombreuses fonctions cérébrales (Garthwaite & Boulton, 1995 ; Esplugues, 2002). Sa participation dans les phénomènes de LTP et de LTD a été plus particulièrement étudiée (Garthwaite & Boulton, 1995 ; Snyder et al., 1998 ; Contestabile, 2000). Il a été montré que le blocage non-spécifique des différentes formes de NOS empêche l'induction de la LTP (Böhme et al., 1991 ; O'Dell et al., 1991 ; Schuman & Madison, 1991). L'utilisation de souris transgéniques pour les formes endothéliales et neuronales de la NOS a permis de mettre en évidence que ces deux isoformes sont impliquées dans l'induction de la LTP (O'Dell et al., 1994 ; Son et al., 1996).

La mise au point d'antagoniste spécifique de la forme neuronale de la NOS a récemment permis de différencier deux types de signaux dépendant du NO au niveau des neurones pyramidaux de l'hippocampe, un signal tonique qui résulterait de la NOS endothéliale et un signal phasique provenant de la NOS neuronale (Hopper & Garthwaite, 2006). Toutefois, aucune évidence quant à l'existence d'un rôle différentiel de ces deux types de signaux n'a encore été démontrée dans le cortex.

En se basant sur ces données, j'ai voulu déterminer d'une part si la synthèse de NO est nécessaire à l'expression des phénomènes de potentiation homéostatique de l'excitation et de l'inhibition et d'autre part, quels sont les rôles fonctionnels des signaux nitreurgiques tonique ou phasique.

B) Résultats

“Tonic NO signals control the excitation / inhibition balance in cortical layer 5 pyramidal neurons, whereas cortical plasticity depends on phasic NO signals”

LE ROUX Nicolas, AMAR Muriel, MOREAU Alexandre, BAUX Gérard et FOSSIER Philippe.

(En préparation).

Abstract

In the brain, nitric oxide (NO) resulting from activation of NMDA receptors plays a critical role in the control of synaptic plasticity processes. We have previously shown in rat visual cortex that the application of a high frequency of stimulation (HFS) in layer 2/3 leads to a parallel potentiation of excitatory and inhibitory inputs received by cortical layer 5 pyramidal neurons without changing the excitation/inhibition (E/I) balance of the pyramidal neuron, and depending on NMDA receptors activation.

Our purpose was to determine the role of NO signals in cortical network processes. The blockade of NO-synthase (NOS) led to the disruption of the E/I balance of layer 5 pyramidal neurons in such a way that a role of a basal tonic NO synthesis can be suspected. Since L-VNIO, a specific blocker of neuronal NOS did not change the E/I balance, the tonic NO signal might be elaborated by the endothelial NOS in the neurons. Moreover, the normal homeostatic plasticity process induced by HFS protocol was prevented in the presence of L-VNIO. This result is in favor of a phasic NO signal generated by the activation of NMDA receptors.

Our results provide evidence that a tonic NO signal supports the control of the level of excitability of layer 5 pyramidal neurons, whereas a phasic NO signal supports the induction of cortical plasticity.

Keywords: nitric oxide, tonic, phasic, NMDA receptors, cortical networks, plasticity, excitability.

Introduction

NO plays a role in many aspects of CNS function (Garthwaite and Boulton, 1995; Esplugues, 2002) particularly in the regulation of neurotransmitter release and synaptic plasticity (Garthwaite and Boulton, 1995; Snyder et al., 1998; Contestabile, 2000). Inhibition of NOS prevented the development of LTP (Bohme et al., 1991; O'Dell et al., 1991; Schuman and Madison, 1991), and gene targeting suggests that both neuronal NO-synthase (nNOS) and neuronally located endothelial NOS (eNOS) are implicated in this process. Indeed, while LTP is only slightly reduced in nNOS or eNOS null mice (O'Dell et al., 1994), animals deficient in both NOS isozymes exhibit a substantially decreased LTP (Son et al., 1996). Indirect activation of NOS in these processes is assumed to be due to the activation of NMDA receptors at the postsynaptic level (Garthwaite et al., 1988; Brenman and Bredt, 1997; Murphy and Bliss, 1999). Due to its particular properties, a free radical gas, NO is assumed to be a retrograde messenger, which can increase transmitter release in the presynaptic terminals (Garthwaite et al., 1988; O'Dell et al., 1991).

In the visual cortex, NOS is highly expressed (Chung et al., 2004; Yousef et al., 2004) and was reported to control neuronal activity (Cudeiro et al., 1997). Using a method that allows to determine the excitatory and inhibitory components of the response of layer 5 pyramidal neurons to the electrical stimulation of excitatory and inhibitory circuits in layer 2/3 in rat visual cortex, our aim was now to investigate the role of NO in the plasticity of cortical networks. We have previously shown that application of a high frequency stimulation (HFS) protocol in layer 2/3 does not change the excitatory/inhibitory (E/I) ratio due to parallel potentiation of excitatory and inhibitory inputs received by pyramidal neurons (Le Roux et al., 2006) depending on NMDA receptors activation (*cf.* résultats III). We propose here that the homeostatic potentiation of excitatory and inhibitory inputs on layer 5 pyramidal neurons depends on a phasic release of NO arising from nNOS activation. Moreover, a basal tonic synthesis of NO, depending of eNOS activity, can be involved in the control of the E/I balance of pyramidal neurons.

Methods

Les méthodes sont identiques à celles utilisées pour les articles précédents.

Drugs

L-arginine, D-arginine, L-NAME (*N*-Nitro-L-arginine methyl ester) were purchased from Sigma (St-Louis, Missouri). PAPA-NONOATE (Propylamine Propylamine NONOate), L-NMMA (N-Monomethyl-L-Arginine.Monoacetate) and Carboxy-PTIO (2-[4-Carboxyphenyl]-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide) were purchased from Cayman chemical (Ann Arbor, Michigan). L-VNIO (N⁵-[1-Imino-3-butenyl]-L-ornithine) was purchased from Alexis Biochemicals (Lausen, Suisse). Drugs were dissolved in the perfusate for at least 15 min before recordings.

Results

Effects of nitric oxide on the E/I balance in cortical pyramidal neurons

In order to characterize effects of nitric oxide (NO) on the E/I balance of layer 5 pyramidal neurons, we used a NO precursor (L-arginine) and a NO donor (PAPA-NONOATE) to increase the NO concentration in visual cortical slices.

Application of 200 μ M L-arginine induced an increase in the amplitude of current responses of a layer 5 pyramidal neuron to electrical stimulation applied in layer 2/3 (Fig. 1A). The decomposition of current responses in conductance changes (see methods) showed that the total conductance changes and the excitatory and inhibitory conductance changes were increased (Fig. 1A; middle and lower traces). Statistical analysis of the global population ($n = 15$) showed that intgT , intgE and intgI were significantly enhanced by $46.2 \pm 11.1 \%$, $50.47 \pm 20.4 \%$ and $48.6 \pm 14.7 \%$, respectively (Fig. 1B1). Due to parallel increase of intgE and intgI , the percentage of excitation (expressed as percents of intgE to intgT) and the percentage of inhibition (expressed as percents of intgI to intgT) remained unchanged (Fig. 1B2); indicating the lack of change in the E/I balance.

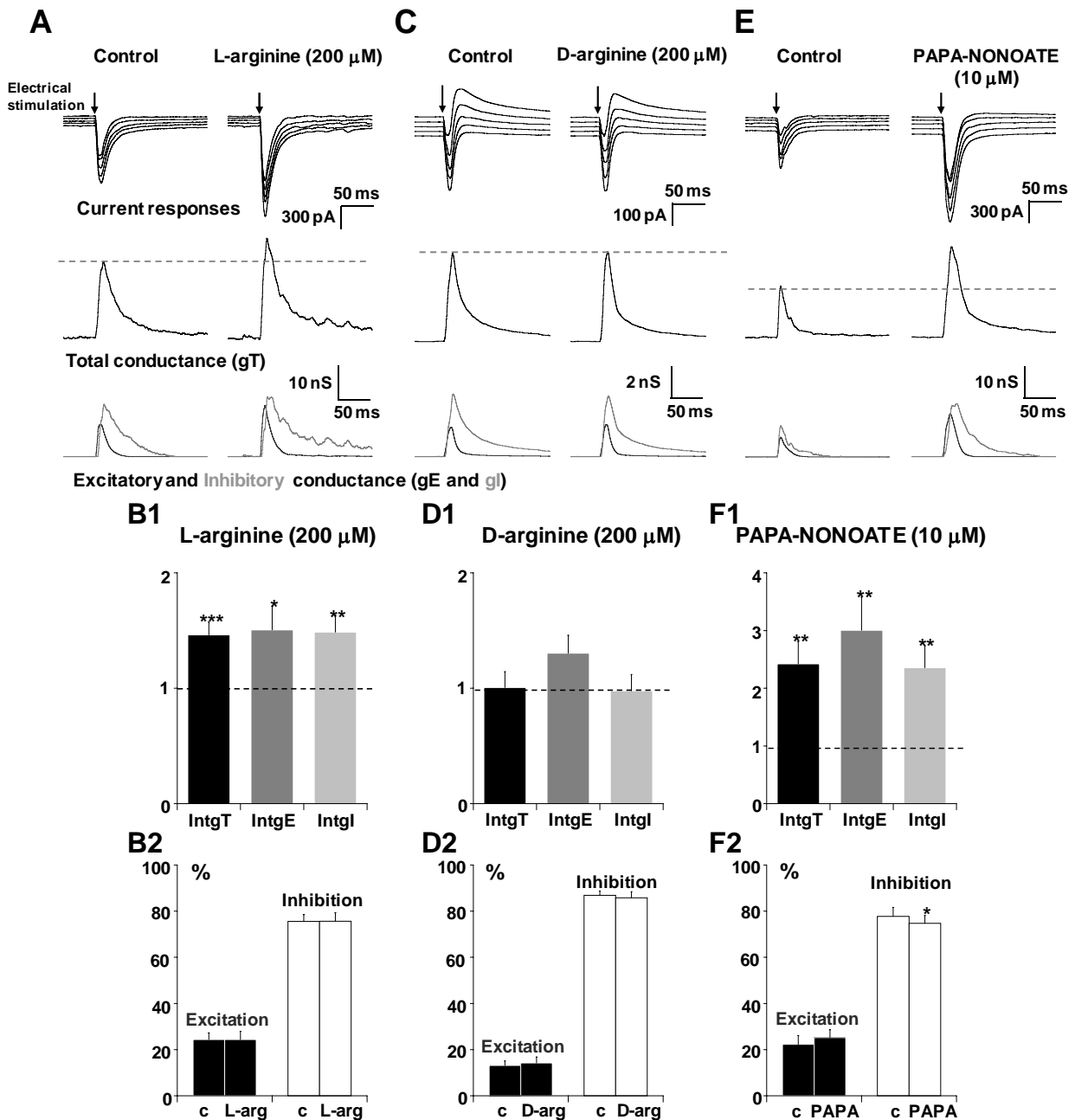


Figure 1. Effects of exogenous application of nitric oxide on the E/I balance of layer 5 pyramidal neurons.

(A, C, E) **Upper traces:** current responses of a layer 5 pyramidal neuron to electrical stimulation (black arrow) applied in layer 2/3: left column in control conditions and right column, 20 min after perfusion of 200 μ M L-arginine (A); 200 μ M D-arginine (C) and 10 μ M PAPA-NONOATE (E). Holding potentials scaled from -80 to -60 mV **Medium traces:** decomposition of the responses in total conductance change (gT). **Lower traces:** decomposition of gT in excitatory and inhibitory conductance changes. Note that, for stimulation in layer 2-3 in the presence of L-arginine or PAPA-NONOATE, total, excitatory and inhibitory conductance changes were increased.

(B1) Relative changes (compared to control) of intgT (black), intgE (dark grey) and intgI (light grey), in the presence of 200 μ M L-arginine (n = 15) (***) p < 0.001, ** p < 0.01 and * p < 0.05).

(B2) Relative contribution of excitatory and inhibitory conductance changes to the total conductance change in the presence of L-arginine (c: control).

(D1-D2; F1-F2) Legends are identical than in B1-B2. (D1-D2) Application of 200 μ M D-arginine (n = 8). (F1-F2) application of 10 μ M PAPA-NONOATE (n = 11). Note that in the presence of PAPA-NONOATE, total, excitatory and inhibitory conductance changes were strongly increased.

To check that this effect can be attributable to the synthesis of NO, we applied 200 μ M D-arginine. No significant modification of total, excitatory and inhibitory conductance changes were observed (Fig. 1C for representative recordings and Fig. 1D1 for the statistical analysis of the global population, $n = 8$). Consequently, no modification of the E/I ratio was observed (Fig. 1D2).

In the presence of 10 μ M PAPA-NONOATE, a NO donor, a strong increase of the amplitude of current responses of layer 5 pyramidal neurons to electrical stimulations was observed (Fig. 1E). Total, excitatory and inhibitory conductance changes were significantly increased (Fig. 1E). IntgT, intgE and intgI increased by 142.3 ± 38.5 % ($n = 11$), 200.3 ± 57.2 % and 135.6 ± 38 %, respectively (Fig. 1F1). The percentage of inhibition (expressed as percent of intgI to intgT) was significantly decreased ($p < 0.05$) from 77.7 ± 3.9 % to 74.7 ± 3.4 % leading to an increased E/I ratio.

We conclude that the potentiation of total, excitatory and inhibitory conductance changes observed in the presence of L-arginine was due to NO synthase (NOS) activity without changing the E/I ratio. On the contrary, an exogenous application of NO can disrupt the E/I balance. Thus a possible role of NO on the strength of excitatory and inhibitory inputs on layer 5 pyramidal neurons was suspected but physiological conditions governing NO synthesis remain to be established. In this scope, the possibility of a basal tonic synthesis of NO was checked by blocking NOS activity with 10 μ M L-NAME, 10 μ M L-NMMA or by scavenging NO.

Representative recordings of layer 5 pyramidal neurons following electrical stimulation in layer 2/3 in the presence of NOS antagonists showed no significant modification of total, excitatory or inhibitory conductance changes (Fig. 2A and Fig. 2C). The statistical analysis of either 10 or 8 experiments in the presence of L-NAME or L-NMMA respectively confirmed these observations (Fig. 2B1 or Fig. 2D1). However, due to weak opposite effects of NOS antagonists on IntgE and IntgI, the E/I ratio was changed, from 17.9 ± 3.2 % to 22.5 ± 4.5 % for excitation and from 82.1 ± 3.2 % to 77.5 ± 4.5 % for inhibition in the presence of L-NAME (Fig. 2B2) and from 19.4 ± 3 % to 25.9 ± 4 % for excitation and from 80.6 ± 3 % to 74.1 ± 4 % for inhibition in the presence of L-NMMA (Fig. 2D2). In the presence of a nitric oxide scavenger (10 μ M, carboxy-PTIO) a slight increase of excitation and a weak decrease of inhibition were observed (Fig. 2E for representative recordings and Fig. 2F1 for statistical analysis of the global population, $n = 12$) and a significant enhancement of the E/I ratio ($p < 0.05$) appeared (Fig. 2F2).

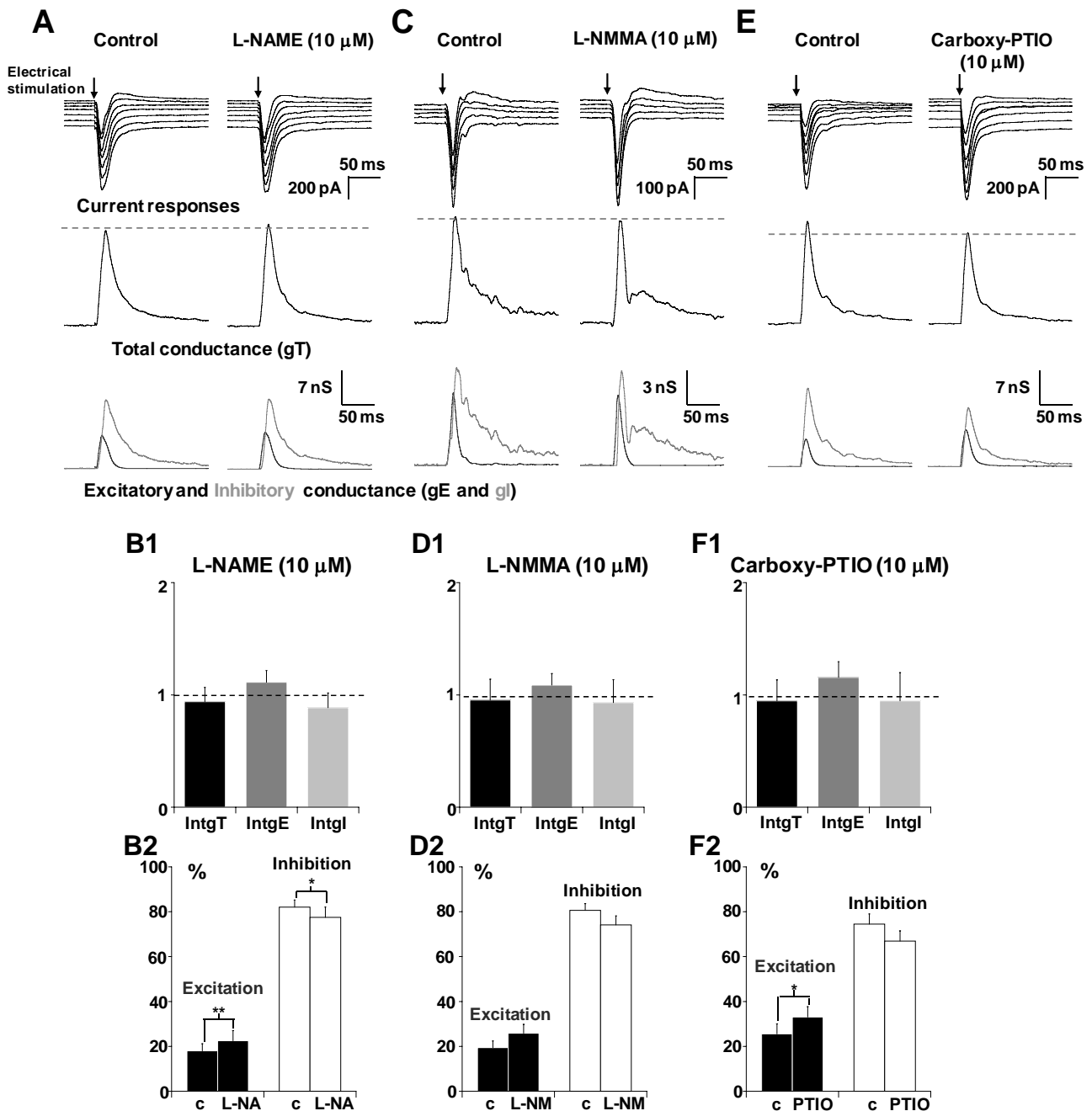


Figure 2. Effects of tonic NO signals on the E/I balance of layer 5 pyramidal neurons.

(A, C, E) **Upper traces:** current responses of a layer 5 pyramidal neuron to electrical stimulation (black arrow) applied in layer 2/3: left column in control conditions and right column, 20 min after perfusion of 10 μM L-NAME (A); 10 μM L-NMMA (C) and 10 μM Carboxy-PTIO (E). Holding potentials scaled from – 80 to – 60 mV. **Medium traces:** decomposition of the responses in total conductance change (gT). **Lower traces:** decomposition of gT in excitatory and inhibitory conductance changes. No significant modifications of total, excitatory and inhibitory conductance changes were observed.

(B1) Relative changes (compared to control) of intgT (black), intgE (dark grey) and intgI (light grey), in the presence of 10 μM L-NAME (n = 10).

(B2) Relative contribution of excitatory and inhibitory conductance changes to the total conductance change in the presence of L-NAME (c: control; *** p < 0.001, ** p < 0.01 and * p < 0.05).

