

**UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES
DE LILLE**

Numéro d'ordre : 1806

THÈSE

présentée à l'Université de Lille I

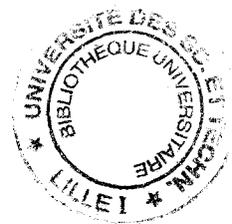
pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

option : Neurosciences

par

Isabelle MAYOLLE - NIESPODZIANY



**Etude *in vitro* des propriétés électriques membranaires
des neurones enképhalinerigiques du noyau magnocellulaire dorsal
de l'hypothalamus de cobaye,
caractérisation en "cellule entière"
du courant calcique I_T et du courant potassique I_A .**

Soutenue le 19 Septembre 1996, devant le Jury composé de :

Rapporteurs :	Madame C. Hammond
	Monsieur J.M. Israel
Examineurs :	Madame Y. Mounier
	Monsieur D. Margineanu
	Monsieur J.C. Beauvillain
	Monsieur P. Poulain

à Jacques,

à mes Parents,

à tous mes proches,

Par votre inestimable soutien, votre patience inébranlable et votre chaleureuse présence, vous m'avez permis de mener à bien toutes ces années d'études et de réaliser ce travail passionnant.

Je vous dois beaucoup.

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé sous la direction de Monsieur Pierre Poulain dans une unité de l'INSERM dirigée jusqu'en 1995 par Monsieur le Professeur Marc Mazzuca (Unité 156: Neuroendocrinologie Cellulaire) puis par Monsieur Jean-Claude Beauvillain (Unité 422: Neuroendocrinologie et Physiopathologie Neuronale).

Je tiens à remercier les membres du Jury :

Madame **Constance Hammond** et Monsieur **Jean-Marc Israel** qui m'ont fait l'honneur d'être les rapporteurs de ce travail. Ils ont consacré de leur temps, que je sais précieux, à sa critique et à son évaluation.

Madame le Professeur **Yvonne Mounier** et Monsieur **Doru Margineanu** pour leur présence en tant qu'examineurs. Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma reconnaissance pour avoir accepté cette charge supplémentaire..

Monsieur **Jean-Claude Beauvillain** qui a accepté de lire et de juger ce manuscrit. Qu'il soit assuré de ma gratitude pour sa gentillesse et son soutien durant l'élaboration de ce travail.

Monsieur **Pierre Poulain** qui m'a accueillie, guidée et conseillée tout au long de ces cinq dernières années. Je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance pour son encadrement scientifique et pour la confiance qu'il a bien voulu m'accorder.

Je remercie très sincèrement :

Monsieur le Professeur **Marc Mazzuca** qui a accepté, il y a cinq ans, de m'intégrer au sein de son laboratoire et qui m'a offert les moyens de réaliser ce travail.

Monsieur le Professeur **Pierre Guilbault** pour son enseignement de qualité et sa gentillesse. Son enthousiasme et le stage qu'il m'a permis d'effectuer dans son laboratoire de Physiologie Cellulaire lorsque j'étais en premier cycle à l'Université de Lille I ont éveillé puis déterminé mon intérêt pour la recherche et l'électrophysiologie. Je le remercie beaucoup pour ses encouragements et le soutien constant qu'il m'a offerts en toute occasion.

Monsieur **Bernard Carette** pour m'avoir initiée à la technique électrophysiologique sur tranche avec des microélectrodes fines. Je le remercie sincèrement pour sa gentillesse, sa disponibilité, son aide et ses conseils scientifiques avisés.

Monsieur **Philippe Derambure** avec qui la mise au point de la technique du *patch-clamp* sur tranche a été réalisée au laboratoire. Son amicale et généreuse collaboration, son enthousiasme et sa sympathie ont été pour moi un apport précieux.

Madame **Odile Viltart** pour sa sympathie et son aide considérable dans la mise en oeuvre des techniques histologiques.

Enfin, je voudrais exprimer mes chaleureux remerciements à :

- ~ Emmanuel Cazier pour sa participation à l'analyse informatique des enregistrements,
- ~ Geneviève Mortreux pour les mesures d'osmolarité,
- ~ Danièle Leroy et Soizic Dutoit pour leur aide généreuse lors de la finition des illustrations et de la correction de ce mémoire.
- ~ tous les membres de l'unité 422, collègues et amis dont la sympathie et la gentillesse ont facilité mon intégration dans l'unité et aussi avec lesquels j'ai passé de bons moments au laboratoire ou ailleurs.

SOMMAIRE

SOMMAIRE	p 2
ABRÉVIATIONS	p 9
LE NOYAU MAGNOCELLULAIRE DORSAL HYPOTHALAMIQUE	
Etat des connaissances - Objectifs	p 10
GÉNÉRALITÉS	p 15
I. sur les techniques électrophysiologiques intracellulaires et leurs supports expérimentaux.	
II. sur les canaux calciques dépendants du potentiel dans les neurones du système nerveux central.	
<u>I. Généralités sur les techniques électrophysiologiques intracellulaires et leurs supports expérimentaux</u>	p 15
1. Les supports expérimentaux des techniques électrophysiologiques intracellulaires	p 15
a. Les cellules isolées	p 15
<i>a1. Avantages</i>	p 16
<i>a2. Inconvénients</i>	p 16
b. Les cellules maintenues dans leur tissu d'origine	p 17
<i>b1. Avantages</i>	p 17
<i>b2. Inconvénients</i>	p 18
2. Les techniques électrophysiologiques intracellulaires	p 18
a. La technique d'enregistrement par empalement cellulaire	p 18
b. La technique du <i>patch-clamp</i>	p 19
<i>b1. Les différents types de configuration du patch-clamp</i>	p 19
<i>b2. Intérêts du patch-clamp en configuration "cellule entière"</i>	p 21
<i>α. Les avantages principaux</i>	p 21
<i>β. Les techniques de patch-clamp applicables à la tranche de cerveau</i>	p 21
<u>II. Les courants calciques dépendants du potentiel dans les neurones du système nerveux central</u>	p 22
1. La classification des canaux calciques dépendants du potentiel	p 23
2. Les canaux calciques haut-seuil dans les cellules nerveuses	p 25
a. Caractéristiques	p 25
b. Pharmacologie et rôles des canaux calciques haut-seuil	p 26
<i>b1. Canal de type L</i>	p 26
<i>b2. Canal de type N</i>	p 27
<i>b3. Canal de type P</i>	p 28
<i>b4. Canal de type Q</i>	p 28

b5. Canal de type R	p 29
3. Les canaux calciques bas-seuil dans les cellules nerveuses	p 29
a. Caractéristiques	p 29
b. Pharmacologie	p 30
c. Rôles du canal calcique bas-seuil	p 31
d. Localisation des canaux calciques bas-seuil dans les neurones des différentes régions du cerveau	p 32
e. Les canaux calciques bas-seuil dans les neurones hypothalamiques: localisation et caractéristiques	p 33
f. Activité oscillatoire provoquée par l'intervention des potentiels dépolarisants lents	p 35
g. Notions sur la distinction de plusieurs catégories de courants de type T	p 35
<u>III. Conclusions</u>	p 37
MATÉRIEL ET MÉTHODES	p 38
<u>I. Animaux</u>	p 38
<u>II. Anesthésie</u>	p 38
<u>III. Préparation des tranches épaisses d'hypothalamus</u>	p 39
<u>IV. Incubation des tranches d'hypothalamus</u>	p 39
<u>V. Description des différentes techniques d'enregistrement électrophysiologiques utilisées</u>	p 39
1. Technique du courant-imposé	p 40
2. Technique du potentiel-imposé	p 41
<u>VI. Techniques électrophysiologiques intracellulaires</u>	p 41
1. Préparation des microélectrodes d'enregistrement intracellulaire	p 41
2. Solutions de remplissage des microélectrodes intracellulaires	p 42
3. Solutions extracellulaires (milieux de perfusion)	p 43
4. Méthodes d'enregistrement intracellulaire	p 43
a. Matériel utilisé	p 43
b. Approche et empalement des neurones	p 44
<u>VII. Technique du patch-clamp en configuration "cellule entière" réalisée en aveugle sur tranche de cerveau</u>	p 45
1. Préparation des électrodes ou pipettes de patch-clamp	p 45
2. Solutions de remplissage des pipettes (solutions intrapipettes)	p 46
3. Solutions extracellulaires (milieux de perfusion)	p 48
4. Association des solutions intra et extracellulaires en fonction de l'étude réalisée	p 49
5. Méthodes d'enregistrement en patch-clamp en configuration "cellule entière"	p 50
a. Matériel utilisé	p 50
b. Approche, réalisation du contact étanche et rupture de la membrane neuronale	p 51
c. Mesure du potentiel de jonction	p 52
c1. Méthode expérimentale	p 53
c2. Méthode théorique mathématique	p 54

d. Enregistrements en potentiel-imposé	p 54
<i>d1. Paramétrage de l'amplificateur</i>	p 55
<i>d2. Procédés informatiques</i>	p 56
e. Enregistrements en courant-imposé	p 57
<u>VIII. Techniques d'identification neuroanatomique et de marquage intracellulaire</u>	p 57
1. Technique d'identification des neurones enregistrés en intracellulaire	p 57
a. Injection des marqueurs	p 57
<i>a1. Injection du traceur fluorescent dans le septum latéral</i>	p 58
<i>a2. Injection du marqueur intracellulaire dans les neurones enregistrés</i>	p 58
b. Techniques histologiques	p 59
<i>b1. Observation des sites d'injection dans le septum latéral</i>	p 59
<i>b2. Observation des cellules marquées par transport axonal rétrograde et des cellules injectées par la biocytine dans le NMD</i>	p 59
2. Technique d'identification des neurones enregistrés en <i>patch-clamp</i> , configuration "cellule entière"	p 60
a. Application du marqueur intracellulaire	p 60
b. Identification des neurones marqués	p 61

PREMIÈRE PARTIE

Propriétés électriques des neurones de la région du noyau magnocellulaire dorsal de l'hypothalamus de cobaye : étude en courant-imposé	p 62
---	------

INTRODUCTION	p 62
---------------------	------

RÉSULTATS	p 63
------------------	------

<u>I. Propriétés électrophysiologiques passives</u>	p 63
--	------

1. Le potentiel de repos	p 63
2. La constante de temps de membrane	p 63
3. La résistance membranaire	p 64

<u>II. Les rectifications membranaires "anormales" de sens entrant</u>	p 64
---	------

<u>III. Activité spontanée des neurones au potentiel de repos</u>	p 65
--	------

1. Neurones sans activité spontanée au PR	p 65
2. Neurones avec activité spontanée au PR	p 65

<u>IV. Classification électrophysiologique des neurones de la région du NMD par analyse de leurs propriétés dynamiques</u>	p 66
---	------

1. Les neurones de type I	p 66
a. Les neurones de type I avec bouffée de potentiels d'action (neurones aBPA)	p 66
<i>a1. Description du potentiel dépolarisant lent dans les neurones aBPA de type I</i>	p 67
<i>a2. Modulation pharmacologique du potentiel dépolarisant lent</i>	p 68
<i>α. Effet des bloqueurs des conductances calciques</i>	p 68

<i>β. Effet du TEA</i>	p 68
<i>δ. Effet du zinc (Zn²⁺)</i>	p 68
<i>a3. Les rectifications anormales</i>	p 68
b. Les neurones de type I sans bouffée de potentiels d'action (neurones sBPA)	p 69
2. Les neurones de type II	p 70
<u>IV. La rectification transitoire de sens sortant dans les 3 classes de neurones</u>	p 71
1. Description de la rectification transitoire	p 71
2. Effet de la 4-aminopyridine (4-AP)	p 71
3. Effet du Cobalt (Co ²⁺)	p 72
<u>V. L'identification des neurones par marquage intracellulaire et par transport axonal rétrograde</u>	p 72
1. Localisation des neurones marqués	p 72
2. Classement électrophysiologique des neurones marqués	p 74
DISCUSSION	p 75
<u>I. La caractéristique électrique principale observée dans les neurones de la région du NMD</u>	p 75
<u>II. Comparaison des propriétés électriques enregistrées en patch-clamp et avec la méthode intracellulaire classique</u>	p 76
1. La résistance membranaire	p 76
2. La constante de temps de membrane	p 76
3. Le potentiel de repos et l'amplitude du potentiel d'action	p 76
<u>III. Le potentiel dépolarisant lent dans les neurones de type I</u>	p 77
1. Description du potentiel dépolarisant lent dans les neurones aBPA	p 77
2. Description du potentiel dépolarisant lent dans les neurones sBPA	p 77
a. Comparaison avec l'activité électrique des neurones dopaminergiques	p 78
b. Similitude avec l'activité électrique des neurones appartenant à d'autres régions du cerveau	p 78
3. Différences existant entre les deux types de potentiels dépolarisants lents présents dans les neurones aBPA et dans les neurones sBPA	p 79
4. La rectification transitoire de sens sortant dans les neurones de type I	p 79
a. Description de la rectification transitoire de sens sortant	p 79
b. Interaction entre la rectification transitoire et le potentiel dépolarisant lent	p 80
<u>IV. Les neurones de type II</u>	p 80
1. Les caractéristiques des neurones de type II	p 80
2. Les hypothèses de l'absence des canaux calciques bas-seuil dans les neurones de type II	p 81
<u>V. Comparaison des propriétés générales des neurones des différentes classes</u>	p 81
1. Les propriétés membranaires et le potentiel d'action	p 81
2. Les post-hyperpolarisations et les rectifications anormales de sens entrant	p 81
3. L'hétérogénéité électrophysiologique des neurones de la région du NMD	p 82
<u>VI. Identification neuroanatomique des neurones enregistrés</u>	p 82