(D1-D2; F1-F2) Legends are identical than in B1-B2. (D1-D2) Application of 10 μM L-NMMA (n = 12). (F1-F2) application of 10 μM C-PTIO (n = 12). Note that in the presence of C-PTIO, the E/I ratio increases.

These experiments are in favour of a tonic NO level in cortical slices which can intervene in the regulation of the excitability of layer 5 pyramidal neurons.

Involvement of NO in the homeostatic potentiation of excitatory and inhibitory inputs on layer 5 pyramidal neurons

We previously showed that application of HFS protocol in layer 2/3 induced a parallel potentiation of excitatory and inhibitory inputs received by a layer 5 pyramidal neuron (Le Roux et al., 2006). Moreover, these potentiating effects were shown to be dependent on the activation of NMDARs (*cf.* résultats III) and this activation of NMDARs was ordinarily reported to elicit a burst of NO (Chetkovich et al., 1993; Monfort et al., 2002). So, we used HFS protocol application in order to determine the involvement of NO in the induction of the potentiating effects of excitation and inhibition.

We have previously observed a potentiation of the total, excitatory and inhibitory conductance changes by about 45, 35 and 48 %, respectively after application of a HFS protocol in layer 2/3 (Le Roux et al. 2006). Similar potentiating effects have been observed in the presence of L-arginine (figure 1) and HFS protocol was ineffective after the application of L-arginine. No significant variation of total, excitatory or inhibitory conductance changes were observed (Fig. 3A for representative recordings and Fig.3B for statistical analysis of the global population, n = 13) and consequently the E/I ratio was unchanged (Fig. 3C). In the presence of L-NAME, the NOS blocker, application of a HFS protocol failed to induce the potentiation of excitatory and inhibitory conductance changes (Fig. 3D for representative recordings and Fig.3E for statistical analysis of the global population, n = 14).

These results indicate that HFS protocol induced the synthesis of a phasic NO signal which is required to induce the homeostatic potentiation of excitatory and inhibitory inputs on layer 5 pyramidal neurons.

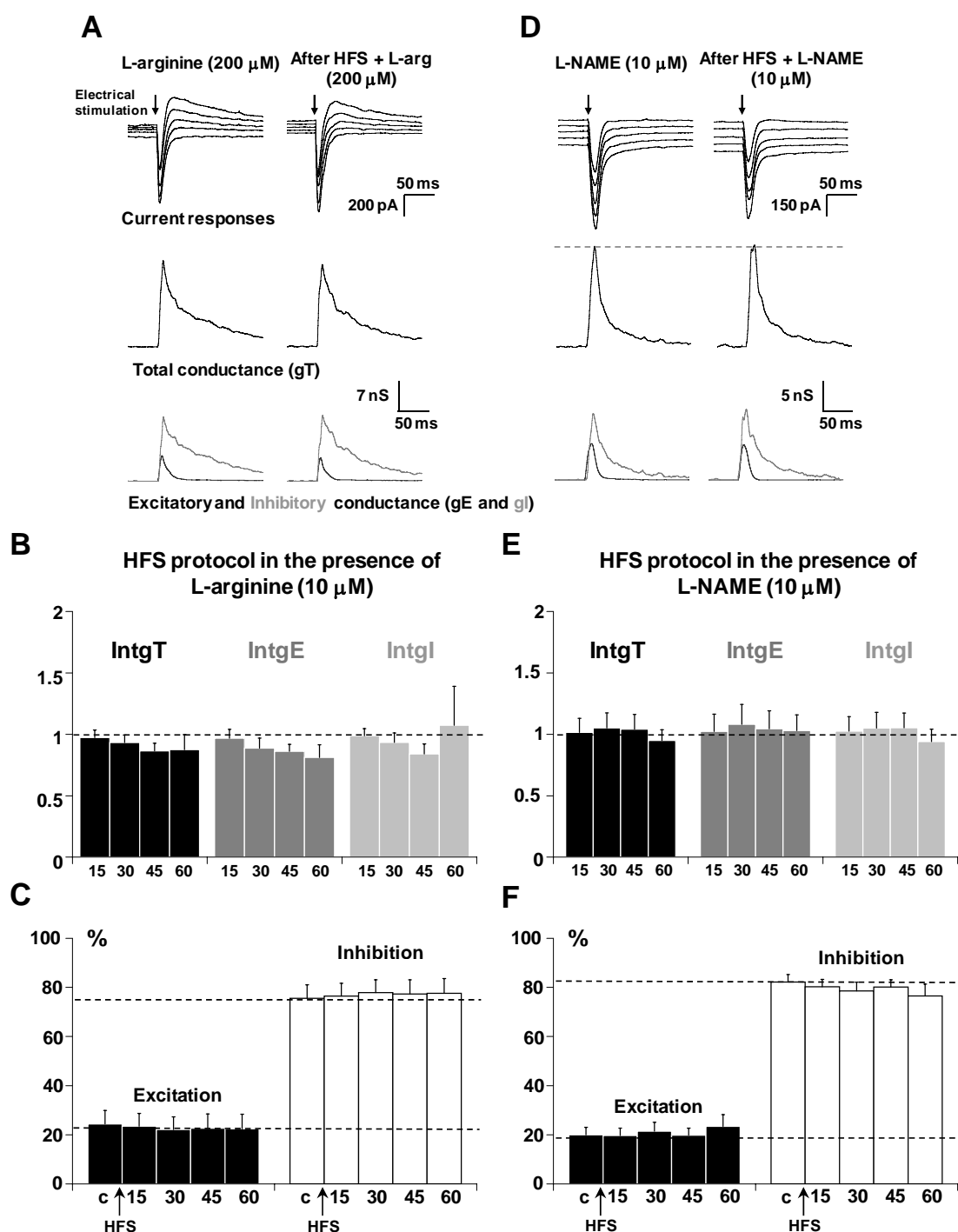


Figure 3. Involvement of nitric oxide in the potentiation induced by application of HFS protocol in layer 2/3.

(**A and D**) The left column shows a representative recording before HFS application and the right column 60 min after application of HFS in layer 2/3 in the presence of 200 μ M L-arginine (**A**) or 10 μ M L-NAME (**D**). **Upper traces:** current responses of a layer 5 pyramidal neuron to electrical stimulation. Imposed membrane potential ranged for -60 to -80 mV. **Medium traces:** decomposition of the responses in total conductance change (gT). **Lower traces:** decomposition of gT in excitatory and inhibitory conductance changes (gE, dark grey and gI, light grey).

(**B**) Relative changes (compared to control) of intgT (black bars), intgE (dark grey bars) and intgI (light grey bars), after HFS in layer 2/3 ($n = 13$) in the presence of 200 μ M L-arginine.

(**C**) Relative contribution of excitation and inhibition conductance changes to the total conductance change, after HFS in the presence of 200 μ M L-arginine (c:control before HFS protocol).

(**E-F**) Application of HFS protocol in the presence of 10 μ M L-NAME ($n = 14$). Legends are identical than in **B-C**.

Involvement of neuronal NOS in the homeostatic potentiation of excitatory and inhibitory inputs on layer 5 pyramidal neurons

In order to characterize the NOS isoform involved in the induction of the homeostatic potentiation of excitatory and inhibitory inputs, we used L-VNIO a specific antagonist of the neuronal NOS (nNOS) (Alderton et al., 2001; Erdal et al., 2005; Hopper and Garthwaite, 2006). Application of 10 μ M L-VNIO did not induce significant change of total, excitatory and inhibitory conductance changes (Fig. 4A, control and before HFS for representative recordings and Fig.4B for statistical analysis of the global population, n = 15). Under these conditions, the E/I ratio was unchanged (Fig. 4C).

Application of HFS protocol did not modify total, excitatory and inhibitory conductance changes (Fig. 4A for representative recordings and Fig.4D for statistical analysis of the global population, n = 11). Consecutively, the E/I ratio was unchanged (Fig. 4E). These results indicate that NO synthesis by nNOS is required for the homeostatic potentiation of the excitatory and inhibitory inputs in layer 5 pyramidal neurons.

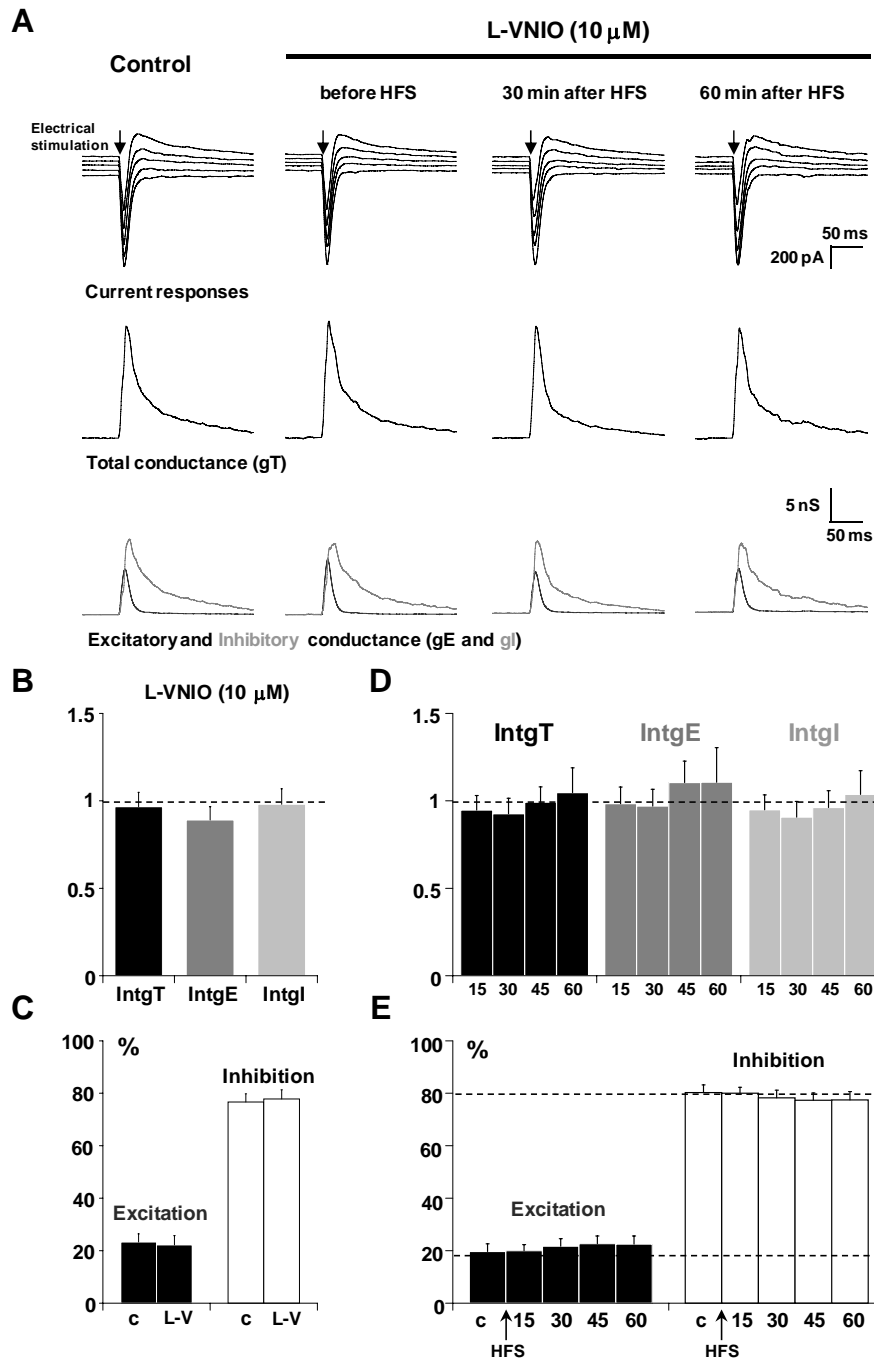


Figure 4. Involvement of neuronal NOS in the potentiation induced by application of HFS protocol in layer 2/3.

(A) Representative recordings for a neuron in control condition (left column), after 20 min application of 10 μ M L-VNIO (the nNOS antagonist, second column) and after application of HFS protocol (during 30 and 60 min, third and last column). **Upper traces:** current responses of a layer 5 pyramidal neuron to electrical stimulation. Imposed membrane potential ranged for -60 to -80 mV. **Medium traces:** decomposition of the responses in total conductance change (gT). **Lower traces:** decomposition of gT in excitatory and inhibitory conductance changes (gE, dark grey and gI, light grey).

(B) Relative changes (compared to control) of intgT (black bars), intgE (dark grey bars) and intgl (light grey bars), after HFS in layer 2/3 ($n = 13$) in the presence of 10 μ M L-VNIO ($n = 15$).

(C) Relative contribution of excitatory (black) and inhibitory (white) conductance changes to the total conductance change in the presence of L-VNIO.

(D) Relative changes (compared to control) of intgT (black bars), intgE (dark grey bars) and intgl (light grey bars), after HFS in layer 2/3 ($n = 11$) in the presence of 10 μ M L-VNIO.

(E) Relative contribution of excitation and inhibition conductance changes to the total conductance change, after HFS in the presence of 10 μ M L-VNIO. (c: control before HFS protocol).

Discussion

Our results indicate that (i) NO can modulate the E/I balance and consequently the level of excitability of layer 5 pyramidal neurons and (ii) NO has important effect for the induction of homeostatic potentiation of excitatory and inhibitory inputs in layer 5 pyramidal neurons.

(i) Effects of NO on the E/I balance of layer 5 pyramidal neurons

In the presence of NOS antagonists or of a NO-scavenger, an increase of the E/I balance can be suspected. This result is in favor of a basal and tonic synthesis of NO which participates in the regulation of the level of excitability of layer 5 pyramidal neurons. Taking into account that a specific nNOS antagonist did not modify the E/I balance, this tonic NO signal may results from the activation of eNOS as recently proposed in the hippocampus (Hopper and Garthwaite, 2006).

(ii) Effects of NO on the homeostatic potentiation of excitatory and inhibitory inputs received by layer 5 pyramidal neurons

The role of NO in synaptic plasticity has been largely investigated (Garthwaite and Boulton, 1995; Hawkins et al., 1998; Haghikia et al., 2007) and the synthesis of NO is assumed to be the consequence of NMDA receptors activation (Garthwaite et al., 1988; Brenman and Bredt, 1997; Murphy and Bliss, 1999). The induction of homeostatic potentiation of layer 5 pyramidal neurons inputs induced by application of a HFS protocol in layer 2/3 was prevented by the blockade of NOS, indicating that synthesis of NO was required and probably dependent on NMDA receptors activation (*cf.* Résultats III). Due to the HFS protocol, the generation of a phasic NO signal can be considered. Indeed, the application of L-arginine that we checked was another way to produce a phasic NO signal. It leads to an increase of total, excitatory and inhibitory conductance changes similar to those obtained after the application of a HFS protocol in layer 2/3. As observed after HFS, the parallel increase of excitation and inhibition induce by L-arginine did not change the E/I balance. Similar observations were made in hippocampus, where administration of exogenous NO paired with a weak tetanic stimulation of afferent fibers (Bohme et al., 1991; Bon et al., 1992; Arancio et al., 1996; Malen and Chapman, 1997; Bon and Garthwaite, 2003). Our results suggest that phasic NO signal is required and sufficient to induce homeostatic potentiation because application of a HFS protocol in the presence of L-arginine failed to induce any potentiation. This result can

be explained by the fact that NO render freshly conditioned synapses refractory to further NMDA receptor dependent plasticity (Murphy et al., 1999).

Differentiation of the effects between NOS isoforms were observed for nNOS- or eNOS-deficient mice (O'Dell et al., 1994; Wilson et al., 1999; Hopper and Garthwaite, 2006). The NO-dependent LTP was prevented only for combined deficit in eNOS and nNOS (Son et al., 1996). However, this approach is problematic due to the compensation by splice variants (Eliasson et al., 1997). Thus much effort has exerted for the discovery of selective inhibitors of the different NO synthase isoforms. Some compounds, as L-VNIO, are now reported to specifically block the nNOS (Erdal et al., 2005; Hopper and Garthwaite, 2006). In the presence of L-VNIO, the potentiation induced by HFS application was prevented without modification of the E/I balance, indicating that nNOS activation was required to generate phasic NO signals necessary for the potentiation. However, an exclusive role of nNOS in the potentiating effect can not be completely discarded due to the lack of specific eNOS antagonist and to the fact that a tonic NO signal (due to eNOS activation) was required for the induction of LTP (Bon and Garthwaite, 2003).

A differential role for eNOS and nNOS has been proposed, indicating that phasic NO signal was generated by nNOS and tonic NO signal by eNOS (Hopper and Garthwaite, 2006). Our results provide further evidence for such a differential role of tonic and phasic NO signals in cortical network processes. Tonic NO signal seems control neuronal excitability whereas phasic NO signal was involved in the induction of homeostatic potentiation of the strength of the inputs perceived by cortical layer 5 pyramidal neurons.

Bibliography

- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357:593-615.
- Arancio O, Kiebler M, Lee CJ, Lev-Ram V, Tsien RY, Kandel ER, Hawkins RD (1996) Nitric oxide acts directly in the presynaptic neuron to produce long-term potentiation in cultured hippocampal neurons. *Cell* 87:1025-1035.
- Bohme GA, Bon C, Stutzmann JM, Doble A, Blanchard JC (1991) Possible involvement of nitric oxide in long-term potentiation. *Eur J Pharmacol* 199:379-381.
- Bon C, Bohme GA, Doble A, Stutzmann JM, Blanchard JC (1992) A Role for Nitric Oxide in Long-term Potentiation. *Eur J Neurosci* 4:420-424.
- Bon CL, Garthwaite J (2003) On the role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci* 23:1941-1948.
- Brenman JE, Brecht DS (1997) Synaptic signaling by nitric oxide. *Curr Opin Neurobiol* 7:374-378.
- Chetkovich DM, Klann E, Sweatt JD (1993) Nitric oxide synthase-independent long-term potentiation in area CA1 of hippocampus. *Neuroreport* 4:919-922.
- Chung YH, Joo KM, Lee YJ, Shin DH, Cha CI (2004) Postnatal development and age-related changes in the distribution of nitric oxide synthase-immunoreactive neurons in the visual system of rats. *Neurosci Lett* 360:1-4.
- Contestabile A (2000) Roles of NMDA receptor activity and nitric oxide production in brain development. *Brain Res Brain Res Rev* 32:476-509.
- Cudeiro J, Rivadulla C, Rodriguez R, Grieve KL, Martinez-Conde S, Acuna C (1997) Actions of compounds manipulating the nitric oxide system in the cat primary visual cortex. *J Physiol* 504 (Pt 2):467-478.
- Eliasson MJ, Blackshaw S, Schell MJ, Snyder SH (1997) Neuronal nitric oxide synthase alternatively spliced forms: prominent functional localizations in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3396-3401.
- Erdal EP, Litzinger EA, Seo J, Zhu Y, Ji H, Silverman RB (2005) Selective neuronal nitric oxide synthase inhibitors. *Curr Top Med Chem* 5:603-624.
- Esplugues JV (2002) NO as a signalling molecule in the nervous system. *Br J Pharmacol* 135:1079-1095.
- Garthwaite J, Boulton CL (1995) Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol* 57:683-706.
- Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R (1988) Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature* 336:385-388.
- Haghikia A, Mergia E, Friebe A, Eysel UT, Koesling D, Mittmann T (2007) Long-term potentiation in the visual cortex requires both nitric oxide receptor guanylyl cyclases. *J Neurosci* 27:818-823.
- Hawkins RD, Son H, Arancio O (1998) Nitric oxide as a retrograde messenger during long-term potentiation in hippocampus. *Prog Brain Res* 118:155-172.

- Hopper RA, Garthwaite J (2006) Tonic and phasic nitric oxide signals in hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci* 26:11513-11521.
- Le Roux N, Amar M, Baux G, Fossier P (2006) Homeostatic control of the excitation-inhibition balance in cortical layer 5 pyramidal neurons. *Eur J Neurosci* 24:3507-3518.
- Malen PL, Chapman PF (1997) Nitric oxide facilitates long-term potentiation, but not long-term depression. *J Neurosci* 17:2645-2651.
- Monfort P, Munoz MD, Kosenko E, Felipe V (2002) Long-term potentiation in hippocampus involves sequential activation of soluble guanylate cyclase, cGMP-dependent protein kinase, and cGMP-degrading phosphodiesterase. *J Neurosci* 22:10116-10122.
- Murphy KP, Bliss TV (1999) Photolytically released nitric oxide produces a delayed but persistent suppression of LTP in area CA1 of the rat hippocampal slice. *J Physiol* 515 (Pt 2):453-462.
- O'Dell TJ, Hawkins RD, Kandel ER, Arancio O (1991) Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:11285-11289.
- O'Dell TJ, Huang PL, Dawson TM, Dinerman JL, Snyder SH, Kandel ER, Fishman MC (1994) Endothelial NOS and the blockade of LTP by NOS inhibitors in mice lacking neuronal NOS. *Science* 265:542-546.
- Schuman EM, Madison DV (1991) A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. *Science* 254:1503-1506.
- Snyder SH, Jaffrey SR, Zakhary R (1998) Nitric oxide and carbon monoxide: parallel roles as neural messengers. *Brain Res Brain Res Rev* 26:167-175.
- Son H, Hawkins RD, Martin K, Kiebler M, Huang PL, Fishman MC, Kandel ER (1996) Long-term potentiation is reduced in mice that are doubly mutant in endothelial and neuronal nitric oxide synthase. *Cell* 87:1015-1023.
- Wilson RI, Godecke A, Brown RE, Schrader J, Haas HL (1999) Mice deficient in endothelial nitric oxide synthase exhibit a selective deficit in hippocampal long-term potentiation. *Neuroscience* 90:1157-1165.
- Yousef T, Neubacher U, Eysel UT, Volgushev M (2004) Nitric oxide synthase in rat visual cortex: an immunohistochemical study. *Brain Res Brain Res Protoc* 13:57-67.

C) Conclusions

1. Le NO et la régulation de la balance E/I

Nous avons observé que le blocage non-spécifique des différentes isoformes de la NOS est capable d'augmenter significativement la balance E/I. En présence d'un antagoniste spécifique de la NOS neuronale, aucun changement de la balance E/I n'est induit. Ces résultats sont en faveur de l'existence d'un « signal NO » tonique persistant qui résulterait de la NOS endothéliale selon l'hypothèse de [Hopper & Garthwaite \(2006\)](#) et qui serait primordial dans la régulation du niveau d'excitabilité des réseaux neuronaux.

2. Le NO et la potentiation homéostatique des signaux excitateurs et inhibiteurs

Il est à noter, que l'application de L-arginine, le substrat de la NOS, provoque une potentiation des conductances excitatrice et inhibitrice dans les mêmes proportions que celle observée suite à l'application d'un protocole de stimulation à haute fréquence. D'autre part, l'application de ce protocole après perfusion du substrat ou en présence d'un bloqueur des NOS ne permet plus l'expression de la potentiation homéostatique. Ces résultats montrent que le NO est nécessaire à l'expression d'une potentiation des conductances excitatrices et des conductances inhibitrices au niveau des neurones pyramidaux de couche 5.

Ces résultats sont également en faveur d'un « signal NO » phasique à l'origine de l'expression des phénomènes de potentiation des signaux excitateurs et inhibiteurs des réseaux neuronaux corticaux.

D'autre part, en présence d'un bloqueur spécifique de la NOS neuronale, l'induction de la potentiation par stimulation à haute fréquence en couche 2/3 devient impossible sans toutefois entraîner de modification de la balance E/I, suggérant que le signal NO à l'origine de la potentiation dépend de la NOS neuronale.

En définitive, il apparaît au niveau du cortex visuel que le NO possède différents rôles selon l'isoforme de NOS à l'origine de sa synthèse. Nos résultats sont en faveur de l'existence d'un signal NO tonique dépendant de la NOS endothéliale qui est impliqué dans la régulation du niveau d'excitabilité des neurones pyramidaux de couche 5. Alors que l'activation de la NOS neuronale et le signal NO phasique qui en résulte semble primordial à l'expression de la potentiation homéostatique.

Discussion

-

Perspectives

Les neurones pyramidaux de couche 5 élaborent le signal de sortie du cortex visuel. L'intensité de ce signal dépend du niveau d'excitabilité de ces neurones qui est défini par la balance des signaux excitateurs et inhibiteurs qu'ils reçoivent. Par conséquent, la régulation de la balance Excitation/Inhibition (E/I) est un élément clé du contrôle de l'activité corticale. Sa dérégulation est à l'origine de nombreuses manifestations pathologiques comme l'épilepsie, la schizophrénie ou encore les maladies neurodégénératives (Cline, 2005). Mon travail de thèse a consisté à mieux caractériser le contrôle de ce paramètre.

I. La régulation de la balance E/I

Un système homéostatique peut-être défini comme capable d'émettre un signal de sortie constant ou tout au moins compris dans une certaine gamme de valeurs. Cette définition implique différentes caractéristiques communes à tous les systèmes homéostatiques. Un système homéostatique possède un niveau contrôle ou « set point » qui définit précisément la valeur du signal de sortie. Ce signal n'est cependant pas figé, et varie dans une gamme de valeurs restreintes autour du niveau contrôle. Un signal compris dans cette gamme de valeurs sera dit « fonctionnel ». Un système homéostatique doit également être capable de détecter des variations trop importantes de son activité par rapport au point de contrôle et d'activer en réponse à ces perturbations des mécanismes compensateurs capables de rectifier cette « erreur ».

Nous avons estimé la balance E/I des neurones pyramidaux de couche 5 du cortex visuel de rat à la suite de la stimulation de réseaux neuronaux en couche 2/3, 4 ou 6. En conservant les interactions fonctionnelles entre excitation et inhibition, la balance E/I est constituée de 20 % d'excitation et de 80 % d'inhibition, quels que soit les réseaux neuronaux recrutés. Par conséquent, la balance E/I des neurones pyramidaux de couche 5 apparaît posséder un niveau contrôle qui définit l'état « normal » d'activité de ces neurones correspondant au « set point » du contrôle homéostatique de l'activité neuronale.

L'ensemble de mes résultats m'a également permis de définir une gamme de valeurs pour laquelle le niveau d'activité du neurone pyramidal reste fonctionnel. Pour définir cette gamme, je suis parti du principe que des changements significatifs de la balance E/I à la suite de l'application d'une substance pharmacologique particulière correspondaient à une dérégulation du contrôle de la balance. Ainsi, en me basant sur les mesures minimales et

maximales qui n'induisaient pas de changement significatif de la balance E/I, j'ai déterminé une gamme de valeurs comprise entre 15 et 25 % d'Excitation et 85 et 75 % d'Inhibition dans laquelle les neurones pyramidaux corticaux conservent un niveau d'excitabilité « fonctionnel ».

A) Le contrôle inhibiteur de la balance E/I

L'estimation d'une balance E/I à 20 % d'excitation et 80 % d'inhibition souligne l'importance de la composante inhibitrice dans la régulation de l'activité. En effet, cette estimation est à l'opposé du rapport entre les pourcentages de neurones excitateurs (80 %) et inhibiteurs (20 %) composant le cortex. Dans ces conditions, où seulement 20 % de la population neuronale corticale contrôle à 80 % le niveau d'excitabilité des neurones pyramidaux, il apparaît évident qu'une fonction primordiale du système inhibiteur est la régulation de l'activité corticale.

Cette hypothèse a été vérifiée par le blocage des récepteurs GABA_A, GABA_B ou glycinergiques, qui dans tous les cas entraîne une dérégulation de la balance E/I. Néanmoins, il est intéressant de noter que le blocage des récepteurs GABA_A provoque une diminution de l'inhibition et une augmentation de l'excitation ce qui suggère que les récepteurs GABA_A sont impliqués à la fois dans le contrôle de l'efficacité des connexions corticales excitatrices et dans celui des connexions corticales inhibitrices. Le blocage des récepteurs GABA_B entraîne une augmentation de l'inhibition sans changement notable du niveau d'excitation. Le blocage des récepteurs glycinergiques entraîne une augmentation de l'excitation sans changement notable de l'inhibition.

Par conséquent on peut imaginer que les systèmes inhibiteurs GABA_B et glycinergiques ont des rôles régulateurs spécialisés vis-à-vis d'une population neuronale particulière. Cette hypothèse sera vérifiée par marquage immunocytochimique entre les récepteurs GABA_B ou glycinergiques et des marqueurs spécifiques des neurones GABAergiques ou glutamatergiques.

B) L'inhibition shuntante

La régulation de l'activité des neurones pyramidaux de couche 5 du cortex peut être réalisée au niveau dendritique par l'inhibition shuntante. Afin de rendre compte des processus d'intégration dendritique, nous avons déterminé le facteur M qui nous donne une estimation de l'inhibition shuntante (Koch et al., 1990). Nous avons observé un facteur M similaire pour une stimulation en couche 2/3 ou 4 et un facteur M plus important pour la stimulation en

couche 6 (c'est-à-dire, une inhibition shuntante moins grande). Il est possible d'imaginer que les signaux générés par des stimulations en couche 2/3 ou 4 transitent principalement par la dendrite apicale du neurone pyramidal contrairement aux signaux générés par la stimulation en couche 6. Dans ces conditions, nos résultats concordent avec l'hypothèse selon laquelle l'inhibition shuntante serait majoritairement retrouvée au niveau de la partie proximale de la dendrite apicale, c'est-à-dire au niveau des couches 4 et 5.

L'inhibition shuntante est principalement reliée aux récepteurs GABA_A. Le blocage de ces récepteurs entraîne une nette réduction de l'inhibition shuntante. Par contre, le blocage des récepteurs GABA_B provoque une augmentation de l'inhibition shuntante. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que le blocage des récepteurs GABA_B induit une augmentation de l'inhibition GABAergique reçue par le neurone pyramidal ce qui par conséquent pourrait augmenter l'inhibition shuntante. Afin de préciser l'origine de l'inhibition shuntante GABAergique nous avons utilisé la gabazine (le bloqueur des récepteurs GABA_A) ou le THIP (l'agoniste des récepteurs GABA_A) à faibles concentrations (respectivement 30 et 200 nM). Ces concentrations sont supposées bloquer ou activer spécifiquement les récepteurs GABA_A extrasynaptiques (Cope et al., 2005 ; Drasbek et Jensen, 2006). En présence de l'une ou l'autre de ces substances, aucune modification significative de l'inhibition shuntante n'a été observée, la balance E/I est restée stable. Ces résultats indiquent que, la gabazine (30 nM) est incapable de bloquer les récepteurs GABA_A extrasynaptiques ou bien que l'inhibition shuntante GABAergique est majoritairement d'origine synaptique.

Nous avons aussi mis en évidence une inhibition shuntante d'origine glycinergique sur les neurones pyramidaux de couche 5. Le blocage des récepteurs GABA_A entraîne une réduction de 57 % de l'inhibition shuntante par rapport à la condition contrôle, alors que le blocage des récepteurs glycinergiques induit une réduction de 16 % de l'inhibition shuntante. L'inhibition shuntante d'origine GABAergique apparaît donc plus importante que celle d'origine glycinergique. Il reste à tester le blocage total de l'inhibition shuntante en présence des antagonistes de ces deux types de récepteurs.

Les modifications de l'inhibition shuntante ont toujours été corrélées à des changements de la balance E/I. Il semble que l'inhibition shuntante soit un mécanisme qui participe à la régulation du niveau d'excitabilité des neurones pyramidaux de couche 5 du cortex. Afin de vérifier le rôle de l'inhibition shuntante et, de manière plus large, de l'intégration dendritique, l'enregistrement des signaux à différents niveaux de la dendrite apicale doit être envisagé.

Néanmoins, l'inhibition shuntante ne peut à elle seule expliquer la régulation réciproque du niveau d'excitation et d'inhibition perçus par un neurone pyramidal. Il semble donc que l'organisation corticale, en circuits neuronaux excitateurs et inhibiteurs soit aussi un facteur important à considérer dans la régulation de la balance E/I. Pour caractériser l'importance de ces interactions, des changements de l'efficacité des entrées synaptiques excitatrices et inhibitrices des neurones pyramidaux ont été réalisés.

II. La plasticité homéostatique

En appliquant des protocoles de stimulation à haute ou basse fréquence dans les différentes couches corticales, nous avons induit des phénomènes de potentiation ou de dépression homéostatique des afférences excitatrices et inhibitrices perçues par un neurone pyramidal.

A) La potentiation homéostatique

Des stimulations à haute fréquence sont capables d'induire à la fois une LTPE et une LTPi dans des proportions quasi-identiques, quelle que soit la couche stimulée. Par conséquent la balance E/I n'est pas modifiée et le niveau d'excitabilité du neurone pyramidal reste inchangé.

1. Les récepteurs NMDA et la potentiation homéostatique

Le blocage des récepteurs NMDA rend à la fois impossible l'induction de la LTPE et de la LTPi. Nous avons montré que les deux types de récepteurs NMDA, ceux contenant la sous-unité NR2B (NMDA\NR2B) ou ceux contenant la sous-unité NR2A (NMDA\NR2A) sont capables d'induire les phénomènes de LTPE et de LTPi selon le stade de développement. Il est important de noter que dans toutes les conditions, que la LTPE et la LTPi soient ou non induites, la balance E/I n'est pas modifiée.

Ces résultats montrent que les récepteurs NMDA sont à l'origine de l'induction des phénomènes de LTPE et de LTPi et donc de la potentiation homéostatique.

2. La synthèse de NO et la potentiation homéostatique

Comme pour le blocage des récepteurs NMDA, le blocage de l'enzyme de synthèse du NO (la NOS) empêche l'induction de la LTPE et de la LTPi. De plus, la perfusion du substrat de la

NOS est capable d'induire une LTPe et une LTPi dans les mêmes proportions que celles induites par l'application d'un protocole de stimulation à haute fréquence. Par conséquent, ces résultats suggèrent que la synthèse de NO est requise pour l'induction d'une potentiation homéostatique.

Nos résultats montrent également qu'un signal NO phasique provenant de l'activation d'une forme spécifique de NOS, la NOS neuronale est nécessaire à l'induction de la potentiation homéostatique. Néanmoins, à côté de ce signal phasique, un deuxième signal nitreurgique, tonique, résultant de l'activation de la NOS endothéliale a été suggéré comme nécessaire à l'induction des phénomènes de plasticité (Bon & Garthwaite, 2003). En l'absence d'inhibiteur spécifique de la NOS endothéliale, cette hypothèse n'est pas clairement vérifiable.

Ces résultats montrent qu'il n'y a pas de différence entre les mécanismes d'induction de la potentiation excitatrice et ceux de la potentiation inhibitrice. Ces deux phénomènes sont induits ou non, en parallèle. Ils dépendent du même sous-type de récepteur NMDA et du même type de NOS. Par conséquent, il semble que la potentiation de l'excitation et celle de l'inhibition soient soumises aux mêmes contraintes et dépendent des mêmes mécanismes, ce qui permet aux neurones pyramidaux, même lorsque la potentiation homéostatique n'est plus possible (par exemple lors du blocage des récepteurs NMDA), de conserver une balance E/I stable.

B) La dépression homéostatique

L'induction d'une diminution à long terme de l'efficacité de la transmission synaptique est moins bien caractérisée que celle de la potentiation à long terme. Elle a plus particulièrement été observée au niveau de zones cérébrales spécifique comme le cervelet (Daniel et al., 1998), la région CA1 de l'hippocampe (Dudek & Bear, 1992) ou le cortex (Kirkwood et al., 1993 ; Daw et al., 2004), mais les mécanismes à l'origine de son induction restent débattus.

1. L'induction de la dépression homéostatique

L'application d'un protocole de stimulation à basse fréquence en couche 4 induit une dépression de l'excitation et de l'inhibition, alors que l'application de ce protocole en couche 2/3 ou 6 entraîne une LTDe sans LTDi.

Pour une stimulation en couche 4, la dépression en parallèle de l'excitation et de l'inhibition n'entraîne pas de modifications de la balance E/I, alors que pour une stimulation en couche 2/3 ou 6, la diminution de l'excitation provoque une diminution de la balance E/I.

Comment expliquer l'absence de LTDi pour les stimulations en couche 2/3 ou 6 ?

Il est possible que le protocole de stimulation utilisé (900 pulses à 1 Hz) ne soit pas le mieux adapté pour induire la LTD. J'ai testé deux autres protocoles de stimulation à basse fréquence en couche 2/3 : un protocole de stimulation composé de 600 pulses à 1 Hz et un protocole composé de 600 trains de stimulation à 1 Hz, un train de stimulation comprenant 8 pulses à 250 Hz. Quel que soit le protocole, aucune modification significative de la conductance inhibitrice n'a été enregistrée au niveau du soma des neurones pyramidaux.

Il apparaît aussi logique que, dans une certaine mesure, des changements d'excitabilité des réseaux neuronaux puissent avoir lieu dans une certaine gamme de valeurs. Si la régulation homéostatique intervient pour empêcher des modifications trop importantes de l'excitabilité neuronale qui conduiraient à des états d'hypo- ou d'hyper-excitabilité (des variations dites « destructives ») ; il est également nécessaire que le niveau d'excitabilité des neurones puisse changer, dans une gamme de valeurs (dite « constructive »), pour permettre au cortex d'intégrer de nouvelles informations et d'adapter les réponses neuronales aux stimuli reçus. Il est ainsi possible d'imaginer que l'application de protocoles de stimulation à haute fréquence soit de type « destructif » ce qui active le contrôle homéostatique alors que l'application de protocoles à basse fréquence en couche 2/3 ou 6 soit de type « constructif ». Dans ce dernier cas un changement du « set point » de la balance E/I est observée vers des valeurs de 17/83 % ou 15/85 % comprises dans la gamme préalablement décrite.

On pourrait ainsi penser que le protocole de LTD ne provoque pas de changement « destructif ». Cependant, l'application d'un protocole de stimulation à basse fréquence en couche 4 entraîne l'activation du contrôle homéostatique. Ce résultat peut s'expliquer par l'organisation du cortex, les neurones de couche 4 pouvant directement innervent les neurones pyramidaux de couche 5 au niveau de la partie proximale de la dendrite apicale. Il a notamment été montré que les interneurons à bas seuil de décharge (LTS : Low-Threshold Spiking) projettent préférentiellement sur les dendrites des neurones pyramidaux (Xiang et al., 2002) où ils seraient capables de modifier le niveau de l'inhibition shuntante ou encore l'activation des canaux Ca^{2+} et Na^{+} sensibles au potentiel présents à ce niveau (Huguenard et al., 1989 ; Stuart & Sakmann, 1994 ; Markram et al., 1995). Il est ainsi possible d'imaginer,

que le recrutement de ces neurones puisse entraîner des changements « destructifs » de la balance E/I qui provoqueraient l'activation d'un rétrocontrôle homéostatique.

2. Les récepteurs NMDA et la dépression homéostatique

L'application d'un protocole à basse fréquence, capable d'induire la dépression homéostatique en couche 4, n'a pas encore été testée en présence de bloqueurs des différents types de récepteurs NMDA.