<u>VII. Comparaison des propriétés électriques des neurones de la région du NMD avec celles des neurones appartenant à des régions identiques ou proches chez le cobaye et chez le rat</u>	p 83
<u>VIII. Conclusion</u>	p 83

DEUXIÈME PARTIE

Le courant calcique bas-seuil et le courant potassique transitoire dans les neurones de la région du noyau magnocellulaire dorsal	p 85
--	------

INTRODUCTION	p 85
---------------------	------

RÉSULTATS	p 86
------------------	------

<u>A. LE COURANT CALCIQUE BAS-SEUIL DANS LES NEURONES DE LA REGION DU NOYAU MAGNOCELLULAIRE DORSAL: ETUDE BIOPHYSIQUE, CINETIQUE ET PHARMACOLOGIQUE</u>	p 86
--	------

<u>I. Observations préliminaires</u>	p 86
---	------

1. Relation entre la décharge neuronale observée en courant-imposé et les courants ioniques globaux activés dans les neurones aBPA et sBPA de type I et dans les neurones de type II.	p 86
---	------

a. Observations générales en courant-imposé	p 86
---	------

b. Observations générales en potentiel-imposé	p 87
---	------

2. Démonstration de la nature calcique du courant bas-seuil, transitoire et de sens entrant existant dans les neurones de type I	p 87
--	------

<u>II. Propriétés biophysiques et cinétiques du courant calcique bas-seuil</u>	p 88
---	------

1. Processus d'activation du courant calcique bas-seuil	p 89
---	------

a. Protocole expérimental d'activation du courant calcique bas-seuil	p 89
--	------

b. Mise en évidence de la dépendance au potentiel du processus d'activation du courant calcique bas-seuil	p 90
---	------

c. Evolution du temps de latence du pic de courant calcique bas-seuil en fonction du potentiel	p 90
--	------

2. Processus d'inactivation du courant calcique bas-seuil	p 91
---	------

a. Protocole expérimental d'inactivation du courant calcique bas-seuil	p 91
--	------

b. Mise en évidence de la dépendance au potentiel du processus d'inactivation du courant calcique bas-seuil	p 91
---	------

c. Analyse de la constante de temps de l'inactivation (τ_{inact}) du courant calcique bas-seuil en fonction du potentiel	p 92
---	------

d. Cinétique de restauration du courant calcique bas-seuil après inactivation des canaux	p 93
--	------

<u>III. Propriétés pharmacologiques du courant calcique bas-seuil</u>	p 93
--	------

1. Effet des bloqueurs calciques	p 94
----------------------------------	------

a. Effet du Co^{2+}	p 94
-----------------------	------

b. Effet du Ni ²⁺	p 94
c. Effet de l'amiloride	p 95
d. Effet de l'octanol	p 95
e. Effet de la nifédipine	p 96
f. Effet de la flunarizine	p 96
g. Effet du mibefradil (Ro 40-5967)	p 96
2. Effet de la substitution du Ba ²⁺ au Ca ²⁺	p 97

B. LE COURANT POTASSIQUE TRANSITOIRE DANS LES NEURONES DE LA REGION DU NOYAU MAGNOCELLULAIRE DORSAL : ETUDE BIOPHYSIQUE, CINETIQUE ET PHARMACOLOGIQUE

p 98

I. Propriétés biophysiques et cinétiques du courant potassique transitoire

p 98

1. Processus d'activation du courant potassique transitoire	p 98
a. Mesure du potentiel d'inversion du courant potassique transitoire	p 98
b. Protocole expérimental d'activation du courant potassique transitoire	p 99
c. Mise en évidence de la dépendance au potentiel du processus d'activation du courant potassique transitoire	p 100
d. Evolution du temps de latence du pic de courant potassique transitoire en fonction du potentiel	p 100
2. Processus d'inactivation du courant potassique transitoire	p 101
a. Protocole expérimental d'inactivation du courant potassique transitoire	p 101
b. Mise en évidence de la dépendance au potentiel du processus d'inactivation du courant potassique transitoire	p 101
c. Analyse de la constante de temps de l'inactivation (τ_{inact}) du courant potassique transitoire en fonction du potentiel	p 102
d. Cinétique de restauration du courant potassique transitoire après inactivation des canaux	p 103

II. Propriétés pharmacologiques du courant potassique transitoire

p 103

1. Effet de l'absence du Ca ²⁺ dans la solution extracellulaire sur le courant potassique transitoire	p 103
2. Effet des bloqueurs potassiques	p 104
a. Effet du TEA	p 104
b. Effet de la 4-AP	p 105
c. Effet de l' α -dendrotoxine	p 105
d. Effet du catéchol	p 105
3. Effet de la substitution du Ba ²⁺ au Ca ²⁺ extracellulaire	p 106
4. Effet du Zn ²⁺	p 106

III. Interaction entre le courant calcique et le courant potassique transitoire

p 107

DISCUSSION

p 109

I. Considérations méthodologiques

p 109

<u>II. Le courant calcique bas-seuil de type T</u>	p 110
1. Dépendance ionique du courant calcique de type T	p 111
2. Les propriétés biophysiques et cinétiques du courant calcique bas-seuil de type T	p 111
a. Intensité du courant calcique de type T dans les neurones de type I	p 111
b. Processus d'activation et d'inactivation du courant calcique de type T	p 112
3. Propriétés pharmacologiques du courant calcique de type T	p 114
4. Conclusion	p 117
<u>III. Le courant potassique transitoire de type A</u>	p 118
1. Rappel des caractéristiques principales des courants potassiques de type A	p 118
2. Dépendance ionique du courant potassique transitoire et effets du Ba ²⁺ sur ce courant	p 119
3. Les propriétés biophysiques et cinétiques du courant potassique transitoire de type A	p 120
a. Intensité du courant potassique transitoire de type A dans les deux types de neurones	p 120
b. Processus d'activation et d'inactivation du courant potassique de type A	p 120
4. Propriétés pharmacologiques du courant potassique de type A	p 122
5. Conclusion	p 124
<u>IV. Interaction entre le courant calcique de type T et le courant potassique de type A dans les neurones de type I</u>	p 124
1. Rôle du courant de type T dans la genèse des potentiels dépolarisants lents pour les neurones du NMD	p 124
2. Interaction entre les courants de type T et de type A	p 125
a. Analyse comparative	p 125
b. Rôle de l'interaction	p 126
3. Interaction entre le courant de type T et les autres conductances	p 127
4. Conclusion	p 128
 DISCUSSION GÉNÉRALE	 p 129
 BIBLIOGRAPHIE	 p 136
 RESUMÉ	 p 153

ABRÉVIATIONS

4-AP : 4-aminopyridine
aBPA : avec bouffée de potentiels d'action
cSEVC : potentiel-imposé en continu à électrode unique
DCC : courant-imposé en continu
DHP : 1,4-dihydropyridine
dSEVC : potentiel-imposé en discontinu à électrode unique
ITP : Intermediate-Threshold Plateau potentials
LCA : liquide cérébro-spinal artificiel
LHb : habénula latérale
LTS : Low Threshold Spike
LY : Lucifer-Yellow
NMD : noyau magnocellulaire dorsal
NPV : noyau paraventriculaire
nRT : neurones réticulaires thalamiques
PBS : tampon phosphate salin
PJ : potentiel de jonction
PLR : particules de latex marquées à la rhodamine
PR : potentiel de repos
Rmb : résistance membranaire
sBPA : sans bouffée de potentiels d'action
SLml : septum latéral médiolatéral
SOP : potentiel dépolarisant lent oscillant
TEA : tétraéthylammonium
 τ_{inact} : constante de temps de l'inactivation
tp : temps de latence du pic de courant
TTX : tétrodotoxine
VB : thalamus ventro-basal

LE NOYAU MAGNOCELLULAIRE DORSAL HYPOTHALAMIQUE

État des connaissances - Objectifs

Le noyau magnocellulaire dorsal hypothalamique (NMD) désigne une population de neurones occupant les aires hypothalamiques dorsale et latérale, qui a été décrite à l'origine chez le lapin (Wahren, 1957; Gerhard, 1966). Cette appellation a été reprise par Poulain (1974) pour nommer, chez le cobaye, un ensemble de neurones bien circonscrit, situé dorso-médialement par rapport aux colonnes du fornix et nettement séparé de la partie latérale du noyau paraventriculaire ou NPV (figure 1A). La même population neuronale a également été décrite par Bleier (1983) dans un atlas cytoarchitectonique de l'hypothalamus du cobaye, où elle a été dénommée noyau magnocellulaire dorso-latéral.

En 1981, Tramu *et al* ont démontré la présence d'enképhalines dans le NMD (figure 1B) et une étude menée à l'échelle ultrastructurale a confirmé l'hypothèse que les neurones de ce noyau synthétisaient la met-enképhaline (Beauvillain *et al*, 1982). Plus récemment, des études autoradiographiques ont démontré la présence d'ARNm de proenképhaline-A dans ces neurones (Mitchell *et al*, 1992), confirmant ainsi leur nature enképhalinergique.

Des études neuroanatomiques (Poulain, 1983; Staiger et Nürnberger, 1989) et électrophysiologiques (Poulain, 1986) ont montré, chez le cobaye, l'existence d'une projection bilatérale du NMD vers le septum latéral. Chez le même animal, d'autres études neuroanatomiques menées par Poulain *et al* (1984) ont confirmé la nature enképhalinergique de cette projection hypothalamo-septale.

Chez le rat, une population de neurones enképhalinergiques jouxtant le fornix a également été découverte (Hökfelt *et al*, 1977; Sar *et al*, 1978; Wamsley *et al*, 1980; Finley *et al*, 1981; Sakanaka *et al*, 1982; Krukoff et Calaresu, 1984; Merchenthaler *et al*, 1986). Toutefois, contrairement au cobaye, les neurones ne sont pas regroupés en noyau distinct. Des techniques neuroanatomiques et immunocytochimiques (Onténiente *et al*, 1989; Sakanaka et Magari, 1989) ont permis de démontrer également l'existence, chez le rat, d'une voie enképhalinergique hypothalamo-septale originaire de cette population neuronale magnocellulaire plus disséminée.

Chez le rat, les neurones du NMD synthétisent également l'hormone thyroïdienne (Merchenthaler, 1991). Les études immunocytochimiques approfondies réalisées au laboratoire chez le cobaye n'ont pas confirmé cette observation et il est vraisemblable que le tractus hypothalamo-septal originaire du NMD soit de nature exclusivement enképhalinergique dans cette espèce.

Figure 1. Microphotographies du NMD à partir de coupes frontales d'hypothalamus de cobaye.

A. Coloration à la thionine pour indiquer la position du noyau.

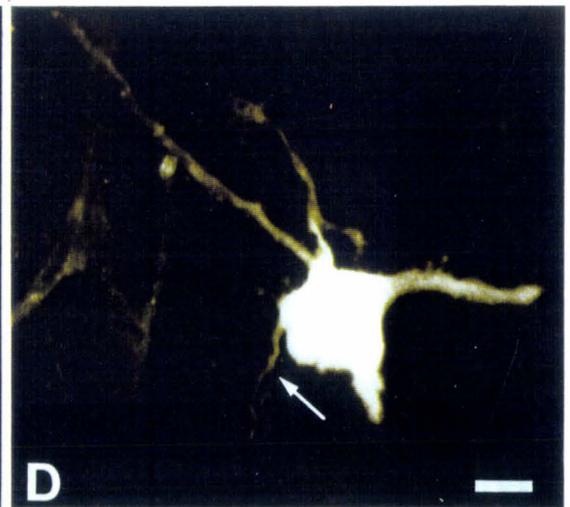
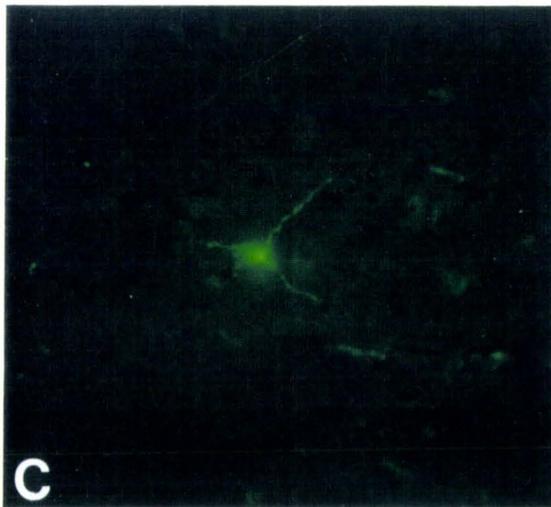
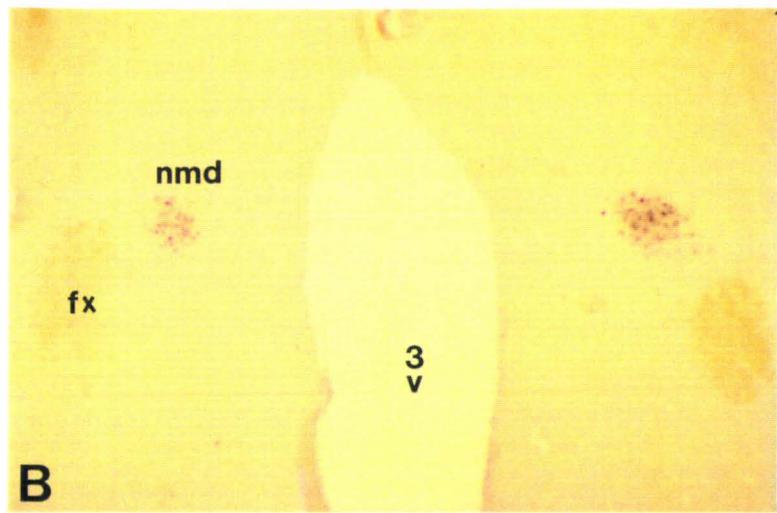
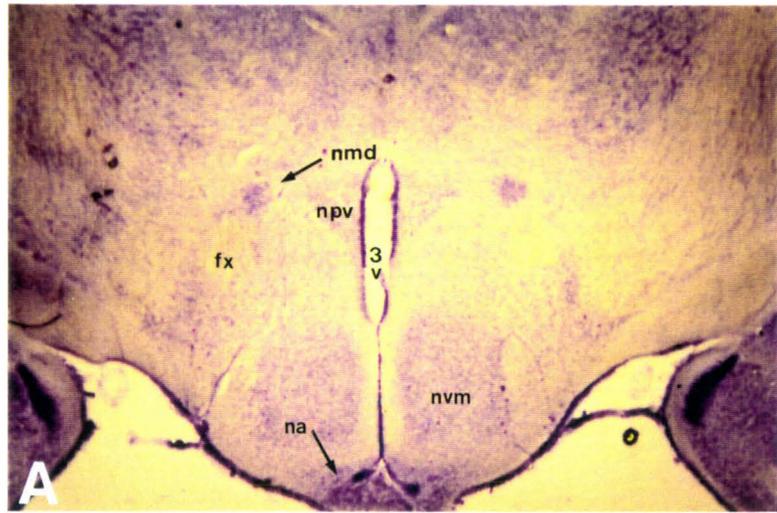
Abréviations: fx, fornix; na, noyau arqué; npv, noyau paraventriculaire; nvm, noyau ventromédian; 3V, troisième ventricule.