Néanmoins, d'après nos résultats, il semble qu'il n'existe pas de rôle différentiel entre l'expression d'un type de récepteur NMDA particulier (NMDA\NR2A ou NMDA\NR2B) avec une forme de plasticité particulière (LTP ou LTD). Il apparaît alors envisageable que ces récepteurs NMDA\NR2A et NMDA\NR2B soient impliqués dans l'induction des phénomènes de LTP et de LTD selon le stade de développement du cortex. Une régulation différentielle des phénomènes de LTP et de LTD par les récepteurs NMDA\NR2A ou NMDA\NR2B n'est pas à exclure. En effet, la LTD chez l'adulte serait dépendante des récepteurs NMDA extrasynaptiques (Massey et al., 2004) composés de la sous-unité NR2B (Rumbaugh & Vicini, 1999 ; Tovar & Westbrook, 1999 ; Thomas et al., 2006) et ceux contenant la sous-unité NR2A seraient à l'origine de la LTP. Il serait par conséquent intéressant de vérifier si les mécanismes de LTP et LTD ne sont pas soutenus par différents sous-types de récepteurs NMDA au cours du développement, c'est-à-dire de vérifier si les récepteurs NMDA\NR2B qui sont à l'origine de l'induction de la LTP au cours du pic de la période critique ne sont pas à l'origine de l'induction de la LTD en fin de période critique et, inversement, si les récepteurs NMDA\NR2A capables d'induire la LTP en fin de période critique ne sont pas à l'origine de l'induction de la LTD au cours du pic de la période critique.

Mes premiers résultats montrent que l'induction de la LTDi n'est possible que suite à une stimulation à faible fréquence en couche 4. Cette observation conduit à essayer de déterminer si pour chaque couche corticale les mêmes sous-types de récepteur NMDA supportent la même forme de plasticité ou bien s'il est possible d'associer l'expression majoritaire d'un type de récepteur (NMDA\NR2A ou NMDA\NR2B) ou d'une localisation particulière (extrasynaptique ou synaptique) de ces récepteurs avec l'induction de la LTDi par un protocole de stimulation à basse fréquence en couche 4.

C) Le contrôle de la plasticité homéostatique

De nombreuses évidences que ce soit au cours du développement précoce ou plus tardif suggèrent que le système inhibiteur est un mécanisme important de contrôle de l'activité neuronale (McBain & Fisahn, 2001 ; Mody, 2005). Je me suis par conséquent intéressé à l'implication des différents types de récepteurs inhibiteurs ($GABA_A$, $GABA_B$ et glycinergique) dans l'induction et le contrôle de la plasticité homéostatique.

1. Le contrôle inhibiteur de la plasticité homéostatique

a) Les récepteurs $GABA_A$ et la potentiation homéostatique

Que ce soit lors d'une sur-activation ou d'un blocage des récepteurs $GABA_A$, l'application d'un protocole à haute fréquence de stimulation en couche 2/3 est incapable d'induire une LTPe ou une LTPi au niveau d'un neurone pyramidal de couche 5. Au contraire dans tous les cas, une LTDi est observée. L'application d'un protocole de HFS en présence d'agoniste, conduit également à une LTDe alors qu'en présence d'antagoniste, aucune modification de la composante excitatrice n'est observée. Ces résultats indiquent que la dérégulation du système inhibiteur est non seulement capable d'empêcher l'induction des phénomènes de plasticité mais aboutit à des changements d'orientation de la plasticité vers des formes de LTD plutôt que de LTP.

En présence d'un bloqueur pharmacologique (partiel) des perméabilités Cl^- dans le neurone pyramidal, l'application d'un protocole de potentiation en couche 2/3 n'est plus capable d'induire une LTPi ou une LTPe. Or dans ces conditions, seule la composante inhibitrice devrait être modifiée, l'absence de LTPe signifie que le neurone pyramidal est capable d'activer des mécanismes régulateurs. L'origine de ces mécanismes est encore imprécise bien que nos résultats précédents indiquent clairement que des interactions entre les systèmes inhibiteur et excitateur soient nécessaires à la régulation de l'activité neuronale. En faveur de cette hypothèse, on sait qu'il existe des rétroprojections des neurones pyramidaux de couche 5 sur des interneurons en couche 2/3 (Dantzker & Callaway, 2000 ; Thomson & Bannister, 2003) qui pourraient ainsi former une boucle de régulation entre neurones excitateurs et inhibiteurs.

b) Les récepteurs GABA_B, glycinergiques et la potentiation homéostatique.

L'application d'un protocole de stimulation à haute fréquence en présence du bloqueur des récepteurs GABA_B induit une LTPi mais pas de LTPe, ce qui entraîne une rupture de la balance E/I.

Le blocage des récepteurs glycinergiques permet toujours l'induction d'une LTPe mais entraîne une forme de plasticité inhibitrice « aberrante », dans le sens où le protocole de LTP induit une LTDi. Dans ce cas de figure où l'excitation est augmentée et l'inhibition diminuée, des interactions récurrentes entre les circuits neuronaux excitateurs et inhibiteurs doivent être supprimées. Si les expériences de marquage immunocytochimique confirment la présence des récepteurs glycinergiques sur une seule population neuronale, il est possible d'imaginer que ces récepteurs aient un rôle d'interrupteur dans le sens où leur activation, ou non-activation, induirait une différenciation entre la régulation des signaux excitateurs et celle des signaux inhibiteurs à la base de la rupture du contrôle récurrent de la balance E/I.

Le blocage des systèmes inhibiteurs GABAergiques ou glycinergique induit dans tous les cas une rupture de la balance E/I démontrant l'importance de ces systèmes dans la régulation de l'activité neuronale. Il est également important de noter que le blocage des récepteurs GABA_A ou glycinergiques corticaux peut engendrer une inversion de l'orientation de la plasticité d'une forme de LTP vers une forme de LTD, qui dans le cas des récepteurs GABA_A se produit pour les deux composantes alors que dans le cas des récepteurs glycinergiques ne se produit que pour la composante inhibitrice. Ces résultats nous amènent à penser que le contrôle inhibiteur GABA_A aurait une action globale sur l'excitation et sur l'inhibition alors que le contrôle inhibiteur glycinergique aurait un rôle plus spécifique sur une seule composante.

2. Le contrôle glial de la plasticité homéostatique

La participation des récepteurs glycinergiques au contrôle de la balance E/I et de la potentiation homéostatique a focalisé notre attention sur les gliotransmetteurs et en particulier sur la taurine. Nos résultats montrent que la taurine est capable d'activer les récepteurs glycinergiques corticaux. D'autre part, les données de la littérature suggèrent que la taurine est le principal agoniste des récepteurs glycinergiques (Hussy et al., 1997 ; Flint et al., 1998).

Cependant afin de vérifier cette hypothèse, un marquage de la taurine doit être fait sur tranches de cortex visuel.

Nous avons également montré que le blocage de la synthèse de D-sérine (un autre gliotransmetteur) est capable également d'inverser la plasticité de l'excitation et de l'inhibition d'une forme de LTP vers une forme de LTD.

Ces résultats viennent donc compléter les données récentes sur l'importance des gliotransmetteurs (Araque et al., 1998 ; Newman, 2003) dans la régulation des fonctions corticales. Ainsi, la glie est plus qu'un simple tissu de soutien des neurones, et les astrocytes sont des éléments actifs participant à la régulation des fonctions cérébrales. Il est d'ailleurs significatif que le terme de synapse tripartite, comprenant un élément présynaptique, postsynaptique et une cellule gliale, soit de plus en plus utilisé dans la littérature (Halassa et al., 2007).

III. Conclusions - Perspectives

L'ensemble de mon travail me permet de distinguer la plasticité homéostatique qui nécessite au niveau cellulaire l'activation de récepteurs NMDA et la synthèse de NO, du contrôle homéostatique de la balance E/I, qui est toujours efficace même lorsque la potentiation homéostatique n'est plus inductible. Le contrôle homéostatique de la balance E/I dépend principalement des interactions entre systèmes inhibiteurs et excitateurs qui apparaissent modulables par l'activation de récepteurs glycinergiques et par certains facteurs gliaux tels que la D-sérine. Une dérégulation de ces interactions peut conduire à des phénomènes de plasticité « aberrants », dans le sens où un protocole à haute fréquence ne va plus induire de LTP mais une forme de LTD de l'excitation et de l'inhibition (blocage des récepteurs GABA_A ou de la synthèse de D-sérine) ou encore à une plasticité « différentielle » entre excitation et inhibition observée lors du blocage des récepteurs glycinergiques.

Dans la mesure où les systèmes inhibiteurs sont des systèmes de régulation de l'activité corticale, se pose alors la question de l'induction de la plasticité inhibitrice. Il a été observé au niveau du néocortex, où les connexions entre cellules pyramidales et interneurons sont fréquentes (Buhl et al., 1997 ; Reyes et al., 1998 ; Zilberter et al., 1999, 2000), que la potentiation (ou la dépression) des entrées excitatrices sur un neurone pyramidal peut entraîner une augmentation (ou une diminution) des PPSIs de la cellule pyramidale (Holmgren & Zilberter, 2001). D'autre part, si la plasticité des synapses excitatrices a bien été

caractérisée, les mécanismes d'induction de la plasticité des synapses inhibitrices sont moins évidents. Il apparaît cependant que la plasticité des synapses inhibitrices sur un neurone pyramidal nécessite une dépolarisation de ce neurone, dépolarisation induite par l'activation de synapses excitatrices (Holmgren & Zilberter, 2001). Par conséquent, la plasticité synaptique inhibitrice serait une forme de plasticité compensatrice des changements de l'efficacité des synapses excitatrices. Mes résultats montrent que si les formes de LTPe et de LTDe sont facilement inductibles, la LTDi est par contre plus difficile à réaliser ce qui va dans le sens d'une plasticité inhibitrice à rôle compensateur.

En définitive, la régulation de l'activité neuronale dans le cortex est soumise à un contrôle inhibiteur mais ce contrôle reste à préciser du fait de la grande hétérogénéité des interneurones. Il semble donc primordial pour mieux appréhender la régulation de l'activité neuronale de caractériser les rôles des différents types d'interneurones. C'est ce projet que je souhaite développer à plus long terme. Pour le mener à bien, j'envisage dans un premier temps de réaliser un stage post-doctoral dans le laboratoire du Dr Gina Turrigiano, qui m'a proposé d'étudier la régulation de l'efficacité des connexions entre un interneurone particulier (les cellules en panier de couche 4 du cortex visuel qui présentent un profil de décharge rapide) et un neurone pyramidal.

Bibliographie

A

- Abbott LF, Nelson SB (2000) Synaptic plasticity: taming the beast. *Nat Neurosci* 3 Suppl:1178-1183.
- Abidin I, Kohler T, Weiler E, Zoidl G, Eysel UT, Lessmann V, Mittmann T (2006) Reduced presynaptic efficiency of excitatory synaptic transmission impairs LTP in the visual cortex of BDNF-heterozygous mice. *Eur J Neurosci* 24:3519-3531.
- Abraham WC, Bear MF (1996) Metaplasticity: the plasticity of synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 19:126-130.
- Abraham WC, Huggett A (1997) Induction and reversal of long-term potentiation by repeated high-frequency stimulation in rat hippocampal slices. *Hippocampus* 7:137-145.
- Abraham WC, Williams JM (2003) Properties and mechanisms of LTP maintenance. *Neuroscientist* 9:463-474.
- Aizenman CD, Manis PB, Linden DJ (1998) Polarity of long-term synaptic gain change is related to postsynaptic spike firing at a cerebellar inhibitory synapse. *Neuron* 21:827-835.
- Alkon DL, Nelson TJ (1990) Specificity of molecular changes in neurons involved in memory storage. *Faseb J* 4:1567-1576.
- Andersen P, Dingledine R, Gjerstad L, Langmoen IA, Laursen AM (1980) Two different responses of hippocampal pyramidal cells to application of gamma-amino butyric acid. *J Physiol* 305:279-296.
- Anderson JC, Douglas RJ, Martin KA, Nelson JC (1994) Map of the synapses formed with the dendrites of spiny stellate neurons of cat visual cortex. *J Comp Neurol* 341:25-38.
- Anderson JS, Carandini M, Ferster D (2000) Orientation tuning of input conductance, excitation, and inhibition in cat primary visual cortex. *J Neurophysiol* 84:909-926.
- Aprison MH (1990) The discovery of the neurotransmitter role of glycine. In: *Glycine Neurotransmission*, edited by Ottersen POaS-M, J. New York: Wiley, 1-23.
- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG (1998) Glutamate-dependent astrocyte modulation of synaptic transmission between cultured hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 10:2129-2142.
- Ascher P, Nowak L (1988) The role of divalent cations in the N-methyl-D-aspartate responses of mouse central neurones in culture. *J Physiol* 399:247-266.
- Atwood HL, Karunanithi S (2002) Diversification of synaptic strength: presynaptic elements. *Nat Rev Neurosci* 3:497-516.

B

- Babb TL, Mikuni N, Najm I, Wylie C, Olive M, Dollar C, MacLennan H (2005) Pre- and postnatal expressions of NMDA receptors 1 and 2B subunit proteins in the normal rat cortex. *Epilepsy Res* 64:23-30.
- Banke TG, Bowie D, Lee H, Huganir RL, Schousboe A, Traynelis SF (2000) Control of GluR1 AMPA receptor function by cAMP-dependent protein kinase. *J Neurosci* 20:89-102.
- Bannister AP (2005) Inter- and intra-laminar connections of pyramidal cells in the neocortex. *Neurosci Res* 53:95-103.
- Barria A, Muller D, Derkach V, Griffith LC, Soderling TR (1997) Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaM-KII during long-term potentiation. *Science* 276:2042-2045.
- Baude A, Nusser Z, Molnar E, McIlhinney RA, Somogyi P (1995) High-resolution immunogold localization of AMPA type glutamate receptor subunits at synaptic and non-synaptic sites in rat hippocampus. *Neuroscience* 69:1031-1055.
- Bausch SB, He S, Petrova Y, Wang XM, McNamara JO (2006) Plasticity of both excitatory and inhibitory synapses is associated with seizures induced by removal of chronic blockade of activity in cultured hippocampus. *J Neurophysiol* 96:2151-2167.
- Bear MF, Malenka RC (1994) Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Curr Opin Neurobiol* 4:389-399.
- Bear MF (1995) Mechanism for a sliding synaptic modification threshold. *Neuron* 15:1-4.
- Beattie EC, Carroll RC, Yu X, Morishita W, Yasuda H, von Zastrow M, Malenka RC (2000) Regulation of AMPA receptor endocytosis by a signaling mechanism shared with LTD. *Nat Neurosci* 3:1291-1300.
- Becker S (2005) A computational principle for hippocampal learning and neurogenesis. *Hippocampus* 15:722-738.
- Bekenstein JW, Lothman EW (1993) Dormancy of inhibitory interneurons in a model of temporal lobe epilepsy. *Science* 259:97-100.
- Bekkers JM (2000) Properties of voltage-gated potassium currents in nucleated patches from large layer 5 cortical pyramidal neurons of the rat. *J Physiol* 525 Pt 3:593-609.
- Ben-Ari Y (2002) Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci* 3:728-739.
- Benevento LA, Bakkum BW, Port JD, Cohen RS (1992) The effects of dark-rearing on the electrophysiology of the rat visual cortex. *Brain Res* 572:198-207.
- Benke TA, Luthi A, Isaac JT, Collingridge GL (1998) Modulation of AMPA receptor unitary conductance by synaptic activity. *Nature* 393:793-797.

- Bennett MV, Zukin RS (2004) Electrical coupling and neuronal synchronization in the Mammalian brain. *Neuron* 41:495-511.
- Berardi N, Pizzorusso T, Ratto GM, Maffei L (2003) Molecular basis of plasticity in the visual cortex. *Trends Neurosci* 26:369-378.
- Berberich S, Punnakkal P, Jensen V, Pawlak V, Seeburg PH, Hvalby O, Kohr G (2005) Lack of NMDA receptor subtype selectivity for hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci* 25:6907-6910.
- Bergeron R, Meyer TM, Coyle JT, Greene RW (1998) Modulation of N-methyl-D-aspartate receptor function by glycine transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:15730-15734.
- Bi GQ, Poo MM (1998) Synaptic modifications in cultured hippocampal neurons: dependence on spike timing, synaptic strength, and postsynaptic cell type. *J Neurosci* 18:10464-10472.
- Bliss TV, Gardner-Medwin AR (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232:357-374.
- Bliss TV, Lomo T (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232:331-356.
- Bliss TV, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361:31-39.
- Blitzer RD, Connor JH, Brown GP, Wong T, Shenolikar S, Iyengar R, Landau EM (1998) Gating of CaMKII by cAMP-regulated protein phosphatase activity during LTP. *Science* 280:1940-1942.
- Blue ME, Parnavelas JG (1983) The formation and maturation of synapses in the visual cortex of the rat. II. Quantitative analysis. *J Neurocytol* 12:697-712.
- Bohme GA, Bon C, Stutzmann JM, Doble A, Blanchard JC (1991) Possible involvement of nitric oxide in long-term potentiation. *Eur J Pharmacol* 199:379-381.
- Bon CL, Garthwaite J (2003) On the role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci* 23:1941-1948.
- Borg-Graham LJ, Monier C, Fregnac Y (1998) Visual input evokes transient and strong shunting inhibition in visual cortical neurons. *Nature* 393:369-373.
- Bowery NG, Hill DR, Hudson AL, Doble A, Middlemiss DN, Shaw J, Turnbull M (1980) (-)-Baclofen decreases neurotransmitter release in the mammalian CNS by an action at a novel GABA receptor. *Nature* 283:92-94.
- Bradler JE, Barrioneuvo G (1989) Long-term potentiation in hippocampal CA3 neurons: tetanized input regulates heterosynaptic efficacy. *Synapse* 4:132-142.
- Bragin A, Jando G, Nadasdy Z, Hetke J, Wise K, Buzsaki G (1995) Gamma (40-100 Hz) oscillation in the hippocampus of the behaving rat. *J Neurosci* 15:47-60.

- Bragin A, Engel J, Jr., Wilson CL, Fried I, Mathern GW (1999) Hippocampal and entorhinal cortex high-frequency oscillations (100--500 Hz) in human epileptic brain and in kainic acid--treated rats with chronic seizures. *Epilepsia* 40:127-137.
- Bredt DS, Snyder SH (1992) Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron* 8:3-11.
- Bredt DS, Nicoll RA (2003) AMPA receptor trafficking at excitatory synapses. *Neuron* 40:361-379.
- Brenner RP (2004) EEG in convulsive and nonconvulsive status epilepticus. *J Clin Neurophysiol* 21:319-331.
- Bressler SL, Coppola R, Nakamura R (1993) Episodic multiregional cortical coherence at multiple frequencies during visual task performance. *Nature* 366:153-156.
- Brickley SG, Revilla V, Cull-Candy SG, Wisden W, Farrant M (2001) Adaptive regulation of neuronal excitability by a voltage-independent potassium conductance. *Nature* 409:88-92.
- Brown GP, Blitzer RD, Connor JH, Wong T, Shenolikar S, Iyengar R, Landau EM (2000) Long-term potentiation induced by theta frequency stimulation is regulated by a protein phosphatase-1-operated gate. *J Neurosci* 20:7880-7887.
- Brunel N, Wang XJ (2001) Effects of neuromodulation in a cortical network model of object working memory dominated by recurrent inhibition. *J Comput Neurosci* 11:63-85.
- Buckby LE, Jensen TP, Smith PJ, Empson RM (2006) Network stability through homeostatic scaling of excitatory and inhibitory synapses following inactivity in CA3 of rat organotypic hippocampal slice cultures. *Mol Cell Neurosci* 31:805-816.
- Buhl EH, Cobb SR, Halasy K, Somogyi P (1995) Properties of unitary IPSPs evoked by anatomically identified basket cells in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 7:1989-2004.
- Buhl EH, Tamas G, Szilagyi T, Stricker C, Paulsen O, Somogyi P (1997) Effect, number and location of synapses made by single pyramidal cells onto aspiny interneurons of cat visual cortex. *J Physiol* 500 (Pt 3):689-713.
- Burrone J, O'Byrne M, Murthy VN (2002) Multiple forms of synaptic plasticity triggered by selective suppression of activity in individual neurons. *Nature* 420:414-418.
- Burrone J, Murthy VN (2003) Synaptic gain control and homeostasis. *Curr Opin Neurobiol* 13:560-567.
- Buzsaki G, Horvath Z, Urioste R, Hetke J, Wise K (1992) High-frequency network oscillation in the hippocampus. *Science* 256:1025-1027.
- Buzsaki G, Draguhn A (2004) Neuronal oscillations in cortical networks. *Science* 304:1926-1929.

C

- Caillard O, Ben-Ari Y, Gaiarsa JL (1999a) Long-term potentiation of GABAergic synaptic transmission in neonatal rat hippocampus. *J Physiol* 518 (Pt 1):109-119.
- Caillard O, Ben-Ari Y, Gaiarsa JL (1999b) Mechanisms of induction and expression of long-term depression at GABAergic synapses in the neonatal rat hippocampus. *J Neurosci* 19:7568-7577.
- Callaway EM (2002) Cell type specificity of local cortical connections. *J Neurocytol* 31:231-237.
- Caraiscos VB, Elliott EM, You-Ten KE, Cheng VY, Belelli D, Newell JG, Jackson MF, Lambert JJ, Rosahl TW, Wafford KA, MacDonald JF, Orser BA (2004) Tonic inhibition in mouse hippocampal CA1 pyramidal neurons is mediated by alpha5 subunit-containing gamma-aminobutyric acid type A receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:3662-3667.
- Carroll RC, Lissin DV, von Zastrow M, Nicoll RA, Malenka RC (1999) Rapid redistribution of glutamate receptors contributes to long-term depression in hippocampal cultures. *Nat Neurosci* 2:454-460.
- Chance FS, Abbott LF, Reyes AD (2002) Gain modulation from background synaptic input. *Neuron* 35:773-782.
- Charpier S, Behrends JC, Triller A, Faber DS, Korn H (1995) "Latent" inhibitory connections become functional during activity-dependent plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:117-120.
- Chatterton JE, Awobuluyi M, Premkumar LS, Takahashi H, Talantova M, Shin Y, Cui J, Tu S, Sevarino KA, Nakanishi N, Tong G, Lipton SA, Zhang D (2002) Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature* 415:793-798.
- Chattopadhyaya B, Di Cristo G, Higashiyama H, Knott GW, Kuhlman SJ, Welker E, Huang ZJ (2004) Experience and activity-dependent maturation of perisomatic GABAergic innervation in primary visual cortex during a postnatal critical period. *J Neurosci* 24:9598-9611.
- Chen L, Chetkovich DM, Petralia RS, Sweeney NT, Kawasaki Y, Wenthold RJ, Brecht DS, Nicoll RA (2000) Stargazin regulates synaptic targeting of AMPA receptors by two distinct mechanisms. *Nature* 408:936-943.
- Chen PE, Wyllie DJ (2006) Pharmacological insights obtained from structure-function studies of ionotropic glutamate receptors. *Br J Pharmacol* 147:839-853.
- Chen L, Bohanick JD, Nishihara M, Seamans JK, Yang CR (2007) Dopamine d1/5 receptor-mediated long-term potentiation of intrinsic excitability in rat prefrontal cortical neurons: Ca²⁺-dependent intracellular signaling. *J Neurophysiol* 97:2448-2464.

- Chevalyere V, Castillo PE (2003) Heterosynaptic LTD of hippocampal GABAergic synapses: a novel role of endocannabinoids in regulating excitability. *Neuron* 38:461-472.
- Choi S, Klingauf J, Tsien RW (2000) Postfusional regulation of cleft glutamate concentration during LTP at 'silent synapses'. *Nat Neurosci* 3:330-336.
- Christie BR, Magee JC, Johnston D (1996a) The role of dendritic action potentials and Ca²⁺ influx in the induction of homosynaptic long-term depression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Learn Mem* 3:160-169.
- Christie BR, Magee JC, Johnston D (1996b) Dendritic calcium channels and hippocampal long-term depression. *Hippocampus* 6:17-23.
- Chrobak JJ, Buzsaki G (1994) Selective activation of deep layer (V-VI) retrohippocampal cortical neurons during hippocampal sharp waves in the behaving rat. *J Neurosci* 14:6160-6170.
- Ciabarra AM, Sullivan JM, Gahn LG, Pecht G, Heinemann S, Sevarino KA (1995) Cloning and characterization of chi-1: a developmentally regulated member of a novel class of the ionotropic glutamate receptor family. *J Neurosci* 15:6498-6508.
- Cipolloni PB, Kimerer L, Weintraub ND, Smith DV, Keller A (1998) Distribution of inhibitory synapses on the somata of pyramidal neurons in cat motor cortex. *Somatosens Mot Res* 15:276-286.
- Cline H (2005) Synaptogenesis: a balancing act between excitation and inhibition. *Curr Biol* 15:R203-205.
- 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.
- Colbert CM, Johnston D (1996) Axonal action-potential initiation and Na⁺ channel densities in the soma and axon initial segment of subicular pyramidal neurons. *J Neurosci* 16:6676-6686.
- Colbert CM, Pan E (2002) Ion channel properties underlying axonal action potential initiation in pyramidal neurons. *Nat Neurosci* 5:533-538.
- Collingridge GL, Kehl SJ, McLennan H (1983) Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *J Physiol* 334:33-46.
- Compte A, Sanchez-Vives MV, McCormick DA, Wang XJ (2003) Cellular and network mechanisms of slow oscillatory activity (<1 Hz) and wave propagations in a cortical network model. *J Neurophysiol* 89:2707-2725.
- Connors BW, Gutnick MJ (1990) Intrinsic firing patterns of diverse neocortical neurons. *Trends Neurosci* 13:99-104.
- Contestabile A (2000) Roles of NMDA receptor activity and nitric oxide production in brain development. *Brain Res Brain Res Rev* 32:476-509.

- Contreras D, Timofeev I, Steriade M (1996) Mechanisms of long-lasting hyperpolarizations underlying slow sleep oscillations in cat corticothalamic networks. *J Physiol* 494 (Pt 1):251-264.
- Cope DW, Hughes SW, Crunelli V (2005) GABAA receptor-mediated tonic inhibition in thalamic neurons. *J Neurosci* 25:11553-11563.
- 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.
- Cowan RL, Wilson CJ (1994) Spontaneous firing patterns and axonal projections of single corticostriatal neurons in the rat medial agranular cortex. *J Neurophysiol* 71:17-32.
- Crochet S, Chauvette S, Boucetta S, Timofeev I (2005) Modulation of synaptic transmission in neocortex by network activities. *Eur J Neurosci* 21:1030-1044.
- Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M (2001) NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol* 11:327-335.
- Cull-Candy SG, Leszkiewicz DN (2004) Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Sci STKE* 2004:re16.
- Cummings JA, Mulkey RM, Nicoll RA, Malenka RC (1996) Ca²⁺ signaling requirements for long-term depression in the hippocampus. *Neuron* 16:825-833.

D

- Dani VS, Chang Q, Maffei A, Turrigiano GG, Jaenisch R, Nelson SB (2005) Reduced cortical activity due to a shift in the balance between excitation and inhibition in a mouse model of Rett syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:12560-12565.
- Daniel H, Levenes C, Crepel F (1998) Cellular mechanisms of cerebellar LTD. *Trends Neurosci* 21:401-407.
- Dantzker JL, Callaway EM (2000) Laminar sources of synaptic input to cortical inhibitory interneurons and pyramidal neurons. *Nat Neurosci* 3:701-707.
- Danysz W, Parsons AC (1998) Glycine and N-methyl-D-aspartate receptors: physiological significance and possible therapeutic applications. *Pharmacol Rev* 50:597-664.
- Davis GW, Goodman CS (1998a) Genetic analysis of synaptic development and plasticity: homeostatic regulation of synaptic efficacy. *Curr Opin Neurobiol* 8:149-156.
- Davis GW, Goodman CS (1998b) Synapse-specific control of synaptic efficacy at the terminals of a single neuron. *Nature* 392:82-86.
- Davis GW, Bezprozvanny I (2001) Maintaining the stability of neural function: a homeostatic hypothesis. *Annu Rev Physiol* 63:847-869.
- Davis GW (2006) HOMEOSTATIC CONTROL OF NEURAL ACTIVITY: From Phenomenology to Molecular Design. *Annu Rev Neurosci* 29:307-323.

- Daw NW, Fox K, Sato H, Czepita D (1992) Critical period for monocular deprivation in the cat visual cortex. *J Neurophysiol* 67:197-202.
- Daw MI, Bortolotto ZA, Saulle E, Zaman S, Collingridge GL, Isaac JT (2002) Phosphatidylinositol 3 kinase regulates synapse specificity of hippocampal long-term depression. *Nat Neurosci* 5:835-836.
- Daw N, Rao Y, Wang XF, Fischer Q, Yang Y (2004) LTP and LTD vary with layer in rodent visual cortex. *Vision Res* 44:3377-3380.
- De Gois S, Schafer MK, Defamie N, Chen C, Ricci A, Weihe E, Varoqui H, Erickson JD (2005) Homeostatic scaling of vesicular glutamate and GABA transporter expression in rat neocortical circuits. *J Neurosci* 25:7121-7133.
- Debanne D, Gahwiler BH, Thompson SM (1998) Long-term synaptic plasticity between pairs of individual CA3 pyramidal cells in rat hippocampal slice cultures. *J Physiol* 507 (Pt 1):237-247.
- DeFelipe J, Jones EG (1992) High-Resolution Light and Electron Microscopic Immunocytochemistry of Colocalized GABA and Calbindin D-28k in Somata and Double Bouquet Cell Axons of Monkey Somatosensory Cortex. *Eur J Neurosci* 4:46-60.
- DeFelipe J, Farinas I (1992) The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Prog Neurobiol* 39:563-607.
- DeFelipe J (1997) Types of neurons, synaptic connections and chemical characteristics of cells immunoreactive for calbindin-D28K, parvalbumin and calretinin in the neocortex. *J Chem Neuroanat* 14:1-19.
- Deleuze C, Alonso G, Lefevre IA, Duvoid-Guillou A, Hussy N (2005) Extrasynaptic localization of glycine receptors in the rat supraoptic nucleus: further evidence for their involvement in glia-to-neuron communication. *Neuroscience* 133:175-183.
- Desai NS, Rutherford LC, Turrigiano GG (1999) Plasticity in the intrinsic excitability of cortical pyramidal neurons. *Nat Neurosci* 2:515-520.
- Desai NS, Cudmore RH, Nelson SB, Turrigiano GG (2002) Critical periods for experience-dependent synaptic scaling in visual cortex. *Nat Neurosci* 5:783-789.
- DeYoe EA, Van Essen DC (1988) Concurrent processing streams in monkey visual cortex. *Trends Neurosci* 11:219-226.
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF (1999) The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51:7-61.
- Dotz H, Eder M, Frick A, Zieglgansberger W (1999) Precisely localized LTD in the neocortex revealed by infrared-guided laser stimulation. *Science* 286:110-113.
- Doetsch F, Hen R (2005) Young and excitable: the function of new neurons in the adult mammalian brain. *Curr Opin Neurobiol* 15:121-128.

- Drasbek KR, Jensen K (2006) THIP, a Hypnotic and Antinociceptive Drug, Enhances an Extrasynaptic GABAA Receptor-mediated Conductance in Mouse Neocortex. *Cereb Cortex* 16:1134-1141.
- Dudek SM, Bear MF (1992) Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:4363-4367.
- Dudek SM, Bear MF (1993) Bidirectional long-term modification of synaptic effectiveness in the adult and immature hippocampus. *J Neurosci* 13:2910-2918.
- Durstewitz D, Seamans JK, Sejnowski TJ (2000) Neurocomputational models of working memory. *Nat Neurosci* 3 Suppl:1184-1191.

E

- Eckhorn R, Bauer R, Jordan W, Brosch M, Kruse W, Munk M, Reitboeck HJ (1988) Coherent oscillations: a mechanism of feature linking in the visual cortex? Multiple electrode and correlation analyses in the cat. *Biol Cybern* 60:121-130.
- Eeckman FH, Freeman WJ (1990) Correlations between unit firing and EEG in the rat olfactory system. *Brain Res* 528:238-244.
- Egger V, Feldmeyer D, Sakmann B (1999) Coincidence detection and changes of synaptic efficacy in spiny stellate neurons in rat barrel cortex. *Nat Neurosci* 2:1098-1105.
- Ehlers MD (2000) Reinsertion or degradation of AMPA receptors determined by activity-dependent endocytic sorting. *Neuron* 28:511-525.
- El-Husseini Ael D, Schnell E, Dakoji S, Sweeney N, Zhou Q, Prange O, Gauthier-Campbell C, Aguilera-Moreno A, Nicoll RA, Brecht DS (2002) Synaptic strength regulated by palmitate cycling on PSD-95. *Cell* 108:849-863.
- Emptage MR, Hudson-Curtis B, Sen K (2003) Treatment of microarray experiments as split-plot designs. *J Biopharm Stat* 13:159-178.
- Engel AK, Singer W (2001) Temporal binding and the neural correlates of sensory awareness. *Trends Cogn Sci* 5:16-25.
- Erickson JD, De Gois S, Varoqui H, Schafer MK, Weihe E (2006) Activity-dependent regulation of vesicular glutamate and GABA transporters: a means to scale quantal size. *Neurochem Int* 48:643-649.
- Esplugues JV (2002) NO as a signalling molecule in the nervous system. *Br J Pharmacol* 135:1079-1095.

F

- Farrant M, Nusser Z (2005) Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nat Rev Neurosci* 6:215-229.
- Feldman DE (2000) Inhibition and plasticity. *Nat Neurosci* 3:303-304.
- Fisahn A, Pike FG, Buhl EH, Paulsen O (1998) Cholinergic induction of network oscillations at 40 Hz in the hippocampus in vitro. *Nature* 394:186-189.
- Fischer Y, Durr R (2003) Inhibitory control of intrinsic hippocampal oscillations? *Brain Res* 982:79-91.
- Flames N, Marin O (2005) Developmental mechanisms underlying the generation of cortical interneuron diversity. *Neuron* 46:377-381.
- Flint AC, Liu X, Kriegstein AR (1998) Nonsynaptic glycine receptor activation during early neocortical development. *Neuron* 20:43-53.
- Forrest D, Yuzaki M, Soares HD, Ng L, Luk DC, Sheng M, Stewart CL, Morgan JI, Connor JA, Curran T (1994) Targeted disruption of NMDA receptor 1 gene abolishes NMDA response and results in neonatal death. *Neuron* 13:325-338.
- Fox K (1992) A critical period for experience-dependent synaptic plasticity in rat barrel cortex. *J Neurosci* 12:1826-1838.
- Freund TF, Gulyas AI (1997) Inhibitory control of GABAergic interneurons in the hippocampus. *Can J Physiol Pharmacol* 75:479-487.
- Freund TF (2003) Interneuron Diversity series: Rhythm and mood in perisomatic inhibition. *Trends Neurosci* 26:489-495.
- Fritschy JM, Brunig I (2003) Formation and plasticity of GABAergic synapses: physiological mechanisms and pathophysiological implications. *Pharmacol Ther* 98:299-323.
- Furukawa H, Gouaux E (2003) Mechanisms of activation, inhibition and specificity: crystal structures of the NMDA receptor NR1 ligand-binding core. *Embo J* 22:2873-2885.
- Furukawa H, Singh SK, Mancusso R, Gouaux E (2005) Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature* 438:185-192.

G

- Gabbott PL, Dickie BG, Vaid RR, Headlam AJ, Bacon SJ (1997) Local-circuit neurones in the medial prefrontal cortex (areas 25, 32 and 24b) in the rat: morphology and quantitative distribution. *J Comp Neurol* 377:465-499.
- Gage PW, Hamill OP (1981) Effects of anesthetics on ion channels in synapses. *Int Rev Physiol* 25:1-45.
- Gaiarsa JL, Caillard O, Ben-Ari Y (2002) Long-term plasticity at GABAergic and glycinergic synapses: mechanisms and functional significance. *Trends Neurosci* 25:564-570.

- Gaiarsa JL (2004) Plasticity of GABAergic synapses in the neonatal rat hippocampus. *J Cell Mol Med* 8:31-37.
- Galarreta M, Hestrin S (1998) Frequency-dependent synaptic depression and the balance of excitation and inhibition in the neocortex. *Nat Neurosci* 1:587-594.
- Gallopín T, Geoffroy H, Rossier J, Lambolez B (2006) Cortical sources of CRF, NKB, and CCK and their effects on pyramidal cells in the neocortex. *Cereb Cortex* 16:1440-1452.
- Gao WJ, Wormington AB, Newman DE, Pallas SL (2000) Development of inhibitory circuitry in visual and auditory cortex of postnatal ferrets: immunocytochemical localization of calbindin- and parvalbumin-containing neurons. *J Comp Neurol* 422:140-157.
- Garthwaite J, Boulton CL (1995) Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol* 57:683-706.
- Gasparini S, Magee JC (2002) Phosphorylation-dependent differences in the activation properties of distal and proximal dendritic Na⁺ channels in rat CA1 hippocampal neurons. *J Physiol* 541:665-672.
- Gianfranceschi L, Siciliano R, Walls J, Morales B, Kirkwood A, Huang ZJ, Tonegawa S, Maffei L (2003) Visual cortex is rescued from the effects of dark rearing by overexpression of BDNF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:12486-12491.
- Gibson JR, Beierlein M, Connors BW (1999) Two networks of electrically coupled inhibitory neurons in neocortex. *Nature* 402:75-79.
- Gilbert CD, Wiesel TN (1979) Morphology and intracortical projections of functionally characterised neurones in the cat visual cortex. *Nature* 280:120-125.
- Gilbert CD (1993) Circuitry, architecture, and functional dynamics of visual cortex. *Cereb Cortex* 3:373-386.
- Glaum SR, Brooks PA (1996) Tetanus-induced sustained potentiation of monosynaptic inhibitory transmission in the rat medulla: evidence for a presynaptic locus. *J Neurophysiol* 76:30-38.
- Golowasch J, Casey M, Abbott LF, Marder E (1999) Network stability from activity-dependent regulation of neuronal conductances. *Neural Comput* 11:1079-1096.
- Gomez LL, Alam S, Smith KE, Horne E, Dell'Acqua ML (2002) Regulation of A-kinase anchoring protein 79/150-cAMP-dependent protein kinase postsynaptic targeting by NMDA receptor activation of calcineurin and remodeling of dendritic actin. *J Neurosci* 22:7027-7044.
- Gomez-Lira G, Lamas M, Romo-Parra H, Gutierrez R (2005) Programmed and induced phenotype of the hippocampal granule cells. *J Neurosci* 25:6939-6946.

- Gordon B, Kinch G, Kato N, Keele C, Lissman T, Fu LN (1997) Development of MK-801, kainate, AMPA, and muscimol binding sites and the effect of dark rearing in rat visual cortex. *J Comp Neurol* 383:73-81.
- Grabauskas G, Bradley RM (1999) Potentiation of GABAergic synaptic transmission in the rostral nucleus of the solitary tract. *Neuroscience* 94:1173-1182.
- Gray CM, Singer W (1989) Stimulus-specific neuronal oscillations in orientation columns of cat visual cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:1698-1702.
- Gubellini P, Ben-Ari Y, Gaiarsa JL (2001) Activity- and age-dependent GABAergic synaptic plasticity in the developing rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 14:1937-1946.
- Gulyas AI, Miles R, Hajos N, Freund TF (1993) Precision and variability in postsynaptic target selection of inhibitory cells in the hippocampal CA3 region. *Eur J Neurosci* 5:1729-1751.
- Guo Y, Kaplan IV, Cooper NG, Mower GD (1997) Expression of two forms of glutamic acid decarboxylase (GAD67 and GAD65) during postnatal development of the cat visual cortex. *Brain Res Dev Brain Res* 103:127-141.
- Gupta A, Wang Y, Markram H (2000) Organizing principles for a diversity of GABAergic interneurons and synapses in the neocortex. *Science* 287:273-278.