B. Réaction immunocytochimique avec un anticorps dirigé contre les enképhalines montrant la coloration des neurones du noyau.

C. Observation en microscopie de fluorescence d'une cellule du NMD remplie de Lucifer-Yellow après enregistrement en *patch-clamp*, configuration "cellule entière".

D. Observation au microscope confocal d'une autre cellule du NMD remplie de Lucifer-Yellow après enregistrement en *patch-clamp*, configuration "cellule entière". Le départ de l'axone est visible (flèche).

Barre d'échelle: 530 μ m pour A, 300 μ m pour B, 20 μ m pour C, 13 μ m pour D.



En résumé, le NMD est à l'origine d'un tractus enképhalinergique destiné au septum latéral chez le rat et le cobaye.

L'importance stratégique du tractus enképhalinergique repose sur le fait qu'il innerve préférentiellement la partie médio-latérale du septum latéral (SLml). Cette région du septum, définie par Jakab et Leranath (1990a), est caractérisée par la présence de neurones à épines somatiques, qui sont la cible privilégiée des afférences glutamatergiques en provenance des cornes d'Ammon de l'**hippocampe**. Les mêmes neurones reçoivent des afférences de nature diverse, ce qui témoigne de leur potentialité intégratrice (Leranath et Frotscher, 1989; Jakab et Leranath, 1990b, 1991, 1993; Jakab *et al*, 1991). Cependant, l'énorme quantité de terminaisons enképhalinergiques, qui s'arrangent de manière particulière en paniers péricellulaires autour des neurones du SLml (Beauvillain *et al*, 1983; Stengaard-Pedersen et Larsson, 1983), laisse supposer l'importance prépondérante du contrôle que peut exercer le tractus enképhalinergique sur le fonctionnement des neurones du SLml.

Les afférences du SLml ont été récemment ré-évaluées (Varoqueaux, 1995; Jakab et Leranath, 1995). Il est apparu que l'**hypothalamus** représentait la principale afférence du SLml. En particulier, il a été montré que les axones provenant du SLml contactaient les corps cellulaires des populations neuroendocrines de l'hypothalamus, représentées par les neurones magnocellulaires se projetant vers la posthypophyse et les neurones antéhypophysiotropes se projetant vers l'éminence médiane (Staiger et Nürnberger, 1991; Varoqueaux et Poulain, 1994).

En résumé, le tractus enképhalinergique issu du NMD est en position privilégiée pour intervenir sur la transmission des messages qui transitent de l'hippocampe à l'hypothalamus, via le SLml.

L'axe hippocampo-septo-hypothalamique est impliqué dans un éventail de processus physiologiques et comportementaux à l'interface entre le système neuroendocrine et le système autonome. Est établie sa participation au contrôle des sécrétions d'ocytocine, d'hormone de croissance, de prolactine, d'hormone corticotrope et d'hormone lutéinisante (revue dans Staiger et Nürnberger, 1989; Jakab et Leranath, 1995). Son rôle principal sera d'imposer une composante émotionnelle aux mécanismes neuroendocrines (rôle "psychoneuroendocrine", abondamment argumenté par les travaux de l'équipe de Nance, 1983). Etant donné le nombre et l'importance des fonctions attribuées à l'axe hippocampo-septo-hypothalamique, il est clair que le rôle du tractus enképhalinergique ne peut pas être limité à une fonction physiologique bien précise. Des

éclaircissements sur ses fonctions peuvent être apportés par l'analyse du rôle joué par les enképhalines dans le SLml. Il a été montré que des injections intraseptales d'enképhaline et de naloxone avaient des effets opposés sur la libération de l'hormone lutéinisante, de l'hormone de croissance et de la prolactine. En effet, l'enképhaline augmente leur libération tandis que la naloxone la réduit (Halasz *et al*, 1989). Le SLml intervient dans l'inhibition par les opioïdes de la libération centrale d'ocytocine (Neumannn *et al*, 1991). Le SLml est associé au rôle joué par la met-enképhaline dans les comportements alimentaire et dipsique ainsi que sur la prise de poids (Olson *et al*, 1986). Enfin, le SLml est associé au rôle joué par la met-enképhaline dans les interactions entre système neuroendocrine et système immunitaire (Olson *et al*, 1986).

En résumé, l'action des enképhalines libérées dans le SLml par les neurones du NMD est importante pour le contrôle de nombreuses fonctions physiologiques, en premier lieu les fonctions neuroendocrines.

D'un point de vue fonctionnel, la projection hippocampique qui atteint le SLml est excitatrice, vue sa nature glutamatergique. Comme les neurones du SLml sont sensibles aux actions inhibitrices des enképhalines chez le cobaye *in vivo* (Carette et Poulain, 1982), l'activation des neurones du NMD pourra se traduire par un freinage de la transmission des influences excitatrices de l'hippocampe vers l'hypothalamus.

Selon Jakab et Leranth (1995), la projection du SLml vers l'hypothalamus est assurée par des neurones GABAergiques. Cette projection pourrait être responsable en partie de l'influence inhibitrice qui s'imprime à tout l'axe neuroendocrine et qui se matérialise par l'abondance des terminaisons GABAergiques trouvées au contact des éléments neuroendocrines de l'hypothalamus (Wuarin et Dudek, 1994). En accord avec la découverte d'une projection directe du SLml sur les neurones à gonadolibérine (Varoqueaux *et al*, 1995), cela pourrait expliquer le rôle inhibiteur joué par l'hippocampe sur l'ovulation (Velasco et Taleisnik, 1969). Les neurones GABAergiques du SLml sont richement innervés par les fibres enképhalinergiques issues du NMD (Beauvillain *et al*, 1991). En conséquence, l'activation des neurones du NMD pourrait se traduire par une "désinhibition" des éléments neuroendocrines contactés par la projection GABAergique originaire du SLml.

En résumé, l'information inhibitrice transmise par les neurones du NMD sera essentielle pour déterminer la nature de l'influence qu'exerce la projection hippocampo-septale sur les fonctions hypothalamiques

L'**information inhibitrice** transmise par les neurones du NMD dépendra, d'une part, des *informations synaptiques* qu'ils reçoivent et, d'autre part, de leurs *propriétés intrinsèques*.

Parmi les terminaisons synaptiques observées au contact des corps cellulaires des neurones du NMD, 40% sont GABAergiques (Beauvillain *et al*, 1991). Les neurones sont également innervés par des fibres catécholaminergiques (Mitchell *et al*, 1988). Enfin, ils montrent la présence simultanée d'une innervation par des fibres à somatostatine et des sites de liaison pour le même neuropeptide (Pillez *et al*, 1994). Ces afférences contribueront à déterminer le niveau d'activité du neurone enképhalinergique.

Les propriétés intrinsèques du neurone jouent un rôle essentiel dans l'intégration de l'information synaptique (Llinás, 1988; Connors et Gutnick, 1990). En effet, les conductances membranaires co-agissent en réponse aux sollicitations synaptiques pour composer le message en potentiels d'action qui sera transmis aux neurones effecteurs. Elles déterminent donc la configuration de décharge du neurone et par conséquent ses propriétés de transfert de l'information.

En conclusion, la recherche de la nature des conductances membranaires qui sont à la base du type de décharge des neurones du NMD est une étape essentielle pour élucider les mécanismes qui impliquent ces neurones dans le contrôle de l'axe hippocampo-septo-hypothalamique.

Le premier objectif du présent travail était de **connaître les propriétés membranaires et le mode de décharge des neurones enképhalinergiques du NMD chez le cobaye**, en appliquant les techniques d'enregistrement par dérivation intracellulaire *in vitro*.

Le NMD représente chez le cobaye un exemple unique dans l'hypothalamus, hormis les neurones magnocellulaires se projetant vers la posthypophyse, d'une population compacte et homogène de neurones bien individualisés du point de vue de leur contenu peptidergique. Toutefois, des études utilisant les techniques d'imprégnation argentique et d'injection intracellulaire ont démontré l'existence d'une hétérogénéité morphologique dans le noyau (Doutrelant *et al*, 1992). Il était intéressant tout d'abord de déterminer s'il existait un profil électrophysiologique commun qui aurait pu qualifier le neurone enképhalinergique. Dans le cas contraire, il était indispensable de différencier les types cellulaires présents dans le NMD, pour apporter la preuve d'une hétérogénéité dans les propriétés électriques des neurones enképhalinergiques, pouvant se traduire par des capacités de transfert distinctes.

Préciser la nature des conductances qui sont à la base des propriétés intrinsèques de décharge des neurones a constitué un second objectif.

Le but était de déterminer quelles étaient les conductances critiques pour la configuration de décharge des neurone, en caractérisant leurs propriétés biophysiques, cinétiques et pharmacologiques. Lors des études consistant en l'injection intracellulaire des neurones du NMD (Doutrelant *et al*, 1992), il était apparu que certains neurones avaient la propriété de décharger sous la forme de brèves bouffées de potentiels d'action. Ce mode de décharge s'avère être représentatif de l'activité de nombreux neurones de l'hypothalamus et peut être relié à l'activation d'une conductance calcique bas-seuil de type T (Akaike, 1991). Aussi, une attention particulière a été portée à l'identification de cette conductance.

La caractérisation des conductances dont dépendent les propriétés de décharge du neurone répondait à un double objectif.

Le premier objectif était d'apporter des renseignements utiles pour mieux comprendre les mécanismes de leur participation et leur interaction dans la décharge du neurone et donc pour connaître leur signification dans le transfert de l'information qui transite par la voie enképhalinergique hypothalamo-septale.

Le second objectif était de réaliser une analyse standardisée de ces conductances dans la préparation choisie. En effet, la comparaison des données de la littérature concernant les conductances membranaires des neurones du système nerveux central est rendue très difficile par les différences dans les situations expérimentales, en particulier dans les supports expérimentaux choisis, la température et les milieux extracellulaires et intracellulaires utilisés. L'analyse standardisée des conductances constitue donc un prérequis pour toute étude électrophysiologique qui tendrait à évaluer à l'échelon cellulaire et moléculaire les actions des neuromédiateurs qui contrôlent l'activité des neurones du NMD et qui régulent en conséquence les fonctions attribuées à l'axe hippocampo-septo-hypothalamique.

GÉNÉRALITÉS

I.

**sur les techniques électrophysiologiques
intracellulaires et leurs supports expérimentaux.**

II.

**sur les canaux calciques dépendants du potentiel
dans les neurones du système nerveux central.**

I. Généralités sur les techniques électrophysiologiques intracellulaires et leurs supports expérimentaux

Ce sont les travaux de Hodgkin et Huxley (1952a,b), réalisés sur l'axone géant de calmar avec la technique du potentiel-imposé, qui ont permis la première détermination des deux principaux types de courants potassique (I_K) et sodique (I_{Na}) à l'origine du potentiel d'action. Depuis, des techniques électrophysiologiques de plus en plus compétitives évoluent de pair avec la nécessité d'une recherche active en physiologie cellulaire pour comprendre les mécanismes liés aux perméabilités ioniques membranaires assurées par les protéines transmembranaires formant des canaux ioniques. Le développement rapide des techniques électrophysiologiques, depuis l'apparition des techniques du *patch-clamp* en 1976, intéresse et fait progresser aussi bien la recherche scientifique fondamentale et appliquée que la médecine.

Différents supports expérimentaux peuvent être employés en vue de l'étude électrophysiologique intracellulaire d'une population cellulaire. Les modèles cellulaires sont généralement choisis en fonction du but recherché et selon les critères, parfois restrictifs, de faisabilité technique.

1. Les supports expérimentaux des techniques électrophysiologiques intracellulaires

Dans les années 70, de nombreuses études d'enregistrement intracellulaire ont été réalisées *in vivo*. Cependant, les nombreuses difficultés techniques rencontrées ont poussé à trouver des modèles expérimentaux *in vitro* telles que les cellules isolées et les cellules maintenues dans leur tissu d'origine.

a. Les cellules isolées

Les enregistrements électrophysiologiques peuvent être effectués sur des cellules isolées qui proviennent :

- ~ soit de cultures de cellules,
- ~ soit d'un tissu à partir duquel les cellules sont dissociées par traitements enzymatique et mécanique.

a1. Avantages

L'avantage principal d'une étude électrophysiologique intracellulaire sur cellule isolée est lié à la simplicité du support permettant une accessibilité directe à la cellule. Cette accessibilité permet une exécution optimale de la technique électrophysiologique et assure un rendement quantitatif de cellules enregistrées qui n'est pas négligeable. Il faut signaler que cette méthode nécessite un système optique performant pour permettre l'approche visuelle de la cellule par l'électrode d'enregistrement.

Le second avantage de la technique est lié à l'environnement de la cellule qui peut aisément être modifié en vue, par exemple, d'études pharmacologiques. Les cellules isolées peuvent alors être conservées dans un milieu de survie "neutre" et constituer une réserve permanente de cellules exploitables à tout moment par l'expérimentateur. Cet intérêt n'est pas négligeable si un taux de rendement appréciable est nécessaire pour l'étude envisagée.

a2. Inconvénients

~ problèmes liés aux neurones en culture:

- Les neurones cultivés acquièrent des extensions neuritiques formant des réseaux artificiels qui peuvent ne pas être représentatifs des réseaux neuronaux existant dans le cerveau.

- Les cultures de neurones nécessitent l'utilisation de tissus embryonnaires. Les cellules immatures issues de ces tissus peuvent ne pas avoir les mêmes caractéristiques électrophysiologiques que les cellules adultes. Ce problème n'est pas rencontré avec les neurones dissociés qui sont obtenus à partir de tissu adulte.

~ problèmes liés à la destruction des prolongements neuronaux lors des études réalisées à partir de neurones dissociés:

L'inconvénient majeur d'une étude électrophysiologique réalisée sur neurones dissociés est justement lié au critère d'isolement. Les neurones sont privés de leur contexte physiologique naturel environnant ainsi que de leurs prolongements dendritiques et axonaux. Les résultats de

leur exploitation électrophysiologique peuvent parfois difficilement être considérés comme représentatifs des modalités de fonctionnement du neurone intact au sein du tissu nerveux.

b. Les cellules maintenues dans leur tissu d'origine

Trois pratiques expérimentales peuvent être envisagées à partir d'un tissu vivant sous les formes:

1. de prélèvement direct de la région à étudier, sous forme d'explants qui représentent une partie intéressante de la structure (Bourque et Renaud, 1983), ou la structure entière (Llinás et Mühlethaler, 1988), maintenus en survie par perfusion des vaisseaux,
2. de tranches réalisées dans la région à étudier et maintenues en survie par perfusion dans un dispositif adapté (Schwartzkroin, 1981),
3. de tranches en culture organotypique (Gähwiler, 1981).

Du fait de l'expérience au laboratoire dans la préparation et le maintien en survie des tranches de cerveau, c'est cette solution qui a été adoptée pour l'étude du NMD.

b1. Avantages

Les avantages des études réalisées à partir de préparations de tranche de cerveau *in vitro* sont actuellement largement reconnues (Aitken *et al*, 1995; Collingridge, 1995; Edwards, 1995). L'accessibilité technique, la température du milieu de perfusion ainsi que le maintien relatif des connexions synaptiques au sein de la tranche autorisent l'exécution d'une large gamme d'expérimentations irréalisables sur l'animal *in vivo* ou sur des tissus en culture, et permettent la conservation de la plupart des caractéristiques physiologiques que présentent les cellules nerveuses adultes *in situ*.

Les techniques de préparation et notamment de maintien de la tranche cérébrale en survie ne sont pas des méthodes trop lourdes, c'est un argument supplémentaire pour orienter le choix vers ce type de préparation.

b2. Inconvénients

~ problème lié à l'épaisseur de la tranche:

L'utilisation de tranches épaisses comporte certains désagréments liés à l'impossibilité d'une observation directe des neurones. L'approche des neurones doit donc être réalisée "**en aveugle**" avec l'aide d'un oscilloscope pour contrôler l'incidence des manoeuvres d'approche exécutées de manière mécanique et électrique.

~ problème lié à la méthode du potentiel-imposé:

La technique électrophysiologique dite du potentiel-imposé, qui permet d'enregistrer les courants transmembranaires, rencontre une difficulté principale lorsque l'étude est réalisée à partir de tranche. En effet, dans l'intérêt de son exécution optimale, cette méthode nécessite certaines conditions auxquelles les prolongements neuronaux empêchent d'accéder. Aussi, l'imposition d'un potentiel ne peut pas être étendue à toute la surface du neurone comme elle pourrait l'être sans inconvénient sur un neurone dissocié qui est dénué de prolongements.

2. Les techniques électrophysiologiques intracellulaires

Il existe actuellement deux méthodes permettant de réaliser des enregistrements à l'échelon intracellulaire :

- ~ la technique par empalement cellulaire réalisée avec des microélectrodes de pointe très fine,
- ~ la technique du *patch-clamp* réalisée avec des électrodes ou pipettes de plus gros diamètre à la pointe.

a. La technique d'enregistrement par empalement cellulaire

Utilisée couramment au laboratoire sur des tranches de cerveau, cette méthode consiste à introduire une seule microélectrode dans le neurone.

Simple à mettre en oeuvre, elle fournit des enregistrements de bonne qualité avec la

technique du courant-imposé, qui permet d'enregistrer les fluctuations du potentiel de la membrane.

Elle est moins adaptée aux enregistrements en potentiel-imposé du fait de l'importance de la résistance à la pointe de l'électrode, qui a tendance à empêcher l'injection stable et prolongée du courant. En plus, lorsque la résistance d'électrode est trop élevée ($>30\text{M}\Omega$), l'application des sauts de potentiel ne peut pas être réalisée de manière assez rapide pour permettre un enregistrement fiable des courants qui s'activent rapidement.

Lorsqu'il s'agit de réaliser des injections intracellulaires en vue d'une localisation ultérieure du neurone enregistré, le diamètre de la pointe empêche la diffusion passive du marqueur contenu dans la microélectrode. Il est alors nécessaire d'appliquer des chocs stimulants à haute fréquence pour permettre l'éjection du marqueur, et ce traitement n'est pas sans conséquence sur la survie cellulaire.

Enfin, il n'existe pas de contact "étanche" entre la pointe de l'électrode et la membrane. C'est surtout pour cette raison que la technique du *patch-clamp* a été développée.

b. La technique du *patch-clamp*

Grâce à la technique du *patch-clamp*, il est possible d'enregistrer non seulement les courants macroscopiques existant à l'échelle d'une cellule entière mais aussi les courants ioniques unitaires, d'intensité de l'ordre du picoampère qui s'écoulent au travers de chaque canal pris individuellement. Cette technique d'étude a valu le prix Nobel de Médecine et de Physiologie en 1991 à ses inventeurs Erwin Neher et Bert Sakmann. Par définition, elle consiste tout d'abord à réaliser un contact de forte résistance entre la pipette d'enregistrement et la cellule, puis à extraire la pièce (*patch* en anglais) de membrane qui les sépare.

b1. Les différents types de configuration du patch-clamp

La technique du *patch-clamp* offre une gamme de configurations dont les approches sont décrites et schématisées dans la figure 2.

~ la configuration "cellule attachée"

Dans ce cas, le milieu intracellulaire est celui de la cellule. Le milieu extracellulaire du

Les différentes configurations d'enregistrement en patch-clamp

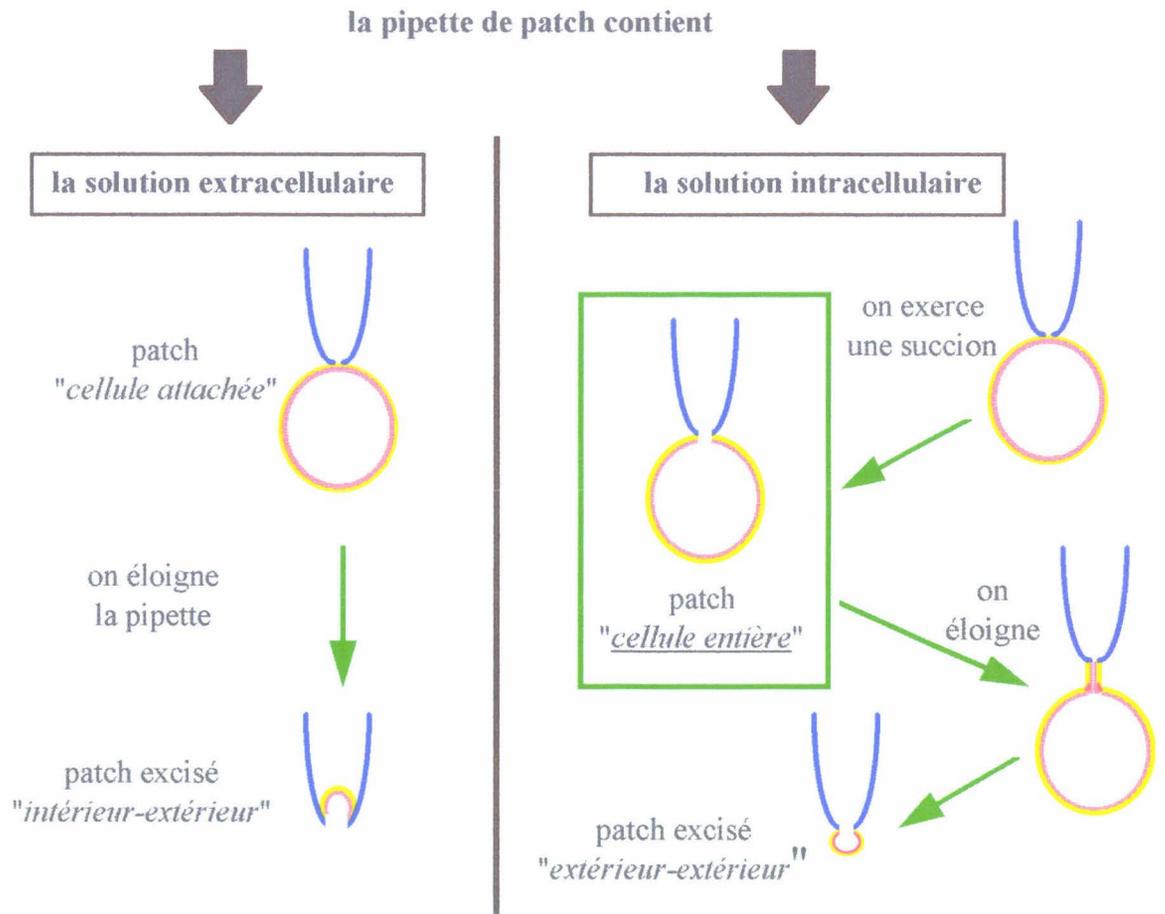


Figure 2

morceau de membrane enregistré est le milieu contenu dans la pipette. Cette configuration permet d'enregistrer le courant passant à travers le ou les canaux présents dans le morceau de membrane isolé électriquement du reste de la cellule. Si un canal est ouvert à la fois on enregistre alors le **courant élémentaire** traversant ce canal.

~ la configuration "cellule entière"

Cette configuration est obtenue à partir de la configuration "cellule attachée". Si on exerce une légère succion à l'intérieur de la pipette, celle-ci entraîne une déchirure du morceau de membrane sous la pipette. Dans ce cas, le milieu intracellulaire s'équilibre rapidement avec le milieu contenu dans la pipette. Cette configuration permet d'enregistrer le **courant macroscopique** traversant tous les canaux ouverts dans la membrane de la cellule.

Il existe également un autre mode de configuration qui permet de réaliser des enregistrements de type "cellule entière" sans provoquer la déchirure de la membrane et ainsi d'éviter la dialyse du milieu intracellulaire. Dans cette configuration dite "perforée", des pores se forment dans la membrane, alors que la cellule est en configuration "cellule attachée", car le milieu intrapipette est additionné d'un antibiotique tel que la nystatine (Horn et Marty, 1988).

~ le patch excisé

L'excision d'un morceau de membrane est réalisée lorsque l'enregistrement du courant unitaire traversant un canal veut être réalisé en contrôlant la composition du milieu intracellulaire. Il existe deux types de configuration en *patch excisé* :

- la configuration "*extérieur-extérieur*" (*outside-out* en anglais) utilisée pour tester l'effet de différents ions ou agents pharmacologiques dans le milieu extracellulaire.

- la configuration "*intérieur-extérieur*" (*inside-out* en anglais) utilisée pour tester l'effet de différents ions, seconds messagers et agents pharmacologiques dans le milieu intracellulaire.

Les études des courants unitaires permettent d'aborder les mécanismes moléculaires liés

aux canaux ioniques d'une population cellulaire. Ce type d'étude ne peut être logiquement nécessité qu'à partir du moment où l'étude macroscopique des cellules a déjà été réalisée.

b2. Intérêts du patch-clamp en configuration "cellule entière"

α. Les avantages principaux

Nous avons utilisé pour nos expériences la configuration "cellule entière" qui permet d'établir un contact électrique de faible résistance entre la pipette et la cellule. Cette propriété permet d'augmenter le rapport signal-bruit des enregistrements, ce qui convient parfaitement à l'enregistrement des courants de faible amplitude. D'autre part, les enregistrements en potentiel-imposé sont favorisés car ils nécessitent une faible résistance d'accès à la cellule pour permettre au potentiel membranaire d'atteindre rapidement et de manière stable la valeur choisie. C'est un avantage considérable lorsqu'il s'agit d'enregistrer des courants qui s'activent rapidement.

Le diamètre élevé de la pipette permet d'assurer un échange efficace entre le contenu de la pipette de *patch-clamp* et le milieu cytoplasmique. La configuration "cellule entière" permet ainsi la modification de la composition du milieu intracellulaire par l'application contrôlée de substances et de marqueurs fluorescents dans le milieu intrapipette, qui vont diffuser librement dans le contenu intracellulaire. Toutefois, il peut s'ensuivre une dialyse des substances cytoplasmiques qui modulent l'activité des canaux. Les études en *patch-clamp*, en configuration "cellule entière", sur des neurones dont les propriétés électrophysiologiques n'ont pas encore été identifiées doivent s'accompagner d'une étude comparative réalisée avec des microélectrodes fines. L'observation des événements membranaires avec les deux méthodes d'enregistrement permet de déterminer si la mise en contact du cytoplasme avec le milieu intrapipette est suivie de conséquences sur l'activité des neurones.