H

- Haghikia A, Mergia E, Friebe A, Eysel UT, Koesling D, Mittmann T (2007) Long-term potentiation in the visual cortex requires both nitric oxide receptor guanylyl cyclases. *J Neurosci* 27:818-823.
- Hahnloser RH, Douglas RJ, Hepp K (2002) Attentional recruitment of inter-areal recurrent networks for selective gain control. *Neural Comput* 14:1669-1689.
- Haider B, Duque A, Hasenstaub AR, McCormick DA (2006) Neocortical network activity in vivo is generated through a dynamic balance of excitation and inhibition. *J Neurosci* 26:4535-4545.
- Halassa MM, Fellin T, Haydon PG (2007) The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends Mol Med* 13:54-63.
- Hasenstaub A, Shu Y, Haider B, Kraushaar U, Duque A, McCormick DA (2005) Inhibitory postsynaptic potentials carry synchronized frequency information in active cortical networks. *Neuron* 47:423-435.
- Hashimoto A, Nishikawa T, Hayashi T, Fujii N, Harada K, Oka T, Takahashi K (1992) The presence of free D-serine in rat brain. *FEBS Lett* 296:33-36.
- Hashimoto A, Nishikawa T, Oka T, Takahashi K (1993) Endogenous D-serine in rat brain: N-methyl-D-aspartate receptor-related distribution and aging. *J Neurochem* 60:783-786.

- Hashimoto T, Ishii T, Ohmori H (1996) Release of Ca²⁺ is the crucial step for the potentiation of IPSCs in the cultured cerebellar Purkinje cells of the rat. *J Physiol* 497 (Pt 3):611-627.
- Hausser M (2001) Synaptic function: dendritic democracy. *Curr Biol* 11:R10-12.
- Hayashi Y, Shi SH, Esteban JA, Piccini A, Poncer JC, Malinow R (2000) Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction. *Science* 287:2262-2267.
- Haydon PG, Carmignoto G (2006) Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. *Physiol Rev* 86:1009-1031.
- Hebb DO (1949) *The Organization of Behavior: A Neurophysiological Theory*, John Wiley and Sons.
- Hendricson AW, Miao CL, Lippmann MJ, Morrisett RA (2002) Ifenprodil and ethanol enhance NMDA receptor-dependent long-term depression. *J Pharmacol Exp Ther* 301:938-944.
- Hensch TK, Fagiolini M, Mataga N, Stryker MP, Baekkeskov S, Kash SF (1998) Local GABA circuit control of experience-dependent plasticity in developing visual cortex. *Science* 282:1504-1508.
- Hensch TK (2004) Critical period regulation. *Annu Rev Neurosci* 27:549-579.
- Hensch TK (2005) Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nat Rev Neurosci* 6:877-888.
- Hestrin S, Galarreta M (2005) Electrical synapses define networks of neocortical GABAergic neurons. *Trends Neurosci* 28:304-309.
- Heynen AJ, Quinlan EM, Bae DC, Bear MF (2000) Bidirectional, activity-dependent regulation of glutamate receptors in the adult hippocampus in vivo. *Neuron* 28:527-536.
- Higley MJ, Contreras D (2006) Balanced excitation and inhibition determine spike timing during frequency adaptation. *J Neurosci* 26:448-457.
- Hirsch JA, Martinez LM, Pillai C, Alonso JM, Wang Q, Sommer FT (2003) Functionally distinct inhibitory neurons at the first stage of visual cortical processing. *Nat Neurosci* 6:1300-1308.
- Hollmann M, Heinemann S (1994) Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* 17:31-108.
- Hoffman DA, Magee JC, Colbert CM, Johnston D (1997) K⁺ channel regulation of signal propagation in dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *Nature* 387:869-875.
- Hollrigel GS, Morris RJ, Soltesz I (1998) Enhanced bursts of IPSCs in dentate granule cells in mice with regionally inhibited long-term potentiation. *Proc Biol Sci* 265:63-69.
- Holmgren CD, Zilberter Y (2001) Coincident spiking activity induces long-term changes in inhibition of neocortical pyramidal cells. *J Neurosci* 21:8270-8277.

- Hopper RA, Garthwaite J (2006) Tonic and phasic nitric oxide signals in hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci* 26:11513-11521.
- Hrabetova S, Sacktor TC (1996) Bidirectional regulation of protein kinase M zeta in the maintenance of long-term potentiation and long-term depression. *J Neurosci* 16:5324-5333.
- Hrabetova S, Sacktor TC (2001) Transient translocation of conventional protein kinase C isoforms and persistent downregulation of atypical protein kinase Mzeta in long-term depression. *Brain Res Mol Brain Res* 95:146-152.
- Hu GY, Hvalby O, Walaas SI, Albert KA, Skjeflo P, Andersen P, Greengard P (1987) Protein kinase C injection into hippocampal pyramidal cells elicits features of long term potentiation. *Nature* 328:426-429.
- Huang ZJ, Kirkwood A, Pizzorusso T, Porciatti V, Morales B, Bear MF, Maffei L, Tonegawa S (1999) BDNF regulates the maturation of inhibition and the critical period of plasticity in mouse visual cortex. *Cell* 98:739-755.
- Hubel DH, Wiesel TN (1970) The period of susceptibility to the physiological effects of unilateral eye closure in kittens. *J Physiol* 206:419-436.
- Huemmeke M, Eysel UT, Mittmann T (2004) Lesion-induced enhancement of LTP in rat visual cortex is mediated by NMDA receptors containing the NR2B subunit. *J Physiol* 559:875-882.
- Huguenard JR, Hamill OP, Prince DA (1989) Sodium channels in dendrites of rat cortical pyramidal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:2473-2477.
- Hussy N, Deleuze C, Pantaloni A, Desarmenien MG, Moos F (1997) Agonist action of taurine on glycine receptors in rat supraoptic magnocellular neurones: possible role in osmoregulation. *J Physiol* 502 (Pt 3):609-621.

J

- Jaffrey SR, Snyder SH (1995) Nitric oxide: a neural messenger. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11:417-440.
- Jahr CE, Stevens CF (1987) Glutamate activates multiple single channel conductances in hippocampal neurons. *Nature* 325:522-525.
- Jedlicka P, Backus KH (2006) Inhibitory transmission, activity-dependent ionic changes and neuronal network oscillations. *Physiol Res* 55:139-149.
- Jefferys JG, Traub RD (1998) 'Dormant' inhibitory neurons: do they exist and what is their functional impact? *Epilepsy Res* 32:104-113.
- Jiang B, Huang ZJ, Morales B, Kirkwood A (2005) Maturation of GABAergic transmission and the timing of plasticity in visual cortex. *Brain Res Brain Res Rev* 50:126-133.

Johnston D, Christie BR, Frick A, Gray R, Hoffman DA, Schexnayder LK, Watanabe S, Yuan LL (2003) Active dendrites, potassium channels and synaptic plasticity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358:667-674.

K

Kamal A, Ramakers GM, Urban IJ, De Graan PN, Gispen WH (1999) Chemical LTD in the CA1 field of the hippocampus from young and mature rats. *Eur J Neurosci* 11:3512-3516.

Kameyama K, Lee HK, Bear MF, Huganir RL (1998) Involvement of a postsynaptic protein kinase A substrate in the expression of homosynaptic long-term depression. *Neuron* 21:1163-1175.

Kampa BM, Letzkus JJ, Stuart GJ (2006) Cortical feed-forward networks for binding different streams of sensory information. *Nat Neurosci* 9:1472-1473.

Kandel ER (1997) Genes, synapses, and long-term memory. *J Cell Physiol* 173:124-125.

Kandler K, Katz LC, Kauer JA (1998) Focal photolysis of caged glutamate produces long-term depression of hippocampal glutamate receptors. *Nat Neurosci* 1:119-123.

Kang J, Jiang L, Goldman SA, Nedergaard M (1998) Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat Neurosci* 1:683-692.

Kano M, Rexhausen U, Dreessen J, Konnerth A (1992) Synaptic excitation produces a long-lasting rebound potentiation of inhibitory synaptic signals in cerebellar Purkinje cells. *Nature* 356:601-604.

Kano M (1995) Plasticity of inhibitory synapses in the brain: a possible memory mechanism that has been overlooked. *Neurosci Res* 21:177-182.

Kano M, Fukunaga K, Konnerth A (1996) Ca²⁺-induced rebound potentiation of gamma-aminobutyric acid-mediated currents requires activation of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13351-13356.

Katz LC, Shatz CJ (1996) Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science* 274:1133-1138.

Kauer JA, Malenka RC, Nicoll RA (1988) NMDA application potentiates synaptic transmission in the hippocampus. *Nature* 334:250-252.

Kawaguchi Y, Kubota Y (1997) GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cereb Cortex* 7:476-486.

Kawaguchi Y, Kondo S (2002) Parvalbumin, somatostatin and cholecystokinin as chemical markers for specific GABAergic interneuron types in the rat frontal cortex. *J Neurocytol* 31:277-287.

Keller A (1993) Intrinsic synaptic organization of the motor cortex. *Cereb Cortex* 3:430-441.

- Kew JN, Richards JG, Mutel V, Kemp JA (1998) Developmental changes in NMDA receptor glycine affinity and ifenprodil sensitivity reveal three distinct populations of NMDA receptors in individual rat cortical neurons. *J Neurosci* 18:1935-1943.
- Kew JN, Kemp JA (2005) Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology (Berl)* 179:4-29.
- Kharazia VN, Wenthold RJ, Weinberg RJ (1996) GluR1-immunopositive interneurons in rat neocortex. *J Comp Neurol* 368:399-412.
- Kilman V, van Rossum MC, Turrigiano GG (2002) Activity deprivation reduces miniature IPSC amplitude by decreasing the number of postsynaptic GABA(A) receptors clustered at neocortical synapses. *J Neurosci* 22:1328-1337.
- Kim HS, Jang HJ, Cho KH, Hahn SJ, Kim MJ, Yoon SH, Jo YH, Kim MS, Rhie DJ (2006) Serotonin inhibits the induction of NMDA receptor-dependent long-term potentiation in the rat primary visual cortex. *Brain Res* 1103:49-55.
- Kirkwood A, Dudek SM, Gold JT, Aizenman CD, Bear MF (1993) Common forms of synaptic plasticity in the hippocampus and neocortex in vitro. *Science* 260:1518-1521.
- Kirkwood A, Bear MF (1994) Hebbian synapses in visual cortex. *J Neurosci* 14:1634-1645.
- Kirkwood A, Bear MF (1995) Elementary forms of synaptic plasticity in the visual cortex. *Biol Res* 28:73-80.
- Kirkwood A, Rozas C, Kirkwood J, Perez F, Bear MF (1999) Modulation of long-term synaptic depression in visual cortex by acetylcholine and norepinephrine. *J Neurosci* 19:1599-1609.
- Kittler JT, Delmas P, Jovanovic JN, Brown DA, Smart TG, Moss SJ (2000) Constitutive endocytosis of GABAA receptors by an association with the adaptin AP2 complex modulates inhibitory synaptic currents in hippocampal neurons. *J Neurosci* 20:7972-7977.
- Ko GY, Kelly PT (1999) Nitric oxide acts as a postsynaptic signaling molecule in calcium/calmodulin-induced synaptic potentiation in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 19:6784-6794.
- Koch C, Douglas R, Wehmeier U (1990) Visibility of synaptically induced conductance changes: theory and simulations of anatomically characterized cortical pyramidal cells. *J Neurosci* 10:1728-1744.
- Koester HJ, Sakmann B (1998) Calcium dynamics in single spines during coincident pre- and postsynaptic activity depend on relative timing of back-propagating action potentials and subthreshold excitatory postsynaptic potentials. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:9596-9601.
- Komatsu Y, Iwakiri M (1993) Long-term modification of inhibitory synaptic transmission in developing visual cortex. *Neuroreport* 4:907-910.

- Komatsu Y (1994) Age-dependent long-term potentiation of inhibitory synaptic transmission in rat visual cortex. *J Neurosci* 14:6488-6499.
- Komatsu Y (1996) GABAB receptors, monoamine receptors, and postsynaptic inositol trisphosphate-induced Ca²⁺ release are involved in the induction of long-term potentiation at visual cortical inhibitory synapses. *J Neurosci* 16:6342-6352.
- Konig P, Engel AK, Singer W (1996) Integrator or coincidence detector? The role of the cortical neuron revisited. *Trends Neurosci* 19:130-137.
- Kopell N, Ermentrout B (2004) Chemical and electrical synapses perform complementary roles in the synchronization of interneuronal networks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:15482-15487.
- Korn H, Oda Y, Faber DS (1992) Long-term potentiation of inhibitory circuits and synapses in the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:440-443.
- Korngreen A, Sakmann B (2000) Voltage-gated K⁺ channels in layer 5 neocortical pyramidal neurones from young rats: subtypes and gradients. *J Physiol* 525 Pt 3:621-639.
- Kotak VC, Sanes DH (2000) Long-lasting inhibitory synaptic depression is age- and calcium-dependent. *J Neurosci* 20:5820-5826.
- Krasteniakov NV, Martina M, Bergeron R (2005) Role of the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor in synaptic plasticity induced by pairing. *Eur J Neurosci* 21:2782-2792.
- Kreitzer AC, Regehr WG (2001) Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells. *Neuron* 29:717-727.
- Kuczewski N, Aztiria E, Leanza G, Domenici L (2005) Selective cholinergic immunolesioning affects synaptic plasticity in developing visual cortex. *Eur J Neurosci* 21:1807-1814.
- Kullmann DM, Nicoll RA (1992) Long-term potentiation is associated with increases in quantal content and quantal amplitude. *Nature* 357:240-244.
- Kullmann DM, Asztely F, Walker MC (2000) The role of mammalian ionotropic receptors in synaptic plasticity: LTP, LTD and epilepsy. *Cell Mol Life Sci* 57:1551-1561.

L

- Larkman AU, Jack JJ (1995) Synaptic plasticity: hippocampal LTP. *Curr Opin Neurobiol* 5:324-334.
- Larkum ME, Kaiser KM, Sakmann B (1999) Calcium electrogenesis in distal apical dendrites of layer 5 pyramidal cells at a critical frequency of back-propagating action potentials. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:14600-14604.

- Larkum ME, Zhu JJ, Sakmann B (2001) Dendritic mechanisms underlying the coupling of the dendritic with the axonal action potential initiation zone of adult rat layer 5 pyramidal neurons. *J Physiol* 533:447-466.
- Larkum ME, Senn W, Luscher HR (2004) Top-down dendritic input increases the gain of layer 5 pyramidal neurons. *Cereb Cortex* 14:1059-1070.
- Lee HK, Kameyama K, Huganir RL, Bear MF (1998) NMDA induces long-term synaptic depression and dephosphorylation of the GluR1 subunit of AMPA receptors in hippocampus. *Neuron* 21:1151-1162.
- Lee HK, Barbarosie M, Kameyama K, Bear MF, Huganir RL (2000) Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation sites during bidirectional synaptic plasticity. *Nature* 405:955-959.
- Lee SH, Liu L, Wang YT, Sheng M (2002) Clathrin adaptor AP2 and NSF interact with overlapping sites of GluR2 and play distinct roles in AMPA receptor trafficking and hippocampal LTD. *Neuron* 36:661-674.
- Lee HK, Takamiya K, Han JS, Man H, Kim CH, Rumbaugh G, Yu S, Ding L, He C, Petralia RS, Wenthold RJ, Gallagher M, Huganir RL (2003) Phosphorylation of the AMPA receptor GluR1 subunit is required for synaptic plasticity and retention of spatial memory. *Cell* 112:631-643.
- Leslie KR, Nelson SB, Turrigiano GG (2001) Postsynaptic depolarization scales quantal amplitude in cortical pyramidal neurons. *J Neurosci* 21:RC170.
- Leventhal AG, Wang Y, Pu M, Zhou Y, Ma Y (2003) GABA and its agonists improved visual cortical function in senescent monkeys. *Science* 300:812-815.
- Lewis DA, Lund JS (1990) Heterogeneity of chandelier neurons in monkey neocortex: corticotropin-releasing factor- and parvalbumin-immunoreactive populations. *J Comp Neurol* 293:599-615.
- Li R, Dozmorov M, Hellberg F, Tian Y, Jilderos B, Wigstrom H (2004) Characterization of NMDA induced depression in rat hippocampus: involvement of AMPA and NMDA receptors. *Neurosci Lett* 357:87-90.
- Lin JW, Ju W, Foster K, Lee SH, Ahmadian G, Wyszynski M, Wang YT, Sheng M (2000) Distinct molecular mechanisms and divergent endocytotic pathways of AMPA receptor internalization. *Nat Neurosci* 3:1282-1290.
- Linden DJ, Routtenberg A (1989) The role of protein kinase C in long-term potentiation: a testable model. *Brain Res Brain Res Rev* 14:279-296.
- Linden DJ (1999) The return of the spike: postsynaptic action potentials and the induction of LTP and LTD. *Neuron* 22:661-666.
- Ling DS, Benardo LS, Serrano PA, Blace N, Kelly MT, Crary JF, Sacktor TC (2002) Protein kinase Mzeta is necessary and sufficient for LTP maintenance. *Nat Neurosci* 5:295-296.

- Lisman J (1989) A mechanism for the Hebb and the anti-Hebb processes underlying learning and memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:9574-9578.
- Lisman J, Malenka RC, Nicoll RA, Malinow R (1997) Learning mechanisms: the case for CaM-KII. *Science* 276:2001-2002.
- Lisman J, Schulman H, Cline H (2002) The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat Rev Neurosci* 3:175-190.
- Lissin DV, Gomperts SN, Carroll RC, Christine CW, Kalman D, Kitamura M, Hardy S, Nicoll RA, Malenka RC, von Zastrow M (1998) Activity differentially regulates the surface expression of synaptic AMPA and NMDA glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:7097-7102.
- Liu S, Wang J, Zhu D, Fu Y, Lukowiak K, Lu YM (2003) Generation of functional inhibitory neurons in the adult rat hippocampus. *J Neurosci* 23:732-736.
- Liu G (2004) Local structural balance and functional interaction of excitatory and inhibitory synapses in hippocampal dendrites. *Nat Neurosci* 7:373-379.
- Liu XB, Murray KD, Jones EG (2004a) Switching of NMDA receptor 2A and 2B subunits at thalamic and cortical synapses during early postnatal development. *J Neurosci* 24:8885-8895.
- Liu L, Wong TP, Pozza MF, Lingenhoehl K, Wang Y, Sheng M, Auberson YP, Wang YT (2004b) Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity. *Science* 304:1021-1024.
- Lledo PM, Hjelmstad GO, Mukherji S, Soderling TR, Malenka RC, Nicoll RA (1995) Calcium/calmodulin-dependent kinase II and long-term potentiation enhance synaptic transmission by the same mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:11175-11179.
- Lledo PM, Zhang X, Sudhof TC, Malenka RC, Nicoll RA (1998) Postsynaptic membrane fusion and long-term potentiation. *Science* 279:399-403.
- Llinas RR, Ribary U, Jeanmonod D, Kronberg E, Mitra PP (1999) Thalamocortical dysrhythmia: A neurological and neuropsychiatric syndrome characterized by magnetoencephalography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:15222-15227.
- Lu YF, Kandel ER, Hawkins RD (1999) Nitric oxide signaling contributes to late-phase LTP and CREB phosphorylation in the hippocampus. *J Neurosci* 19:10250-10261.
- Lu YM, Mansuy IM, Kandel ER, Roder J (2000) Calcineurin-mediated LTD of GABAergic inhibition underlies the increased excitability of CA1 neurons associated with LTP. *Neuron* 26:197-205.
- Luhmann HJ, Prince DA (1991) Postnatal maturation of the GABAergic system in rat neocortex. *J Neurophysiol* 65:247-263.
- Lund JS (1988) Anatomical organization of macaque monkey striate visual cortex. *Annu Rev Neurosci* 11:253-288.