β. Les techniques de patch-clamp applicables à la tranche de cerveau

La technique du *patch-clamp* est totalement compatible avec l'utilisation de la tranche de tissu comme support expérimental. Deux sortes de tranches peuvent être utilisées avec la technique du *patch-clamp* :

1. les tranches fines, de 70 à 150 μ m d'épaisseur, cette limitation étant

nécessaire pour le maintien de la transparence de la tranche à la lumière car la technique nécessite l'observation des neurones (Edwards *et al*, 1989; Konnerth, 1990). La tranche est décapée en surface au moyen d'une pipette de nettoyage remplie de solution saline qui est éjectée au moyen d'une pression positive. Lorsque la surface du corps cellulaire est mise en évidence, une pression négative permet l'aspiration des débris résiduels dans la pipette. Ensuite, sous contrôle visuel, une pipette de *patch-clamp* est mise en contact avec le neurone.

2. les tranches épaisses, de 300 à 400 μ m d'épaisseur, qui sont utilisées selon la technique décrite par Blanton (1989). L'utilisation des tranches épaisses ne nécessite pas d'optique particulière puisque l'approche des neurones s'effectue "en aveugle", de la même manière que lors de l'utilisation des microélectrodes fines pour les enregistrements intracellulaires classiques. La pipette de *patch-clamp* est placée dans la tranche de cerveau et sa rencontre avec le corps cellulaire d'un neurone au sein de la tranche est effectuée au hasard. Ainsi, la méthode du *patch-clamp* sur tranche épaisse ne nécessite aucun autre matériel que celui de la technique d'enregistrement intracellulaire classique par empalement, elle permet en outre la comparaison des enregistrements obtenus avec ces deux méthodes. Elle permet surtout de travailler sur des neurones qui n'ont pas été soumis à la contrainte mécanique qui est nécessaire pour exposer leur surface mais qui modifie vraisemblablement leur densité en récepteurs et leur environnement synaptique.

II. Généralités sur les courants calciques dépendants du potentiel dans les neurones du système nerveux central

L'ion calcium (Ca^{2+}) est un second messager ubiquitaire et donc un régulateur de nombreuses fonctions métaboliques. Il joue un rôle fondamental dans les processus d'exocytose, d'électrogénèse, dans le couplage excitation-contraction et le couplage excitation-sécrétion (revues dans Bertolino et Llinás, 1992; Nargeot et Charnet, 1994) et en cas d'atteintes excitotoxiques, dans la mort neuronale (Mattson, 1992).

Dans le système nerveux, la concentration extracellulaire en Ca^{2+} est de l'ordre de 10^{-3}M alors que celle du milieu intracellulaire est inférieure à 10^{-7}M (Carbone et Lux, 1984a,b). Des augmentations temporaires de la concentration cytosolique du Ca^{2+} dans les neurones peuvent provenir d'un relargage de stocks présents dans la cellule (revue dans Kostyuk et Tepikin, 1991).

Mais, ce sont surtout les canaux ioniques qui représentent une voie d'entrée importante pour le Ca^{2+} dans le neurone. Les influx de Ca^{2+} empruntent soit des récepteurs-canaux, soit des canaux dépendants du potentiel. L'étude des propriétés de ces derniers a donné lieu à un nombre considérable de travaux. Cette étude est rendue difficile du fait de la coexistence de plusieurs types de canaux calciques dans le même neurone. Néanmoins, les différents types de canaux peuvent être distingués par leur pharmacologie spécifique et leurs propriétés biophysiques et cinétiques.

Au cours des dix dernières années, l'étude des mouvements calciques a connu un intérêt croissant et de nouveaux développements. En parallèle, l'étude des canaux calciques a beaucoup progressé grâce à la technique du *patch-clamp*.

1. La classification des canaux calciques dépendants du potentiel

De nombreuses études ont été réalisées sur les canaux calciques dépendants du potentiel dans des cellules nerveuses d'origines diverses. Sur ces cellules, il est apparu qu'il existait plusieurs types de canaux calciques. Carbone et Lux (1984a,b) ont montré que les canaux calciques dépendants du potentiel pouvaient être différenciés en fonction de la valeur de leur seuil d'activation. Dans les neurones sensoriels, ces auteurs ont distingués deux classes de canaux calciques: les canaux à bas seuil d'activation et les canaux à haut-seuil d'activation. Deux types de canaux calciques ont également été suggérés par les résultats d'expériences réalisées avec la technique de dialyse intracellulaire. Les deux types de canaux calciques diffèrent par leurs caractéristiques dépendantes du potentiel et le canal à haut-seuil est particulièrement sensible à la dialyse de la cellule qui provoque sa réduction. Toutefois, le courant calcique qui est réduit lorsque la cellule est dialysée avec une solution saline peut être restauré par une application intracellulaire de 3,5-AMPc, ATP et Mg^{2+} (Fedulova *et al*, 1985). Puis, un troisième type de canal calcique dépendant du potentiel a été découvert dans les neurones du ganglion dorsal de poulet et une nouvelle nomenclature a été introduite (Nowycky *et al*, 1985).

A l'heure actuelle, trois autres types de canaux ont été découverts et viennent s'ajouter à la nomenclature qui regroupe les deux grandes classes de canaux calciques. Ces classes sont essentiellement définies en fonction du processus d'activation du canal et distinguent :

- ◆ **les canaux à bas seuil d'activation.** Ils sont autrement nommés canaux "T" (pour signifier "transitoire").

Type	Nomenclature	Activation	Inactivation	Conductance
T	<i>Transitoire</i>	bas seuil (environ -70 mV)	rapide	8 pS
L	<i>Lent</i>	haut seuil (environ -20 mV)	lente	20-25 pS
N	<i>Neuronal</i>	haut seuil (environ -30 mV)	intermédiaire	10-20 pS
P	Purkinje	intermédiaire (environ -40 mV)	lente	10-12 pS
Q	Q après P	haut seuil (environ -30 mV)	intermédiaire	?

Tableau 1. Propriétés biophysiques des canaux calciques selon Nargeot et Charnet (1994)

Type	Dihydropyridine	ω -CTx-GVIA	ω -Aga-IVA	ω -CTx-MVHC	Ions divalents
T	+/-	-	-	-	Ni > Cd
L	++	+/-	-	-	Cd > Ni
N	-	++	-	+	Cd > Ni
P	-	-	++	+	?
Q	-	-	+/-	++	?

Ni : nickel ; *Cd* : cadmium.

Tableau 2. Pharmacologie des inhibiteurs des canaux calciques selon Nargeot et Charnet (1994)

◆ **les canaux à haut seuil d'activation** subdivisés en trois groupes majoritaires qui sont présentés dans l'ordre chronologique de leur découverte :

- ~ les canaux "L" (pour signifier "longue durée" ou "lent"),
- ~ les canaux "N" (pour signifier "ni le T ni le L" ou "neuronal"),
- ~ les canaux "P" (pour signifier "cellule de Purkinje").

L'existence de deux autres types de canaux haut-seuil appelés "Q" et "R" (lettres venant après P) a été suggérée récemment (Randall *et al*, 1993; Zhang *et al*, 1993; Wheeler *et al*, 1994, Birnbaumer *et al*, 1994).

Ces principaux types de canaux calciques dépendants du potentiel ont été décrits dans la plupart des cellules excitables (Tsien *et al*, 1988; pour revue voir Miller, 1987; Scott *et al*, 1991; Bertolino et Llinás, 1992; Hofmann *et al*, 1994, Nargeot et Charnet, 1994). Il faut noter qu'il existe d'autres types de courants calciques dépendants du potentiel dont les caractéristiques particulières n'ont pas permis de les rattacher à un groupe défini de la nomenclature (Yamada *et al*, 1993; Rothe et Grantyn, 1994; Forti *et al*, 1994).

La description des propriétés électriques et pharmacologiques des principaux types de canaux calciques dépendants du potentiel de la nomenclature est résumée dans les tableaux 1 et 2.

Tous les courants calciques sont abolis par les cations de type Mg^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} , Gd^{3+} et La^{3+} . Cependant des sélectivités marquées du Cd^{2+} et du Ni^{2+} à faibles concentrations et en applications brèves, ont été observées; le Cd^{2+} à $200\mu M$ abolit à 90% les courants calciques à haut-seuil et réduit uniquement de 20% le courant à bas-seuil (Bossu *et al*, 1985; Nowycky *et al*, 1985; revue dans Feltz, 1986). Inversement, le canal calcique bas-seuil est plus sensible au Ni^{2+} à faible concentration que ne le sont les canaux calciques haut-seuil (Fox *et al*, 1987a,b).

La distribution respective des différents types de canaux calciques dans les différents compartiments du neurone (soma et dendrites) est mal connue. Elle diffère fortement selon les neurones considérés. Classiquement, les canaux calciques à bas-seuil d'activation seraient présents surtout au niveau du corps cellulaire, tandis que les haut-seuil occuperaient majoritairement les dendrites. Plusieurs observations viennent toutefois contredire ce schéma, en suggérant l'existence des canaux calciques bas-seuil sur les dendrites apicales (Harris *et al*, 1989a; Karst *et al*, 1993).

2. Les canaux calciques haut-seuil dans les cellules nerveuses

a. Caractéristiques

De nombreuses études ont été réalisées sur les canaux calciques haut-seuil sur des préparations neuronales (revues dans Kostyuk, 1989; Miller, 1987; Scott *et al*, 1991; Bertolino et Llinás, 1992; Catterall, 1993; Hofmann *et al*, 1994; Nargeot et Charnet, 1994). Vu l'importance de la bibliographie concernant les canaux calciques haut-seuil, il n'est pas envisageable de présenter même de manière résumée toutes leurs caractéristiques. Nous exposerons ci-après les points principaux correspondant aux propriétés générales de ces canaux.

Dans les cellules nerveuses, les propriétés biophysiques des courants calciques haut-seuil ont été décrites la première fois par Nowycki *et al* (1985) dans les neurones du ganglion dorsal de poulet. Les canaux calciques haut-seuil s'activent lors de fortes dépolarisations avec un seuil d'activation moyen situé à -30mV environ et ils s'inactivent lentement.

L'importante caractéristique du canal de type L, premier canal calcique haut-seuil mis en évidence, est que lorsque la membrane est dépolarisée, l'ouverture du canal nécessite une phosphorylation (Armstrong et Eckert, 1985, 1987). La préservation de l'activité de ce canal lors d'études en *patch-clamp* nécessite donc l'addition d'agents phosphorylants dans le milieu intrapipette. La méthode du *patch* perforé permet également d'obtenir un enregistrement stable du courant de type L (Levitan et Kramer, 1990), car elle évite la dialyse des substances cytoplasmiques qui participent à la phosphorylation.

La structure protéique du canal de type L a été étudiée dans le muscle squelettique où ce canal est largement représenté (Catterall, 1988). Son affinité pour les 1,4-dihydropyridines (DHP) a permis l'isolement des protéines constituant ce canal, qui ont été retrouvées par la suite dans les autres types de canaux calciques haut-seuil (exceptée la sous-unité γ , spécifique du canal de type L du muscle squelettique). Le canal calcique haut-seuil est composé de cinq sous-unités peptidergiques qui sont :

- la sous-unité $\alpha 1$ (175kd) qui forme le pore ionique et qui contient le site de liaison spécifique aux DHP et aux phénylalkylamines,
- la sous-unité $\alpha 2$ (143kd) associée à $\alpha 1$,
- les sous-unités β (54kd), γ (30kd) et δ (27kd).

Les sous-unités $\alpha 1$ et β comprennent le site de phosphorylation de la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA).

Les canaux calciques haut-seuil se distinguent entre eux par leur pharmacologie respective identifiée avec les bloqueurs organiques des canaux calciques et certaines neurotoxines.

En 1985, le comité WHO (World Health Organization) a classé les antagonistes du Ca^{2+} en plusieurs types en accord avec leur sélectivité, leur spécificité sur un tissu et leur durée d'action. Les types I, II et III correspondent respectivement aux composés dérivés du vérapamil, à ceux des DHP et à ceux du diltiazem. Les bloqueurs moins sélectifs incluant la flunarizine (type IV) et deux autres types (V et VI) sont également inclus dans cette classification qui est particulièrement utile car elle est applicable cliniquement (Vanhoutte et Paoletti, 1987).

b. Pharmacologie et rôles des canaux calciques haut-seuil

Principalement, les canaux calciques haut-seuil interviennent dans l'électrogénèse des potentiels d'action calciques dans les dendrites (Llinás et Sugimori, 1980). Ils participent à l'électrogénèse des potentiels d'action somatiques (Castellano et López-Barneo, 1991). Ils permettent l'influx calcique nécessaire à la libération de neuromédiateurs aux extrémités axoniques et au niveau des dendrites (Hounsgaard *et al*, 1992).

Lors de la repolarisation des potentiels d'action, l'influx de Ca^{2+} permet d'activer des conductances potassiques sensibles au Ca^{2+} ou $I_{K(\text{Ca})}$ qui sont à l'origine des post-hyperpolarisations transitoires (revue dans Hammond et Tritsch, 1990).

Il est encore difficile de relier précisément un type de canal défini sur des critères pharmacologiques à une fonction définie du neurone. Examinons cependant brièvement les principales caractéristiques des différents types.

b1. Canal de type L

Les canaux de type L sont bloqués par les DHP comme la nifédipine, la nitrendipine et la nimodipine, par les phénylalkylamines dont le vérapamil et le D-600, et les benzothiazépines telles que le diltiazem (revue dans Catterall *et al*, 1988; Scott *et al*, 1991; Hofmann *et al*, 1994).