- Luscher C, Xia H, Beattie EC, Carroll RC, von Zastrow M, Malenka RC, Nicoll RA (1999) Role of AMPA receptor cycling in synaptic transmission and plasticity. *Neuron* 24:649-658.
- Luthi A, Chittajallu R, Duprat F, Palmer MJ, Benke TA, Kidd FL, Henley JM, Isaac JT, Collingridge GL (1999) Hippocampal LTD expression involves a pool of AMPARs regulated by the NSF-GluR2 interaction. *Neuron* 24:389-399.
- Lynch G, Larson J, Kelso S, Barrionuevo G, Schottler F (1983) Intracellular injections of EGTA block induction of hippocampal long-term potentiation. *Nature* 305:719-721.
- Lynch MA (2004) Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev* 84:87-136.

M

- Maccaferri G, McBain CJ (1996) Long-term potentiation in distinct subtypes of hippocampal nonpyramidal neurons. *J Neurosci* 16:5334-5343.
- MacDermott AB, Mayer ML, Westbrook GL, Smith SJ, Barker JL (1986) NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones. *Nature* 321:519-522.
- Maffei A, Nelson SB, Turrigiano GG (2004) Selective reconfiguration of layer 4 visual cortical circuitry by visual deprivation. *Nat Neurosci* 7:1353-1359.
- Maffei A, Nataraj K, Nelson SB, Turrigiano GG (2006) Potentiation of cortical inhibition by visual deprivation. *Nature* 443:81-84.
- Magee JC, Johnston D (1995) Characterization of single voltage-gated Na⁺ and Ca²⁺ channels in apical dendrites of rat CA1 pyramidal neurons. *J Physiol* 487 (Pt 1):67-90.
- Magee JC, Christofi G, Miyakawa H, Christie B, Lasser-Ross N, Johnston D (1995) Subthreshold synaptic activation of voltage-gated Ca²⁺ channels mediates a localized Ca²⁺ influx into the dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 74:1335-1342.
- Magee JC, Johnston D (1997) A synaptically controlled, associative signal for Hebbian plasticity in hippocampal neurons. *Science* 275:209-213.
- Magee JC (1999) Voltage-gated ion channels in dendrites. In *Dendrites* (ed. G. Stuart, N. Spruston & M. Hausser); Oxford University Press, 139–160.
- Magee JC, Carruth M (1999) Dendritic voltage-gated ion channels regulate the action potential firing mode of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 82:1895-1901.
- Malen PL, Chapman PF (1997) Nitric oxide facilitates long-term potentiation, but not long-term depression. *J Neurosci* 17:2645-2651.

- Malenka RC, Kauer JA, Zucker RS, Nicoll RA (1988) Postsynaptic calcium is sufficient for potentiation of hippocampal synaptic transmission. *Science* 242:81-84.
- Malenka RC, Nicoll RA (1999) Long-term potentiation--a decade of progress? *Science* 285:1870-1874.
- Malenka RC, Bear MF (2004) LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 44:5-21.
- Maletic-Savatic M, Koothan T, Malinow R (1998) Calcium-evoked dendritic exocytosis in cultured hippocampal neurons. Part II: mediation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Neurosci* 18:6814-6821.
- Malinow R, Miller JP (1986) Postsynaptic hyperpolarization during conditioning reversibly blocks induction of long-term potentiation. *Nature* 320:529-530.
- Malinow R, Schulman H, Tsien RW (1989) Inhibition of postsynaptic PKC or CaMKII blocks induction but not expression of LTP. *Science* 245:862-866.
- Malinow R, Mainen ZF, Hayashi Y (2000) LTP mechanisms: from silence to four-lane traffic. *Curr Opin Neurobiol* 10:352-357.
- Malinow R, Malenka RC (2002) AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 25:103-126.
- Mammen AL, Kameyama K, Roche KW, Huganir RL (1997) Phosphorylation of the alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor GluR1 subunit by calcium/calmodulin-dependent kinase II. *J Biol Chem* 272:32528-32533.
- Man HY, Lin JW, Ju WH, Ahmadian G, Liu L, Becker LE, Sheng M, Wang YT (2000) Regulation of AMPA receptor-mediated synaptic transmission by clathrin-dependent receptor internalization. *Neuron* 25:649-662.
- Man HY, Wang Q, Lu WY, Ju W, Ahmadian G, Liu L, D'Souza S, Wong TP, Taghibiglou C, Lu J, Becker LE, Pei L, Liu F, Wymann MP, MacDonald JF, Wang YT (2003) Activation of PI3-kinase is required for AMPA receptor insertion during LTP of mEPSCs in cultured hippocampal neurons. *Neuron* 38:611-624.
- Marder E, Prinz AA (2002) Modeling stability in neuron and network function: the role of activity in homeostasis. *Bioessays* 24:1145-1154.
- Marino J, Schummers J, Lyon DC, Schwabe L, Beck O, Wiesing P, Obermayer K, Sur M (2005) Invariant computations in local cortical networks with balanced excitation and inhibition. *Nat Neurosci* 8:194-201.
- Markram H, Helm PJ, Sakmann B (1995) Dendritic calcium transients evoked by single back-propagating action potentials in rat neocortical pyramidal neurons. *J Physiol* 485 (Pt 1):1-20.
- Markram H, Lubke J, Frotscher M, Sakmann B (1997) Regulation of synaptic efficacy by coincidence of postsynaptic APs and EPSPs. *Science* 275:213-215.
- Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C (2004) Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci* 5:793-807.

- Martin LJ, Blackstone CD, Levey AI, Huganir RL, Price DL (1993) AMPA glutamate receptor subunits are differentially distributed in rat brain. *Neuroscience* 53:327-358.
- Martinez LM, Alonso JM, Reid RC, Hirsch JA (2002) Laminar processing of stimulus orientation in cat visual cortex. *J Physiol* 540:321-333.
- Massey PV, Johnson BE, Moulton PR, Auberson YP, Brown MW, Molnar E, Collingridge GL, Bashir ZI (2004) Differential roles of NR2A and NR2B-containing NMDA receptors in cortical long-term potentiation and long-term depression. *J Neurosci* 24:7821-7828.
- Matsuda K, Kamiya Y, Matsuda S, Yuzaki M (2002) Cloning and characterization of a novel NMDA receptor subunit NR3B: a dominant subunit that reduces calcium permeability. *Brain Res Mol Brain Res* 100:43-52.
- Matsui T, Sekiguchi M, Hashimoto A, Tomita U, Nishikawa T, Wada K (1995) Functional comparison of D-serine and glycine in rodents: the effect on cloned NMDA receptors and the extracellular concentration. *J Neurochem* 65:454-458.
- Matsuzaki M, Honkura N, Ellis-Davies GC, Kasai H (2004) Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* 429:761-766.
- Maunsell JH, Newsome WT (1987) Visual processing in monkey extrastriate cortex. *Annu Rev Neurosci* 10:363-401.
- McBain CJ, Fisahn A (2001) Interneurons unbound. *Nat Rev Neurosci* 2:11-23.
- McLean HA, Caillard O, Ben-Ari Y, Gaiarsa JL (1996) Bidirectional plasticity expressed by GABAergic synapses in the neonatal rat hippocampus. *J Physiol* 496 (Pt 2):471-477.
- Meir R, Domany E (1987) Exact solution of a layered neural network model. *Physical Review Letters* 59:359-362.
- Meltzer LA, Yabaluri R, Deisseroth K (2005) A role for circuit homeostasis in adult neurogenesis. *Trends Neurosci* 28:653-660.
- Mendoza E, Galarraga E, Tapia D, Laville A, Hernandez-Echeagaray E, Vargas J (2006) Differential induction of long term synaptic plasticity in inhibitory synapses of the hippocampus. *Synapse* 60:533-542.
- Micheva KD, Beaulieu C (1997) Development and plasticity of the inhibitory neocortical circuitry with an emphasis on the rodent barrel field cortex: a review. *Can J Physiol Pharmacol* 75:470-478.
- Mickus T, Jung H, Spruston N (1999) Properties of slow, cumulative sodium channel inactivation in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Biophys J* 76:846-860.
- Miles R, Wong RK (1987) Latent synaptic pathways revealed after tetanic stimulation in the hippocampus. *Nature* 329:724-726.
- Miles R, Toth K, Gulyas AI, Hajos N, Freund TF (1996) Differences between somatic and dendritic inhibition in the hippocampus. *Neuron* 16:815-823.
- Mody I (1998) Ion channels in epilepsy. *Int Rev Neurobiol* 42:199-226.

- Mody I (2005) Aspects of the homeostatic plasticity of GABA_A receptor-mediated inhibition. *J Physiol* 562:37-46.
- Molnar E, Baude A, Richmond SA, Patel PB, Somogyi P, McIlhinney RA (1993) Biochemical and immunocytochemical characterization of antipeptide antibodies to a cloned GluR1 glutamate receptor subunit: cellular and subcellular distribution in the rat forebrain. *Neuroscience* 53:307-326.
- Monier C, Chavane F, Baudot P, Graham LJ, Fregnac Y (2003) Orientation and direction selectivity of synaptic inputs in visual cortical neurons: a diversity of combinations produces spike tuning. *Neuron* 37:663-680.
- Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH (1994) Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12:529-540.
- Morales B, Choi SY, Kirkwood A (2002) Dark rearing alters the development of GABAergic transmission in visual cortex. *J Neurosci* 22:8084-8090.
- Morishita W, Sastry BR (1996) Postsynaptic mechanisms underlying long-term depression of GABAergic transmission in neurons of the deep cerebellar nuclei. *J Neurophysiol* 76:59-68.
- Morishita W, Connor JH, Xia H, Quinlan EM, Shenolikar S, Malenka RC (2001) Regulation of synaptic strength by protein phosphatase 1. *Neuron* 32:1133-1148.
- Moulder KL, Meeks JP, Shute AA, Hamilton CK, de Erausquin G, Mennerick S (2004) Plastic elimination of functional glutamate release sites by depolarization. *Neuron* 42:423-435.
- Moulder KL, Meeks JP, Mennerick S (2006) Homeostatic regulation of glutamate release in response to depolarization. *Mol Neurobiol* 33:133-153.
- Mower GD, Guo Y (2001) Comparison of the expression of two forms of glutamic acid decarboxylase (GAD67 and GAD65) in the visual cortex of normal and dark-reared cats. *Brain Res Dev Brain Res* 126:65-74.
- Mulkey RM, Malenka RC (1992) Mechanisms underlying induction of homosynaptic long-term depression in area CA1 of the hippocampus. *Neuron* 9:967-975.
- Mulkey RM, Herron CE, Malenka RC (1993) An essential role for protein phosphatases in hippocampal long-term depression. *Science* 261:1051-1055.
- Mulkey RM, Endo S, Shenolikar S, Malenka RC (1994) Involvement of a calcineurin/inhibitor-1 phosphatase cascade in hippocampal long-term depression. *Nature* 369:486-488.
- Muller D, Lynch G (1988) Long-term potentiation differentially affects two components of synaptic responses in hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:9346-9350.

- Murphy KM, Beston BR, Boley PM, Jones DG (2005) Development of human visual cortex: a balance between excitatory and inhibitory plasticity mechanisms. *Dev Psychobiol* 46:209-221.
- Murthy VN, Fetz EE (1992) Coherent 25- to 35-Hz oscillations in the sensorimotor cortex of awake behaving monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:5670-5674.
- Murthy VN, Schikorski T, Stevens CF, Zhu Y (2001) Inactivity produces increases in neurotransmitter release and synapse size. *Neuron* 32:673-682.

N

- Nadler JV (2003) The recurrent mossy fiber pathway of the epileptic brain. *Neurochem Res* 28:1649-1658.
- Neher E (1992) Correction for liquid junction potentials in patch clamp experiments. *Methods Enzymol* 207:123-131.
- Nevian T, Larkum ME, Polsky A, Schiller J (2007) Properties of basal dendrites of layer 5 pyramidal neurons: a direct patch-clamp recording study. *Nat Neurosci* 10:206-214.
- Newman EA (2003) Glial cell inhibition of neurons by release of ATP. *J Neurosci* 23:1659-1666.
- Nicoll RA, Malenka RC (1995) Contrasting properties of two forms of long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 377:115-118.
- Nishimune A, Isaac JT, Molnar E, Noel J, Nash SR, Tagaya M, Collingridge GL, Nakanishi S, Henley JM (1998) NSF binding to GluR2 regulates synaptic transmission. *Neuron* 21:87-97.
- Nishiyama M, Hong K, Mikoshiba K, Poo MM, Kato K (2000) Calcium stores regulate the polarity and input specificity of synaptic modification. *Nature* 408:584-588.
- Nusser Z, Lujan R, Laube G, Roberts JD, Molnar E, Somogyi P (1998a) Cell type and pathway dependence of synaptic AMPA receptor number and variability in the hippocampus. *Neuron* 21:545-559.
- Nusser Z, Hajos N, Somogyi P, Mody I (1998b) Increased number of synaptic GABA(A) receptors underlies potentiation at hippocampal inhibitory synapses. *Nature* 395:172-177.

O

- O'Brien RJ, Kamboj S, Ehlers MD, Rosen KR, Fischbach GD, Huganir RL (1998) Activity-dependent modulation of synaptic AMPA receptor accumulation. *Neuron* 21:1067-1078.

- O'Dell TJ, Hawkins RD, Kandel ER, Arancio O (1991) Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:11285-11289.
- O'Dell TJ, Huang PL, Dawson TM, Dinerman JL, Snyder SH, Kandel ER, Fishman MC (1994) Endothelial NOS and the blockade of LTP by NOS inhibitors in mice lacking neuronal NOS. *Science* 265:542-546.
- Oliet SH, Malenka RC, Nicoll RA (1997) Two distinct forms of long-term depression coexist in CA1 hippocampal pyramidal cells. *Neuron* 18:969-982.
- Origlia N, Kuczewski N, Aztiria E, Gautam D, Wess J, Domenici L (2006) Muscarinic acetylcholine receptor knockout mice show distinct synaptic plasticity impairments in the visual cortex. *J Physiol* 577:829-840.
- Ouardouz M, Sastry BR (2000) Mechanisms underlying LTP of inhibitory synaptic transmission in the deep cerebellar nuclei. *J Neurophysiol* 84:1414-1421.

P

- Panatier A, Theodosis DT, Mothet JP, Touquet B, Pollegioni L, Poulain DA, Oliet SH (2006) Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory. *Cell* 125:775-784.
- 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.
- Paulsen O, Moser EI (1998) A model of hippocampal memory encoding and retrieval: GABAergic control of synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 21:273-278.
- Paulsen O, Sejnowski TJ (2000) Natural patterns of activity and long-term synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 10:172-179.
- Peters A, Kara DA (1985a) The neuronal composition of area 17 of rat visual cortex. I. The pyramidal cells. *J Comp Neurol* 234:218-241.
- Peters A, Kara DA (1985b) The neuronal composition of area 17 of rat visual cortex. II. The nonpyramidal cells. *J Comp Neurol* 234:242-263.
- Peters A, Sethares C (1997) The organization of double bouquet cells in monkey striate cortex. *J Neurocytol* 26:779-797.
- Petralia RS, Wenthold RJ (1992) Light and electron immunocytochemical localization of AMPA-selective glutamate receptors in the rat brain. *J Comp Neurol* 318:329-354.
- Petrini EM, Marchionni I, Zacchi P, Sieghart W, Cherubini E (2004) Clustering of extrasynaptic GABA(A) receptors modulates tonic inhibition in cultured hippocampal neurons. *J Biol Chem* 279:45833-45843.

- Philpot BD, Cho KK, Bear MF (2007) Obligatory Role of NR2A for Metaplasticity in Visual Cortex. *Neuron* 53:495-502.
- Pitler TA, Alger BE (1992) Postsynaptic spike firing reduces synaptic GABAA responses in hippocampal pyramidal cells. *J Neurosci* 12:4122-4132.
- Pitler TA, Alger BE (1994) Depolarization-induced suppression of GABAergic inhibition in rat hippocampal pyramidal cells: G protein involvement in a presynaptic mechanism. *Neuron* 13:1447-1455.
- Pittenger C, Kandel ER (2003) In search of general mechanisms for long-lasting plasticity: Aplysia and the hippocampus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358:757-763.
- Poo MM (2001) Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci* 2:24-32.
- Pouille F, Scanziani M (2001) Enforcement of temporal fidelity in pyramidal cells by somatic feed-forward inhibition. *Science* 293:1159-1163.
- Priestley T, Laughton P, Myers J, Le Bourdelles B, Kerby J, Whiting PJ (1995) Pharmacological properties of recombinant human N-methyl-D-aspartate receptors comprising NR1a/NR2A and NR1a/NR2B subunit assemblies expressed in permanently transfected mouse fibroblast cells. *Mol Pharmacol* 48:841-848.

R

- Rall W (1969) Time constants and electrotonic length of membrane cylinders and neurons. *Biophys J* 9:1483-1508.
- Rao A, Craig AM (1997) Activity regulates the synaptic localization of the NMDA receptor in hippocampal neurons. *Neuron* 19:801-812.
- Reyes A, Lujan R, Rozov A, Burnashev N, Somogyi P, Sakmann B (1998) Target-cell-specific facilitation and depression in neocortical circuits. *Nat Neurosci* 1:279-285.
- Ribary U, Ioannides AA, Singh KD, Hasson R, Bolton JP, Lado F, Mogilner A, Llinas R (1991) Magnetic field tomography of coherent thalamocortical 40-Hz oscillations in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:11037-11041.
- Rockland KS, Drash GW (1996) Collateralized divergent feedback connections that target multiple cortical areas. *J Comp Neurol* 373:529-548.
- Rockland KS (1998) Complex microstructures of sensory cortical connections. *Curr Opin Neurobiol* 8:545-551.
- Rubenstein JL, Merzenich MM (2003) Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems. *Genes Brain Behav* 2:255-267.
- Rumbaugh G, Vicini S (1999) Distinct synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in developing cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 19:10603-10610.

Rutherford LC, Nelson SB, Turrigiano GG (1998) BDNF has opposite effects on the quantal amplitude of pyramidal neuron and interneuron excitatory synapses. *Neuron* 21:521-530.

S

Sabatini BL, Svoboda K (2000) Analysis of calcium channels in single spines using optical fluctuation analysis. *Nature* 408:589-593.

Sakurai Y (1996) Population coding by cell assemblies--what it really is in the brain. *Neurosci Res* 26:1-16.

Salter MW, Kalia LV (2004) Src kinases: a hub for NMDA receptor regulation. *Nat Rev Neurosci* 5:317-328.

Sanchez-Vives MV, McCormick DA (2000) Cellular and network mechanisms of rhythmic recurrent activity in neocortex. *Nat Neurosci* 3:1027-1034.

Sanes JR, Lichtman JW (1999) Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annu Rev Neurosci* 22:389-442.

Sasaki YF, Rothe T, Premkumar LS, Das S, Cui J, Talantova MV, Wong HK, Gong X, Chan SF, Zhang D, Nakanishi N, Sucher NJ, Lipton SA (2002) Characterization and comparison of the NR3A subunit of the NMDA receptor in recombinant systems and primary cortical neurons. *J Neurophysiol* 87:2052-2063.

Scharfman HE, Sollas AL, Berger RE, Goodman JH (2003) Electrophysiological evidence of monosynaptic excitatory transmission between granule cells after seizure-induced mossy fiber sprouting. *J Neurophysiol* 90:2536-2547.

Schell MJ, Molliver ME, Snyder SH (1995) D-serine, an endogenous synaptic modulator: localization to astrocytes and glutamate-stimulated release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:3948-3952.

Schillen TB, Konig P (1994) Binding by temporal structure in multiple feature domains of an oscillatory neuronal network. *Biol Cybern* 70:397-405.

Schiller J, Schiller Y, Stuart G, Sakmann B (1997) Calcium action potentials restricted to distal apical dendrites of rat neocortical pyramidal neurons. *J Physiol* 505 (Pt 3):605-616.

Schiller J, Schiller Y, Clapham DE (1998) NMDA receptors amplify calcium influx into dendritic spines during associative pre- and postsynaptic activation. *Nat Neurosci* 1:114-118.

Schnell E, Sizemore M, Karimzadegan S, Chen L, Brecht DS, Nicoll RA (2002) Direct interactions between PSD-95 and stargazin control synaptic AMPA receptor number. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:13902-13907.

- Schuman EM, Madison DV (1991) A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. *Science* 254:1503-1506.
- Schwindt PC, Crill WE (1997) Local and propagated dendritic action potentials evoked by glutamate iontophoresis on rat neocortical pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 77:2466-2483.
- Shadlen MN, Newsome WT (1998) The variable discharge of cortical neurons: implications for connectivity, computation, and information coding. *J Neurosci* 18:3870-3896.
- Sheng M (2001) Molecular organization of the postsynaptic specialization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:7058-7061.
- Sheng M, Kim MJ (2002) Postsynaptic signaling and plasticity mechanisms. *Science* 298:776-780.
- Sheng M, Hyung Lee S (2003) AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity: major unanswered questions. *Neurosci Res* 46:127-134.
- Shew T, Yip S, Sastry BR (2000) Mechanisms involved in tetanus-induced potentiation of fast IPSCs in rat hippocampal CA1 neurons. *J Neurophysiol* 83:3388-3401.
- Shi S, Hayashi Y, Esteban JA, Malinow R (2001) Subunit-specific rules governing AMPA receptor trafficking to synapses in hippocampal pyramidal neurons. *Cell* 105:331-343.
- Shu Y, Hasenstaub A, McCormick DA (2003) Turning on and off recurrent balanced cortical activity. *Nature* 423:288-293.
- Siapas AG, Wilson MA (1998) Coordinated interactions between hippocampal ripples and cortical spindles during slow-wave sleep. *Neuron* 21:1123-1128.
- Silberberg G, Grillner S, LeBeau FE, Maex R, Markram H (2005) Synaptic pathways in neural microcircuits. *Trends Neurosci* 28:541-551.
- Silva AJ, Kogan JH, Frankland PW, Kida S (1998) CREB and memory. *Annu Rev Neurosci* 21:127-148.
- Singer W (1993) Synchronization of cortical activity and its putative role in information processing and learning. *Annu Rev Physiol* 55:349-374.
- Singer HS, Minzer K (2003) Neurobiology of Tourette's syndrome: concepts of neuroanatomic localization and neurochemical abnormalities. *Brain Dev* 25 Suppl 1:S70-84.
- Sjostrom PJ, Turrigiano GG, Nelson SB (2001) Rate, timing, and cooperativity jointly determine cortical synaptic plasticity. *Neuron* 32:1149-1164.
- Sloviter RS (1987) Decreased hippocampal inhibition and a selective loss of interneurons in experimental epilepsy. *Science* 235:73-76.
- Snyder SH, Jaffrey SR, Zakhary R (1998) Nitric oxide and carbon monoxide: parallel roles as neural messengers. *Brain Res Brain Res Rev* 26:167-175.

- Snyder SH, Kim PM (2000) D-amino acids as putative neurotransmitters: focus on D-serine. *Neurochem Res* 25:553-560.
- Soderling TR, Derkach VA (2000) Postsynaptic protein phosphorylation and LTP. *Trends Neurosci* 23:75-80.
- Somogyi P, Tamas G, Lujan R, Buhl EH (1998) Salient features of synaptic organisation in the cerebral cortex. *Brain Res Brain Res Rev* 26:113-135.
- Son H, Hawkins RD, Martin K, Kiebler M, Huang PL, Fishman MC, Kandel ER (1996) Long-term potentiation is reduced in mice that are doubly mutant in endothelial and neuronal nitric oxide synthase. *Cell* 87:1015-1023.
- Song I, Kamboj S, Xia J, Dong H, Liao D, Huganir RL (1998) Interaction of the N-ethylmaleimide-sensitive factor with AMPA receptors. *Neuron* 21:393-400.
- Song I, Huganir RL (2002) Regulation of AMPA receptors during synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 25:578-588.
- Sperk G, Schwarzer C, Tsunashima K, Fuchs K, Sieghart W (1997) GABA(A) receptor subunits in the rat hippocampus I: immunocytochemical distribution of 13 subunits. *Neuroscience* 80:987-1000.
- Spruston N, Jaffe DB, Johnston D (1994) Dendritic attenuation of synaptic potentials and currents: the role of passive membrane properties. *Trends Neurosci* 17:161-166.
- Spruston N, Schiller Y, Stuart G, Sakmann B (1995) Activity-dependent action potential invasion and calcium influx into hippocampal CA1 dendrites. *Science* 268:297-300.
- Steele PM, Mauk MD (1999) Inhibitory control of LTP and LTD: stability of synapse strength. *J Neurophysiol* 81:1559-1566.
- Stelzer A, Slater NT, ten Bruggencate G (1987) Activation of NMDA receptors blocks GABAergic inhibition in an in vitro model of epilepsy. *Nature* 326:698-701.
- Stelzer A, Simon G, Kovacs G, Rai R (1994) Synaptic disinhibition during maintenance of long-term potentiation in the CA1 hippocampal subfield. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:3058-3062.
- Steriade M, Oakson G, Kitsikis A (1978) Firing rates and patterns of output and nonoutput cells in cortical areas 5 and 7 of cat during the sleep-waking cycle. *Exp Neurol* 60:443-468.
- Steriade M, Dossi RC, Nunez A (1991a) Network modulation of a slow intrinsic oscillation of cat thalamocortical neurons implicated in sleep delta waves: cortically induced synchronization and brainstem cholinergic suppression. *J Neurosci* 11:3200-3217.
- Steriade M, Dossi RC, Pare D, Oakson G (1991b) Fast oscillations (20-40 Hz) in thalamocortical systems and their potentiation by mesopontine cholinergic nuclei in the cat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:4396-4400.
- Steriade M, McCormick DA, Sejnowski TJ (1993) Thalamocortical oscillations in the sleeping and aroused brain. *Science* 262:679-685.

- Steriade M, Amzica F (1996) Intracortical and corticothalamic coherency of fast spontaneous oscillations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:2533-2538.
- Steriade M, Amzica F, Contreras D (1996) Synchronization of fast (30-40 Hz) spontaneous cortical rhythms during brain activation. *J Neurosci* 16:392-417.
- Steriade M (2001) Active neocortical processes during quiescent sleep. *Arch Ital Biol* 139:37-51.
- Stuart GJ, Sakmann B (1994) Active propagation of somatic action potentials into neocortical pyramidal cell dendrites. *Nature* 367:69-72.
- Stuart G, Schiller J, Sakmann B (1997) Action potential initiation and propagation in rat neocortical pyramidal neurons. *J Physiol* 505 (Pt 3):617-632.
- Sucher NJ, Akbarian S, Chi CL, Leclerc CL, Awobuluyi M, Deitcher DL, Wu MK, Yuan JP, Jones EG, Lipton SA (1995) Developmental and regional expression pattern of a novel NMDA receptor-like subunit (NMDAR-L) in the rodent brain. *J Neurosci* 15:6509-6520.
- Sudhof TC (2001) The synaptic cleft and synaptic cell adhesion. In *Synapses*, W.M.Cowan, T.C. Sudhof, and C.F. Stevens, eds. (Baltimore, MD: Johns Hopkins University Press), 275-313.
- Sweatt JD (2004) Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Neurobiol* 14:311-317.

T

- Takumi Y, Ramirez-Leon V, Laake P, Rinvik E, Ottersen OP (1999) Different modes of expression of AMPA and NMDA receptors in hippocampal synapses. *Nat Neurosci* 2:618-624.
- Tamas G, Buhl EH, Lorincz A, Somogyi P (2000) Proximally targeted GABAergic synapses and gap junctions synchronize cortical interneurons. *Nat Neurosci* 3:366-371.
- Tan AY, Zhang LI, Merzenich MM, Schreiner CE (2004) Tone-evoked excitatory and inhibitory synaptic conductances of primary auditory cortex neurons. *J Neurophysiol* 92:630-643.
- Tang YP, Shimizu E, Dube GR, Rampon C, Kerchner GA, Zhuo M, Liu G, Tsien JZ (1999) Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature* 401:63-69.
- Tarczy-Hornoch K, Martin KA, Jack JJ, Stratford KJ (1998) Synaptic interactions between smooth and spiny neurones in layer 4 of cat visual cortex in vitro. *J Physiol* 508 (Pt 2):351-363.
- Tarczy-Hornoch K, Martin KA, Stratford KJ, Jack JJ (1999) Intracortical excitation of spiny neurons in layer 4 of cat striate cortex in vitro. *Cereb Cortex* 9:833-843.

- Thomas GM, Huganir RL (2004) MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 5:173-183.
- Thomas CG, Miller AJ, Westbrook GL (2006) Synaptic and extrasynaptic NMDA receptor NR2 subunits in cultured hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 95:1727-1734.
- Thomson AM, West DC, Deuchars J (1995) Properties of single axon excitatory postsynaptic potentials elicited in spiny interneurons by action potentials in pyramidal neurons in slices of rat neocortex. *Neuroscience* 69:727-738.
- Thomson AM, West DC, Hahn J, Deuchars J (1996) Single axon IPSPs elicited in pyramidal cells by three classes of interneurons in slices of rat neocortex. *J Physiol* 496 (Pt 1):81-102.
- Thomson AM, Bannister AP (1998) Postsynaptic pyramidal target selection by descending layer III pyramidal axons: dual intracellular recordings and biocytin filling in slices of rat neocortex. *Neuroscience* 84:669-683.
- Thomson AM, Bannister AP (2003) Interlaminar connections in the neocortex. *Cereb Cortex* 13:5-14.
- Tongiorgi E, Ferrero F, Cattaneo A, Domenici L (2003) Dark-rearing decreases NR2A N-methyl-D-aspartate receptor subunit in all visual cortical layers. *Neuroscience* 119:1013-1022.
- Tovar KR, Westbrook GL (1999) The incorporation of NMDA receptors with a distinct subunit composition at nascent hippocampal synapses in vitro. *J Neurosci* 19:4180-4188.
- Toyoda H, Zhao MG, Zhuo M (2005) Roles of NMDA receptor NR2A and NR2B subtypes for long-term depression in the anterior cingulate cortex. *Eur J Neurosci* 22:485-494.
- Turrigiano GG, Leslie KR, Desai NS, Rutherford LC, Nelson SB (1998) Activity-dependent scaling of quantal amplitude in neocortical neurons. *Nature* 391:892-896.
- Turrigiano GG (1999) Homeostatic plasticity in neuronal networks: the more things change, the more they stay the same. *Trends Neurosci* 22:221-227.
- Turrigiano GG, Nelson SB (2000) Hebb and homeostasis in neuronal plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 10:358-364.
- Turrigiano GG, Nelson SB (2004) Homeostatic plasticity in the developing nervous system. *Nat Rev Neurosci* 5:97-107.

V

- van Dam EJ, Ruiten B, Kamal A, Ramakers GM, Gispen WH, de Graan PN (2002) N-methyl-D-aspartate-induced long-term depression is associated with a decrease in postsynaptic protein kinase C substrate phosphorylation in rat hippocampal slices. *Neurosci Lett* 320:129-132.

- van Vreeswijk C, Sompolinsky H (1998) Chaotic balanced state in a model of cortical circuits. *Neural Comput* 10:1321-1371.
- Volterra A, Meldolesi J (2005) Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci* 6:626-640.

W

- Wang XJ, Rinzel J (1993) Spindle rhythmicity in the reticularis thalami nucleus: synchronization among mutually inhibitory neurons. *Neuroscience* 53:899-904.
- Wang XJ, Buzsaki G (1996) Gamma oscillation by synaptic inhibition in a hippocampal interneuronal network model. *J Neurosci* 16:6402-6413.
- Wang JH, Stelzer A (1996) Shared calcium signaling pathways in the induction of long-term potentiation and synaptic disinhibition in CA1 pyramidal cell dendrites. *J Neurophysiol* 75:1687-1702.
- Wang XJ (2001) Synaptic reverberation underlying mnemonic persistent activity. *Trends Neurosci* 24:455-463.
- Wang Y, Gupta A, Toledo-Rodriguez M, Wu CZ, Markram H (2002) Anatomical, physiological, molecular and circuit properties of nest basket cells in the developing somatosensory cortex. *Cereb Cortex* 12:395-410.
- Wang LZ, Zhu XZ (2003) Spatiotemporal relationships among D-serine, serine racemase, and D-amino acid oxidase during mouse postnatal development. *Acta Pharmacol Sin* 24:965-974.
- Ward LM (2003) Synchronous neural oscillations and cognitive processes. *Trends Cogn Sci* 7:553-559.
- Wassef A, Baker J, Kochan LD (2003) GABA and schizophrenia: a review of basic science and clinical studies. *J Clin Psychopharmacol* 23:601-640.
- Watt AJ, van Rossum MC, MacLeod KM, Nelson SB, Turrigiano GG (2000) Activity coregulates quantal AMPA and NMDA currents at neocortical synapses. *Neuron* 26:659-670.
- Wehr M, Zador AM (2003) Balanced inhibition underlies tuning and sharpens spike timing in auditory cortex. *Nature* 426:442-446.
- Wei W, Zhang N, Peng Z, Houser CR, Mody I (2003) Perisynaptic localization of delta subunit-containing GABA(A) receptors and their activation by GABA spillover in the mouse dentate gyrus. *J Neurosci* 23:10650-10661.
- Weitlauf C, Honse Y, Auberson YP, Mishina M, Lovinger DM, Winder DG (2005) Activation of NR2A-containing NMDA receptors is not obligatory for NMDA receptor-dependent long-term potentiation. *J Neurosci* 25:8386-8390.

- Wespatat V, Tennigkeit F, Singer W (2004) Phase sensitivity of synaptic modifications in oscillating cells of rat visual cortex. *J Neurosci* 24:9067-9075.
- Whittington MA, Traub RD, Jefferys JG (1995) Synchronized oscillations in interneuron networks driven by metabotropic glutamate receptor activation. *Nature* 373:612-615.
- Wierenga CJ, Ibata K, Turrigiano GG (2005) Postsynaptic expression of homeostatic plasticity at neocortical synapses. *J Neurosci* 25:2895-2905.
- Wigstrom H, Gustafsson B, Huang YY, Abraham WC (1986) Hippocampal long-term potentiation is induced by pairing single afferent volleys with intracellularly injected depolarizing current pulses. *Acta Physiol Scand* 126:317-319.
- Williams JH, Errington ML, Lynch MA, Bliss TV (1989) Arachidonic acid induces a long-term activity-dependent enhancement of synaptic transmission in the hippocampus. *Nature* 341:739-742.
- Williams SR, Stuart GJ (1999) Mechanisms and consequences of action potential burst firing in rat neocortical pyramidal neurons. *J Physiol* 521 Pt 2:467-482.
- Wilson RI, Nicoll RA (2001) Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature* 410:588-592.
- Wolosker H, Sheth KN, Takahashi M, Mothet JP, Brady RO, Jr., Ferris CD, Snyder SH (1999) Purification of serine racemase: biosynthesis of the neuromodulator D-serine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:721-725.
- Wong RW, Setou M, Teng J, Takei Y, Hirokawa N (2002) Overexpression of motor protein KIF17 enhances spatial and working memory in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:14500-14505.
- Woodin MA, Ganguly K, Poo MM (2003) Coincident pre- and postsynaptic activity modifies GABAergic synapses by postsynaptic changes in Cl⁻ transporter activity. *Neuron* 39:807-820.

X

- Xiang Z, Huguenard JR, Prince DA (2002) Synaptic inhibition of pyramidal cells evoked by different interneuronal subtypes in layer v of rat visual cortex. *J Neurophysiol* 88:740-750.
- Xie Z, Yip S, Morishita W, Sastry BR (1995) Tetanus-induced potentiation of inhibitory postsynaptic potentials in hippocampal CA1 neurons. *Can J Physiol Pharmacol* 73:1706-1713.

Y

- Yang SN, Tang YG, Zucker RS (1999) Selective induction of LTP and LTD by postsynaptic $[Ca^{2+}]_i$ elevation. *J Neurophysiol* 81:781-787.
- Yasuda H, Barth AL, Stellwagen D, Malenka RC (2003) A developmental switch in the signaling cascades for LTP induction. *Nat Neurosci* 6:15-16.
- Ylinen A, Soltesz I, Bragin A, Penttonen M, Sik A, Buzsaki G (1995) Intracellular correlates of hippocampal theta rhythm in identified pyramidal cells, granule cells, and basket cells. *Hippocampus* 5:78-90.
- Yoshimura Y, Ohmura T, Komatsu Y (2003) Two forms of synaptic plasticity with distinct dependence on age, experience, and NMDA receptor subtype in rat visual cortex. *J Neurosci* 23:6557-6566.
- Yuste R, Denk W (1995) Dendritic spines as basic functional units of neuronal integration. *Nature* 375:682-684.
- Yuste R, Bonhoeffer T (2001) Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 24:1071-1089.

Z

- Zakharenko SS, Patterson SL, Dragatsis I, Zeitlin SO, Siegelbaum SA, Kandel ER, Morozov A (2003) Presynaptic BDNF required for a presynaptic but not postsynaptic component of LTP at hippocampal CA1-CA3 synapses. *Neuron* 39:975-990.
- Zhang LI, Tao HW, Holt CE, Harris WA, Poo M (1998a) A critical window for cooperation and competition among developing retinotectal synapses. *Nature* 395:37-44.
- Zhang Y, Perez Velazquez JL, Tian GF, Wu CP, Skinner FK, Carlen PL, Zhang L (1998b) Slow oscillations (≤ 1 Hz) mediated by GABAergic interneuronal networks in rat hippocampus. *J Neurosci* 18:9256-9268.
- Zhang LI, Tan AY, Schreiner CE, Merzenich MM (2003) Topography and synaptic shaping of direction selectivity in primary auditory cortex. *Nature* 424:201-205.
- Zhao MG, Toyoda H, Lee YS, Wu LJ, Ko SW, Zhang XH, Jia Y, Shum F, Xu H, Li BM, Kaang BK, Zhuo M (2005) Roles of NMDA NR2B subtype receptor in prefrontal long-term potentiation and contextual fear memory. *Neuron* 47:859-872.
- Zhu Y, Stornetta RL, Zhu JJ (2004) Chandelier cells control excessive cortical excitation: characteristics of whisker-evoked synaptic responses of layer 2/3 nonpyramidal and pyramidal neurons. *J Neurosci* 24:5101-5108.
- Zilberter Y, Kaiser KM, Sakmann B (1999) Dendritic GABA release depresses excitatory transmission between layer 2/3 pyramidal and bitufted neurons in rat neocortex. *Neuron* 24:979-988.

Zilberter Y (2000) Dendritic release of glutamate suppresses synaptic inhibition of pyramidal neurons in rat neocortex. *J Physiol* 528:489-496.

Zucker RS, Regehr WG (2002) Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol* 64:355-405.