On attribue au canal de type L un rôle majeur dans les couplages excitation-contraction et excitation-sécrétion (revue dans Nargeot et Charnet, 1994).

Des anticorps monoclonaux reconnaissant les sous-unités du canal de type L du muscle

squelettique ont permis de révéler l'existence des canaux de type L dans un grand nombre de régions du système nerveux central comme l'hippocampe, le cortex cérébral, le cervelet, la moelle épinière et la rétine (Ahlijanian *et al*, 1990). Des études réalisées en imagerie microfluorométrique sur des tranches de cerveau ont localisé ces canaux sur les corps cellulaires et sur les dendrites proximales des neurones (Regehr *et al*, 1989). La large distribution des canaux de type L reflète les fonctions multiples de ce canal que ce soit à l'échelle du système nerveux central ou à celle d'un seul neurone.

L'approche pharmacologique du rôle des canaux de type L dans la transmission synaptique a donné des résultats contradictoires. Il semblerait que les DHP modulent la transmission synaptique dans certains systèmes incluant les neurones sympathiques et sensoriels (Perney *et al*, 1986) et les cellules granulaires du cervelet (Huston *et al*, 1990). Ces découvertes suggèrent un rôle des canaux de type L dans la transmission synaptique. Lemos et Nowycky (1989) ont montré que les canaux calciques de type L étaient présents dans les terminaisons nerveuses des cellules libérant des neurotransmetteurs et qu'ils étaient capables de contribuer au contrôle de leur libération.

D'autres études ont montré que la transmission synaptique n'est pas affectée par une variété de ligands incluant les DHP (Hirning *et al*, 1988; Seabrook et Adams, 1989). Cependant, l'absence d'effet des antagonistes dérivés des DHP n'indique pas nécessairement que les canaux de type L ne soient pas impliqués dans la transmission synaptique, car les antagonistes de type DHP ne sont efficaces que lorsque la membrane est dépolarisée (Rane *et al*, 1987).

Néanmoins, malgré ces observations, on reconnaît actuellement que les processus de libération des neurotransmetteurs impliquent davantage les canaux de type N que les canaux de type L dans la plupart des cellules nerveuses (revue dans Hofmann *et al*, 1994).

b2. Canal de type N

Les canaux de type N sont bloqués spécifiquement par l' ω -conotoxine-GVIA (ω -CTx-GVIA), toxine peptidique extraite de l'escargot marin *Comus geographus* (pour revue dans Sher et Clementi, 1991).

Les canaux calciques de type N sont distribués dans un grand nombre de neurones centraux et périphériques où ils sont notamment localisés au niveau présynaptique (revue dans Nargeot et Charnet, 1994; Westenbroek *et al*, 1992). Rappelons que le Ca^{2+} étant nécessaire à la libération des neurotransmetteurs, les canaux calciques dépendants du potentiel représentent la

voie idéale pour l'entrée du Ca^{2+} dans les terminaisons nerveuses pour déclencher ce processus. Il a ainsi été démontré que les canaux calciques de type N jouent un rôle dans certaines formes de libération des neurotransmetteurs (Miller, 1987), tout au moins dans les neurones sympathiques de rat (Hirning *et al*, 1988), dans le ganglion ciliaire chez le poulet (Stanley et Atrakchi, 1990) et dans l'hippocampe (Kamiya *et al*, 1988).

b3. Canal de type P

Les canaux de type P sont bloqués par la FTX (polyamine) et l' ω -agatoxine-IVA (ω -Aga-IVA, fraction peptidique) issues du venin de l'araignée *Agelenopsis aperta* et moins spécifiquement par la toxine extraite d'un autre escargot marin nommé *Conus magus*: l' ω -conotoxine-MVIIC (ω -CTx-MVIIC) (Mintz *et al*, 1992).

L'action de la FTX, l'antagoniste spécifique de cette conductance, a été initialement identifiée dans les cellules de Purkinje d'où la dénomination P de ce canal calcique (Llinás et Sugimori, 1987; Llinás *et al*, 1989). Les cellules de Purkinje du cervelet possèdent en majorité ce courant calcique haut-seuil, qui est insensible (~90%) aux DHP ou à l' ω -conotoxine-GVIA (Regan, 1991; Regan *et al*, 1991; Mogul et Fox, 1991).

Des canaux calciques ayant un profil cinétique et pharmacologique identique ont ensuite été identifiés dans une terminaison présynaptique de la synapse de l'axone géant de calmar (Llinás *et al*, 1989, 1992). Les canaux de type P ont enfin été mis en évidence dans des types cellulaires autres que la cellule de Purkinje (Llinás *et al*, 1989; Regan *et al*, 1991) où ils sont à l'origine de potentiels dépolarisants en plateau.

Des études immunohistochimiques ont montré que le canal type P était largement représenté dans le système nerveux central des mammifères (Hillman *et al*, 1991), où il semble participer non seulement à l'établissement de l'activité neuronale intrinsèque mais aussi à la modulation de l'intégration neuronale et à la libération des neurotransmetteurs tels que le glutamate (Mogul et Fox, 1991; Regan *et al*, 1991).

b4. Canal de type Q

Ce canal est apparenté au type P et il présente une sensibilité à l' ω -Aga IVA mais il est plus spécifiquement bloqué par l' ω -CTx-MVIIC.

Ce type de canal est retrouvé au niveau des cellules granulaires du cervelet et il serait

responsable en association avec les canaux de type N de la transmission synaptique entre les neurones du CA3 et du CA1 de l'hippocampe (Wheeler *et al*, 1994).

b5. Canal de type R

Le canal de type R serait à l'origine du courant résiduel observé dans les cellules granulaires du cervelet après blocage des autres canaux calciques par les DHP, l' ω -Aga-IVA, l' ω -CTx-GVIA et l' ω -CTx-MVIIC. Il est insensible aux DHP et aux neurotoxines. Son rôle reste inconnu.

3. Les canaux calciques bas-seuil dans les cellules nerveuses

a. Caractéristiques

Carbone *et al* (1984a,b, 1987a,b), Nowycky *et al* (1985) et Fox *et al* (1987a,b) ont caractérisé le canal de type T dans les neurones du ganglion dorsal chez le poulet et chez le rat en réalisant des analyses de courants ioniques macroscopiques et unitaires en *patch-clamp*.

Lorsque le potentiel membranaire est maintenu hyperpolarisé entre -60 et -100mV, les canaux calciques bas-seuil s'activent au cours d'une dépolarisation de faible amplitude, laissant passer un courant transitoire, d'où la dénomination T. En effet, ces canaux s'inactivent rapidement et l'inactivation devient maximale lorsque le potentiel de maintien est plus positif que -60mV. Lors d'une dépolarisation soutenue, le courant calcique global diminue avec le temps, ce phénomène est dû à l'inactivation des canaux calciques haut-seuil, provoquée par l'augmentation de la concentration cytosolique en Ca^{2+} . A une concentration intracellulaire de $10^{-6}M$, le courant calcique de type T reste toujours présent et peut alors être isolé des courants calciques haut-seuil.

La différence essentielle entre le courant calcique de type T et les courants calciques haut-seuil est sa stabilité métabolique. A l'inverse des courants calciques haut-seuil, le courant de type T demeure stable pendant l'enregistrement malgré la dialyse provoquée par la configuration "cellule entière" de la technique du *patch-clamp* (Fedulova *et al*, 1985; Carbone et Lux, 1987a; Fox *et al*, 1987a; Naharashi *et al*, 1987, Coulter *et al*, 1989; Ozawa *et al*, 1989, Berger et Takahashi, 1990; Fraser et MacVicar, 1991). Il persiste en présence de fluorure dans la pipette (Carbone et Lux, 1987a; Fraser et MacVicar, 1991; Takahashi *et al*, 1991, Herrington et Lingle, 1992) et de Ca^{2+} dans le milieu externe (Carbone et Lux, 1987a; Huguenard et Prince, 1992), sans

nécessiter la présence d'ATP ou de GTP dans le milieu intrapipette (Fedulova *et al*, 1985). La stabilité du courant de type T est également observée dans les configurations de "patch excisé" (Carbone et Lux, 1987b; Kostuyk *et al*, 1988).

A l'heure actuelle, la structure du canal calcique de type T n'a pas encore été déterminée, cette lacune est due en partie au fait qu'aucun ligand sélectif du canal n'a été découvert jusqu'à présent. Il faut tout de même signaler qu'une étude a reporté le clonage d'un canal calcique de type T à partir de cerveau de rat où il est désigné sous le nom de rbE-II (Soong *et al*, 1993).

b. Pharmacologie

Le courant calcique de type T est bloqué par certaines substances non organiques et la plupart du temps de manière non sélective. Plus rarement, il a été démontré que des substances organiques telles que des DHP, sélectives des canaux de type L, peuvent moduler le courant calcique bas-seuil. Jusqu'à présent, aucune toxine n'a permis la suppression du courant de type T de manière spécifique. Il faut également observer que la pharmacologie du courant calcique bas-seuil est variable en fonction des neurones étudiés. Les substances permettant de bloquer le courant de type T sont :

- ~ la **véatridine** (Romey et Lazdunski, 1982),
- ~ un **agoniste des DHP** comme le **Bay K 8644** (Boll et Lux, 1985),
- ~ les alcools de haut poids moléculaire comme l'**octanol** dans les neurones de l'olive inférieure (Llinás et Yarom, 1986a),
- ~ le **vérapamil** (Yaari *et al*, 1987, Tytgat *et al*, 1988),
- ~ la **phénytoïne** (Yaari *et al*, 1987),
- ~ des alcools cycliques comme le **menthol** (Swandulla *et al*, 1987),
- ~ l'**amiloride** (Tang *et al*, 1988),
- ~ des **antagonistes des DHP** comme la **nicardipine** (Kaneda *et al*, 1989; Kaneda et Akaike, 1989) ou la **nimodipine** (Formenti *et al*, 1993),
- ~ la **flunarizine** (Higashi *et al*, 1990),
- ~ l'**éthosuximide** (Kostyuk *et al*, 1992),
- ~ le dihydrochlorure de [(±)-1-(3,4-diméthoxyphényl)-2-(4-diphénylméthylpiperazinyl)éthanol (NC-1100) (Miyake *et al*, 1992),
- ~ la **tétrandrine** (Wang et Lemos, 1995).

Il faut aussi signaler qu'il existe un courant calcique bas-seuil sensible à l'action de la

tétradotoxine (TTX) décrit dans les neurones pyramidaux du CA1 de l'hippocampe (Takahashi *et al*, 1989; Akaike et Takahashi, 1992).

c. Rôles du canal calcique bas-seuil

• Le potentiel dépolarisant lent

Dans les neurones du système nerveux central, le courant calcique de type T a comme rôle principal de promouvoir l'apparition de potentiels dépolarisants lents de durée brève qui apparaissent spontanément lorsque la membrane est hyperpolarisée ou qui sont évoqués en rebond à la suite d'une hyperpolarisation transitoire. Suggérés à l'origine par Andersen *et al* (1964), ces potentiels dépolarisants lents ont été enregistrés chez le cobaye dans l'olive inférieure (Llinás et Yarom, 1981a,b) et dans le thalamus (Llinás et Jahnsen, 1982; Jahnsen et Llinás, 1984a,b) et ils ont été dénommés "Low-Threshold Spikes" en anglais ou LTS, car leur seuil d'activation était d'environ 15mV inférieur à celui des potentiels d'action sodiques. Comme l'amplitude des LTS dépasse le seuil d'activation des potentiels d'action, ils entraînent l'apparition d'une brève décharge répétitive de potentiels d'action. En conséquence, les cellules à LTS peuvent produire deux types d'activité: une décharge tonique répétitive de potentiels d'action et une décharge phasique caractérisée par de brèves bouffées de potentiels d'action apparaissant au sommet des LTS.

Le courant calcique de type T a été identifié comme étant à l'origine de la production des LTS (Carbone et Lux, 1984a,b; Nowycky *et al*, 1985). Cette conductance est contrôlée par de faibles variations du potentiel membranaire: elle est inactivée par une légère dépolarisation membranaire ou au contraire activée par une faible hyperpolarisation. Les potentiels dépolarisants lents seront donc sous l'étroite dépendance des signaux synaptiques et permettront une forme d'excitation "paradoxe" en réponse à une inhibition synaptique (Andersen *et al*, 1964).

• Les autres rôles du canal calcique bas-seuil

D'autres rôles ont été attribués aux conductances calciques de type T. Elles participent à la repolarisation du potentiel d'action dans le motoneurone, permettant par l'influx de Ca^{2+} d'activer les conductances potassiques nécessaires à cette repolarisation (Umemiya et Berger, 1994). Elles seraient impliquées dans la potentialisation à long terme (Komatsu et Iwakiri, 1992).

Enfin, elles contribuent aux influx de Ca^{2+} dans les dendrites apicales des cellules pyramidales du cortex au cours de la production des potentiels d'excitation postsynaptiques glutamatergiques (Markram et Sakmann, 1994).

Bien entendu, le canal de type T va promouvoir l'entrée de Ca^{2+} dans le neurone, mais il paraît improbable qu'il participe à la libération des neurotransmetteurs, tout au moins dans le thalamus (Pfrieger *et al*, 1992).

Une observation intéressante a été réalisée sur les neurones du ganglion dorsal qui présentent une conductance calcique bas-seuil dominante vis à vis de la conductance calcique haut-seuil de type L à l'état embryonnaire et postnatal. Cette situation s'inverse lorsque les neurones deviennent matures. Dans cette population cellulaire, les canaux calciques bas-seuil pourront participer directement, par des influx de Ca^{2+} , aux processus de maturation des neurones (Carbone et Lux, 1984a,b; Kostyuk *et al*, 1989a).

d. Localisation des canaux calciques bas-seuil dans les neurones des différentes régions du cerveau

Les canaux calciques de type T, à l'origine des LTS, ont été identifiés et analysés sur de nombreuses populations neuronales :

Chez le rat, dans: les neurones du CA3 de l'hippocampe (Wong et Prince, 1981), les neurones du septum latéral dorso-latéral (Stevens *et al*, 1984), les cellules de Purkinje du cervelet (Crépel et Penit-Soria, 1986; Kaneda *et al*, 1990), les neurones sensoriels (Bossu et Feltz, 1986; Schroeder *et al*, 1990), les neurones neocorticaux (Sutor et Zieglgänsberger, 1987), les neurones de l'amygdale (Kaneda et Akaike, 1989), les neurones des cornes dorsales (Huang, 1989), les neurones relais thalamo-corticaux (Coulter *et al*, 1989; Guyon *et al*, 1993), les interneurones hippocampiques (Fraser et McVicar, 1991), les neurones du CA1 de l'hippocampe (Akaike et Takahashi, 1992), les neurones cholinergiques du tronc cérébral (Kamondi *et al*, 1992), les neurones du noyau réticulaire thalamique, les neurones relais du thalamus et les neurones de l'habénula latérale (Huguenard et Prince, 1992; Huguenard *et al*, 1993), les neurones cholinergiques du télencéphale (Allen *et al*, 1993), les dendrites des neurones hippocampiques (Karst *et al*, 1993), les motoneurones de l'hypoglosse (Viana *et al*, 1993; Umemiya et Berger, 1994), les interneurones thalamiques (Pape *et al*, 1994).

Chez le cobaye, dans: les neurones du septum intermédiaire (Alvarez de Toledo et López-Barneo, 1988), les neurones dissociés de la région septale (Castellano et López-Barneo, 1991) et

les neurones du CA3 de l'hippocampe (Mogul et Fox, 1991).

La présence des LTS est une caractéristique pratiquement constante dans les neurones hypothalamiques chez le rat et le cobaye. Leur localisation est évoquée dans le chapitre suivant.

e. Les canaux calciques bas-seuil dans les neurones hypothalamiques: localisation et caractéristiques

Des études, sur tranches ou sur explants, en courant-imposé, ont montré l'existence de neurones à LTS dans le noyau ventromédian du cobaye (Minami *et al*, 1986a,b), la région proche du noyau paraventriculaire du cobaye (Poulain et Carette, 1987) et du rat (Tasker et Dudek, 1991), les neurones histaminergiques tubéro-mammillaires du rat (Haas et Reiner, 1988), le noyau arqué du rat (Loose *et al*, 1990; MacMillan et Bourque, 1993), le noyau supraoptique du cobaye (Erickson *et al*, 1993), le complexe mammillaire du cobaye (Llinás et Alonso, 1992; Alonso et Llinás, 1992) et le noyau suprachiasmatique du rat (Kim et Dudek, 1993; Akasu *et al*, 1993). Enfin, dans la région préoptique, qui est couramment associée à l'hypothalamus, les neurones à LTS représentent chez le rat l'essentiel de la population neuronale (Hoffman *et al*, 1993).

Des études *in vitro* en potentiel-imposé ont été mises en oeuvre pour déterminer le rôle des courants ioniques dépendant du potentiel et notamment ceux des canaux calciques dans les neurones hypothalamiques. Le courant calcique de type T a ainsi été identifié chez le rat dans des neurones en culture (Müller *et al*, 1992; Desarménien *et al*, 1994) et dans des neurones dissociés de l'hypothalamus (Omura *et al*, 1996), du noyau ventromédian (Akaike *et al*, 1989; Koike *et al*, 1994) et du noyau suprachiasmatique (Huang, 1993).

Dans une préparation d'explant, le courant calcique de type T a été identifié dans les neurones magnocellulaires du noyau paraventriculaire du rat (Fisher et Bourque, 1995; Stern et Armstrong, 1995). Dans ces neurones, le courant calcique bas-seuil serait associé à des conductances calciques haut-seuil (Fisher et Bourque, 1995) pour la production des potentiels et des plateaux dépolarisants à l'origine de la décharge phasique qui caractérise l'activité de ces neurones synthétisant l'ocytocine et la vasopressine (revue dans Legendre *et al*, 1992).

La densité relative du courant calcique bas-seuil, comparée à celle du courant haut-seuil de type L, est élevée et le courant calcique bas-seuil est dominant dans les cellules de l'hypothalamus (revue dans Akaike, 1991). Contrairement à la situation observée dans les neurones du ganglion dorsal, où le courant calcique bas-seuil est dominant seulement pendant la période de maturation

des neurones, les neurones hypothalamiques adultes conservent une forte densité de ce courant (Akaike *et al*, 1989).

Les caractéristiques biophysiques du courant calcique bas-seuil décrites jusqu'alors dans les neurones hypothalamiques ne semblent pas différer significativement de celles des neurones appartenant à d'autres régions du système nerveux central. Le seuil d'activation du canal calcique bas-seuil est compris entre -60 et -80mV et son inactivation est totale pour des potentiels membranaires compris entre -60 et -70mV. Les processus d'activation et d'inactivation sont fortement dépendants du potentiel. La cinétique de ces deux processus est accélérée par l'augmentation de la dépolarisation membranaire. L'inactivation du canal en fonction du temps est monoexponentielle et elle est dépend du potentiel membranaire (Akaike, 1991).

La dépendance ionique du canal calcique bas-seuil dans les neurones isolés de l'hypothalamus est semblable à celle observée dans les neurones périphériques et dans la plupart des neurones centraux (Akaike, 1991). Lorsque le Ba^{2+} est substitué au Ca^{2+} , le courant généré est d'intensité soit plus faible soit équivalente de la même manière que dans les neurones du ganglion dorsal de rat et de poulet (Carbone et Lux, 1987a; Fox *et al*, 1987a) et dans les neurones hippocampiques issus de culture (Yaari *et al*, 1987). Il a été démontré que la substitution de ces deux cations diminuait la durée d'ouverture des canaux calciques bas-seuil d'un facteur de deux environ (Shirokov, 1988).

La principale caractéristique des canaux calciques bas-seuil hypothalamiques est représentée par une extrême sensibilité à certains bloqueurs organiques des canaux calciques. Le canal peut être bloqué par des substances appartenant aux trois groupes représentatifs des antagonistes calciques tels que le vérapamil, les DHP et les dérivés du diltiazem (Akaike *et al*, 1989; Akaike, 1991).

Cependant le plus puissant des antagonistes de ces canaux semble être la flunarizine (Akaike *et al*, 1989; Akaike, 1991), une substance connue pour bloquer les courants calciques des cellules musculaires intestinales et vasculaires. La flunarizine est une substance de type IV, groupe des diphenyl-méthyl pipérazines, selon la classification établie par le WHO. La flunarizine protège le cerveau lors de lésions nerveuses fonctionnelles et/ou structurales dans de nombreux modèles animaux soumis à une ischémie cérébrale (revue dans Panchenko *et al*, 1993). En plus de son effet cérébrovasculaire, la flunarizine a une action directement neuroprotectrice (Pauwels *et al*, 1991). Cliniquement, cette substance est utilisée pour traiter un certain nombre de pathologies comme les vertiges, les migraines, l'épilepsie et certaines maladies cardiaques (Olsen, 1988; Spierings, 1988; Astarloa *et al*, 1989; Koch *et al*, 1990). L'action inhibitrice des dérivés des DHP et de la

flunarizine pourrait faciliter l'analyse précise et l'implication des canaux calciques bas-seuil dans certaines fonctions du cerveau et dans la recherche de traitements de certaines maladies neurologiques.

f. Activité oscillatoire provoquée par l'intervention des potentiels dépolarisants lents

Une activité rythmique intrinsèque due à l'intervention des courants calciques bas-seuil a été notée dans l'olive inférieure (Llinás et Yarom, 1986b), le thalamus (Mulle *et al*, 1986; Avanzini *et al*, 1989) et l'habénula latérale (Gutnick et Yarom, 1989). Dans ces structures, l'activation des courants calciques donnant naissance aux potentiels dépolarisants lents est suivie de l'activation de courants hyperpolarisants de nature potassique, dépendant du potentiel et/ou des flux entrants de Ca^{2+} . L'hyperpolarisation produite après le potentiel dépolarisant lent sera suffisante pour réactiver en rebond un autre potentiel dépolarisant lent, ce mécanisme pouvant dans certaines circonstances liées à l'intégrité des réseaux neuronaux, se maintenir indéfiniment (Wilcox *et al*, 1988). L'activité du neurone se présente alors comme une succession de bouffées de potentiels d'action supportés par les potentiels dépolarisants lents. Les interactions entre les courants sont différentes dans les populations de neurones, si bien que des rythmes différents apparaîtront. Ces rythmes ont de profondes conséquences fonctionnelles. Ils sont reliés pour l'olive inférieure au tremblement, pour le thalamus à certains rythmes enregistrés dans l'électroencéphalogramme et pour l'habénula à une activité qui ressemble au rythme thêta hippocampique (Gutnick et Yarom, 1989).

Une oscillation neuronale impliquant une interaction entre des neurones à LTS et des neurones GABAergiques (produisant l'hyperpolarisation nécessaire à la dé-inactivation des canaux de type T) est en relation directe avec les mécanismes de l'épilepsie limbique (Higashima *et al*, 1996) et de l'absence de type petit-mal, dont la rythmogénèse est déclenchée par les oscillations rythmiques des neurones à LTS du thalamus (Krosigk *et al*, 1993).

g. Notions sur la distinction de plusieurs catégories de courants de type T

Des études portant sur les LTS des neurones du noyau réticulaire thalamique et de l'habénula latérale chez le rat ont permis la distinction de trois types de courants calciques transitoires et bas-seuil qui présentent des différences liées à leur cinétique et à leur

pharmacologie (Huguenard et Prince, 1992; Huguenard *et al*, 1993). Les deux premiers types de courants calciques bas-seuil se distinguent dans le noyau thalamique (Huguenard et prince, 1992), ils sont appelés I_{VB} (VB pour les neurones relais du thalamus ventro-basal) et I_{nRt} (nRt pour les neurones réticulaires thalamiques). Le troisième type, I_{LHb} (LHb pour l'habénula latérale) a été découvert plus récemment dans les neurones de l'habénula latérale (Huguenard *et al*, 1993). Il a été montré que I_{nRT} , appelé également I_{ts} (s pour slow en anglais), s'inactive plus lentement que I_{VB} et que I_{LHb} possède un certain nombre de caractéristiques similaires à celles de I_{VB} , incluant le seuil d'activation et les processus d'activation et d'inactivation dépendant du potentiel. Le courant I_{LHb} est relativement insensible à la substitution équimolaire du Ba^{2+} au Ca^{2+} contrairement à I_{VB} qui diminue et I_{nRt} qui augmente lors de cette substitution. Les auteurs suggèrent que ces trois courants transitoires pourraient être issus d'une grande famille de canaux calciques bas-seuil dont chaque membre résulterait soit du produit d'un gène unique soit de changements post-transcriptionnels. D'autres membres de cette famille pourraient alors exister dans d'autres régions du cerveau et contribueraient aux propriétés de décharge spécifique de certains types de neurones.

Les résultats obtenus dans l'étude réalisée sur les neurones du complexe mammillaire chez le cobaye (Alonso et Llinás, 1992; Llinás et Alonso, 1992) permet de formuler une hypothèse comparable à celle qui a été émise pour les neurones du noyau réticulaire thalamique et de l'habénula latérale chez le rat. Il a été démontré que les neurones du corps mammillaire médian étaient capables de générer des potentiels régénératifs dépendants du Ca^{2+} qui induisent des réponses en bouffées de potentiel d'action. Cependant, ces événements régénératifs ne sont pas tous identiques pour tous les neurones: certains neurones évoquent des LTS typiques, alors que d'autres présentent des potentiels en plateau de seuil intermédiaire appelés "Intermediate-Threshold Plateau potentials" en anglais (ITP). Les ITP se distinguent des LTS car ils durent plus longtemps et ils ne sont pas inactivés pour les potentiels membranaires plus positifs que -55mV. Pour expliquer la différence entre les deux événements dépolarisants, les auteurs évoquent deux hypothèses. La première hypothèse serait que les canaux calciques à l'origine des deux potentiels dépolarisants sont localisés à des endroits différents du neurone: sur le soma pour le LTS et sur les dendrites pour les ITP. Une deuxième hypothèse plus plausible concerne les propriétés cinétiques relatives aux ITP qui sont dissemblables de celles du LTS. En effet, le temps d'inactivation du courant à l'origine des ITP pourrait être plus lent que celui qui produit des LTS. Ainsi, une fois encore, des canaux calciques différents pourraient être impliqués dans la genèse de ces différents types de potentiels dépolarisants.

III. Conclusions

Pour l'étude des propriétés électriques des neurones du NMD, le choix du support expérimental s'est porté sur la **tranche épaisse** d'hypothalamus maintenue en survie. L'utilisation de cette préparation permet d'obtenir des données qui se rapprochent le plus de la situation *in vivo*, par l'enregistrement à 34°C de neurones adultes ayant conservé leur morphologie, leur densité en récepteurs et leur environnement synaptique local. Une première étude des propriétés membranaires a été effectuée en appliquant les techniques d'enregistrement intracellulaire en **courant imposé** avec des **microélectrodes fines**. Dans une seconde étape, la technique d'enregistrement en **patch-clamp dans la configuration "cellule entière"** a été mise en œuvre. L'analyse comparative des résultats obtenus avec les deux méthodes a pu être réalisée. Les résultats et la discussion de cette analyse seront présentés dans une **PREMIERE PARTIE** de ce travail.

Les caractéristiques biophysiques, cinétiques et pharmacologiques des conductances membranaires des neurones du NMD ont été étudiées en **potentiel imposé** en utilisant uniquement la technique d'enregistrement en **patch-clamp dans la configuration "cellule-entière"**. Cette technique permet une résolution des courants macroscopiques bien meilleure que celle obtenue avec les microélectrodes fines. La mise en évidence d'une **conductance calcique bas seuil de type T** dans les neurones du NMD ainsi que sa caractérisation, vu son apparente diversité dans les neurones du système nerveux central, était un des objectifs assignés à ce travail. Les résultats et la discussion de l'étude de cette conductance, ainsi que ceux de l'étude d'une autre conductance de nature potassique, qui est apparue jouer un rôle important dans le mode de décharge des neurones du NMD, sera présentée dans une **DEUXIEME PARTIE** de ce travail.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. Animaux

Les animaux utilisés sont des cobayes femelles tricolores (Bertho, Yffiniac). Au moment de l'expérience, les animaux pèsent 200 à 250g et sont juvéniles.

II. Anesthésie

Les animaux sont anesthésiés par une injection intramusculaire effectuée dans l'un des membres postérieurs, d'un mélange de xylazine/kétamine (Rompun, Bayer, 0.2 ml/kg / Kétalar 50, Parke Davis, 0.4 ml/kg)

III. Préparation des tranches épaisses d'hypothalamus

L'animal sous anesthésie subit une perfusion intracardiaque de 200ml environ de liquide cérébro-spinal artificiel (LCA) refroidi à la température de la glace et gazé par un mélange de 95% O₂ + 5% CO₂. Le liquide de perfusion est amené par une pompe Masterflex à un débit de 90ml/mn. Cette technique permet de remplacer le sang du cerveau de l'animal par la solution saline perfusée par voie aortique et d'améliorer ainsi la survie des tranches (Busto *et al*, 1989).

La composition du LCA (Shoji *et al*, 1991) est donnée dans le tableau 3 (solution a), son pH est maintenu à 7.4 par les 5% de CO₂ du mélange gazeux. Cette solution sert également de milieu d'immersion des blocs de cerveau lors de la confection des tranches et de milieu de perfusion lorsque les tranches de cerveau sont maintenues en survie dans la chambre d'incubation. L'animal est décapité immédiatement après la perfusion.

Après dissection rapide du cerveau dans sa totalité, un bloc plus restreint contenant l'hypothalamus est délimité à l'aide d'une lame de rasoir. Ce bloc est maintenu sur un support métallique avec de la colle α -cyanoacrylate (Cyanolit Stylmagic).

A partir de ce bloc immergé dans le LCA froid, des tranches de 400 μ m sont réalisées à l'aide d'un Vibroslice (Campden). Deux tranches frontales sont obtenues au niveau du NMD et sont immédiatement transférées dans la chambre d'incubation.

Solutions intrapipettes			Solutions extracellulaires						
composants (mM)	<i>1</i>	<i>2</i>	composants (mM)	<i>a</i> (LCA)	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>
K⁺ Gluconate	130		NaCl	117	117	117	100	100	100
CsF		140	KCl	4.7	4.7	4.7	4.7	4.7	4.7
MgCl₂	1	2	CaCl₂	2.5		2.5		2.5	2.5
CaCl₂	1	1	MgCl₂	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
Hépes	10	10	NaHCO₃	25			25		25
EGTA	10	10	NaH₂PO₄	1.2			1.2		1.2
ATP-Mg	2	2	Tris		25	25			
			glucose	10	10	10	10	10	10
			TEA-Cl			0-10		20	
			4AP			2-5		5	
			CsCl					5	2
			NiCl₂						2.5
			CoCl₂		2.5				
			BaCl₂				2.5		
			TTX (μM)	0-2	0-2	0-2	2	1-2	2
Osmolarité (mosmol/kg)	290-295		Osmolarité (mosmol/kg)	300-320					
pH	7.3	7.3	pH	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4
	KOH 5M	CsOH 5M			HCl 1N	HCl 1N		HCl 1N	HCl 1N

Tableau 3. Compositions des solutions intrapipettes et des solutions extracellulaires.

Le temps écoulé entre le début de la perfusion du cerveau de l'animal et la réalisation des tranches d'hypothalamus est de 10 à 15 min.

IV. Incubation des tranches d'hypothalamus

La chambre d'incubation est du type "interface" (Schwartzkroin and Mathers, 1978).

Les tranches d'hypothalamus sont déposées sur un papier pour lentilles (Lens Paper, Cokin) qui réduit la tension de surface du liquide et le distribue uniformément autour des tranches (Alger *et al*, 1984). La face inférieure du papier repose sur un filet de nylon qui est en contact avec le liquide de perfusion.

Le milieu de perfusion est amené par une pompe péristaltique (Gilson) fonctionnant à un débit de 2 ml/min. La face supérieure des tranches se couvre d'un mince film liquide qui se maintient grâce à l'atmosphère oxygénée et humide générée par un bain-marie d'eau bidistillée gazée par un mélange de 95% O₂ + 5% CO₂ (débit: 10l/min) et chauffée à 34°C. Pour une meilleure stabilité, les tranches restent à l'interface entre le liquide de perfusion et l'ambiance humide de la chambre d'incubation sans jamais être immergées.

Les enregistrements débutent toujours environ 3 heures après la mise en place des tranches dans la chambre d'incubation.

Les techniques de préparation et de maintien en survie des tranches de cerveau décrites ci-dessus ont récemment fait l'objet d'une revue et ont été reconnues comme étant les meilleures dans le cadre de l'amélioration de la survie des tranches (Aitken *et al*, 1995).

V. Description des différentes techniques d'enregistrement électrophysiologiques utilisées

Quelle que soit la technique adoptée, la microélectrode ou la pipette est reliée à un amplificateur Axoclamp 2A (Axon Instruments). Cet amplificateur permet l'utilisation des techniques électrophysiologiques du courant-imposé et du potentiel-imposé. Chacune de ces deux techniques peut être appliquée en mode continu ou en mode discontinu (tableau 4).

Mode	Courant-imposé	Potentiel-imposé
Continu	"pont"	cSEVC potentiel-imposé en continu à électrode unique
Discontinu	DCC courant-imposé en discontinu	dSEVC potentiel-imposé en discontinu à électrode unique

Tableau 4. Les différentes techniques d'enregistrement utilisées en courant-imposé et en potentiel-imposé.

1. Technique du courant-imposé

Par définition, la technique du courant-imposé consiste à appliquer une intensité de courant polarisant à la cellule et à recueillir les variations du potentiel transmembranaire en réponse. Cette technique est réalisée avec une seule électrode. Le courant-imposé peut être appliqué à la cellule grâce à l'un des deux modes décrits ci-dessous:

- le mode continu, également appelé mode "pont". La valeur de la résistance de l'électrode est contrebalancée par la méthode du pont de Wheastone. Le courant est injecté en continu dans l'électrode.
- le mode discontinu de la même technique est le "discontinuous current-clamp" en anglais (DCC). L'amplificateur alterne de manière périodique le mode d'injection du courant avec le mode d'enregistrement du potentiel. Le courant est généré par un générateur en tension sur lequel une résistance est interposée. L'échantillonnage est fixé par l'amplificateur, lequel utilise 30% de la période pour l'injection du courant.

Les deux méthodes ont été utilisées lors de cette étude. La sélection préférentielle de l'une ou de l'autre est expliquée plus loin dans ce chapitre.

2. Technique du potentiel-imposé

Par définition la technique du potentiel-imposé à électrode unique consiste à imposer une certaine valeur de potentiel à la membrane cellulaire et de recueillir en réponse le courant traversant la membrane. La technique est réalisée avec une seule électrode. En potentiel-imposé, la technique d'enregistrement à une seule électrode peut être appliquée :

- en continu par le mode cSEVC ("continuous Single Electrode Voltage-Clamp" en anglais). Dans ce cas, l'électrode doit offrir une résistance suffisamment faible ($<50\text{M}\Omega$) pour permettre l'enregistrement du potentiel et l'injection du courant en même temps et ce, de manière continue. Les erreurs produites par la tension passant au travers de la résistance de l'électrode peuvent être réduites mais jamais complètement supprimées par un procédé de compensation des résistances en série réalisé sur l'amplificateur.

- en discontinu par le mode dSEVC ("discontinuous Single Electrode Voltage-Clamp" en anglais). Cette méthode permet, comme pour le DCC, d'alterner de manière périodique le mode d'injection du courant avec le mode d'enregistrement du potentiel. Ici, l'amplificateur est utilisé comme un générateur en tension.

Les avantages de cette technique sont de permettre l'utilisation d'électrodes de plus forte résistance ($>50\text{M}\Omega$) d'une part et d'éviter les erreurs dues à un défaut de compensation des résistances en série d'autre part.

VI. Techniques électrophysiologiques intracellulaires

1. Préparation des microélectrodes d'enregistrement intracellulaire

Les microélectrodes d'enregistrement intracellulaire sont fabriquées à partir de tubes de borosilicate (Clark Electromedical Instruments) de 1 mm de diamètre externe, de 0.58 mm de diamètre interne et comprennent un filament de verre interne pour faciliter leur remplissage.

Elles sont façonnées sur une étireuse horizontale programmable P87 Flaming-Brown (Sutter Instruments) de façon à obtenir des résistances d'environ $50\text{M}\Omega$ pour une longueur de

pointe relativement peu élevée (~6mm) et un diamètre de pointe de 0.1µm environ. La propriété principale de cette étireuse est de générer un jet d'air froid sur le filament de platine chauffant. Ce jet d'air favorise un refroidissement rapide de la zone du tube soumis au chauffage pendant l'étirement et provoque en conséquence la réduction de la longueur de la pointe de l'électrode.

L'étireuse permet également la programmation de 4 paramètres variables essentiels qui sont :

- la température du filament permettant d'atteindre la fusion du verre,
- la force d'étirement du tube de verre,
- la vitesse de l'étirement,
- le temps de refroidissement du filament après chauffage, assuré par le jet d'air froid.

Le programme utilisé pour la confection des microélectrodes lors de cette étude comprend:

- une intensité de chauffage du filament adaptée pour les tubes de borosilicate décrits ci-dessus et en général proche de 400. Une unité représente 50mA de courant passant dans le filament.
- une vitesse de 100. Une unité représente 1mV passant dans le transducteur de sortie.
- un étirement de 150. Une unité représente une intensité de 4mA de courant passant dans le solénoïde d'étirement.
- un temps de refroidissement de 140ms.

A partir d'un seul tube de verre, deux microélectrodes rigoureusement identiques sont obtenues.

Immédiatement après l'étirement, les microélectrodes sont remplies d'une solution saline conductrice. Pour favoriser l'élimination des bulles d'air emprisonnées dans la pointe, les électrodes sont disposées verticalement dans une boîte hermétique sous atmosphère humide. L'humidité ambiante permet d'éviter la cristallisation du liquide de remplissage des électrodes due à l'évaporation. Ces microélectrodes sont préparées et remplies quelques heures à 24 heures avant l'enregistrement intracellulaire.

2. Solutions de remplissage des microélectrodes intracellulaires

Dans toutes les expériences réalisées dans les conditions normales d'enregistrement électrophysiologique, le KCl 3M est utilisé comme milieu de remplissage de la microélectrode

(résistances: 35-110 M Ω).

3. Solutions extracellulaires (milieu de perfusion)

Le milieu de perfusion extracellulaire normal dit standard est la solution *a* (tableau 3).

Certaines substances pharmacologiques utilisées pour modifier les propriétés électriques des neurones sont ajoutées directement au LCA :

- la tétrodotoxine (TTX),
- le tétraéthylammonium chloride (TEA),
- le NiCl₂.

Lorsque le remplacement équimolaire du CaCl₂ par le CoCl₂ ou l'ajout de la 4-aminopyridine (4-AP) sont nécessaires à l'étude, d'autres solutions extracellulaires sont utilisées afin d'éviter la précipitation du milieu due à la présence des ions phosphates et carbonates qui sont alors remplacés par du tampon Tris (solutions *b* et *c* dans le tableau 3).

Toutes les substances proviennent de Sigma, sauf la TTX, qui est fournie soit par Sigma soit par Latoxan.

4. Méthodes d'enregistrement intracellulaire

a. Matériel utilisé

Lors des enregistrements intracellulaires, seule la technique du courant-imposé en mode "pont" a été utilisée à l'aide de l'amplificateur Axoclamp 2A.

La microélectrode est reliée à l'amplificateur par l'intermédiaire d'un portoir (MEH1S, World Precision Instruments).

En cours d'expérience, les signaux électriques amplifiés sont observés sur l'oscilloscope analogique (référence 5441, Tektronix) et certaines séquences sont reproduites directement sur un enregistreur papier (Gould 2200S).

Les signaux sont digitalisés par un convertisseur 14 bits à 48 kHz et stockés sur cassette audio grâce au DTR 1201 (Biologic).

Les impulsions de courant polarisant sont produites et mises en forme par un ensemble de stimulation Digitimer comprenant un stimulateur isolé (type 2533), un générateur d'impulsions à déclenchement automatique (type 2521) et un gestionnaire de délais (type 3290).

Au cours de l'analyse des résultats en courant-imposé, les variations du potentiel membranaire sélectionnées sont reproduites par impression d'écran sur l'enregistreur interne d'un oscilloscope numérique Gould 1604.

b. Approche et empallement des neurones

A l'aide d'un micromanipulateur manuel, la microélectrode est amenée en surface de la tranche dans la région du NMD qui est repérée par la position du 3^{ème} ventricule et du fornix. Cette opération est réalisée sous contrôle visuel à l'aide d'une loupe binoculaire (Zeiss).

L'approche du neurone s'effectue de manière mécanique et électrique sous le contrôle de l'oscilloscope analogique. Des impulsions répétitives de courant dépolarisant d'une intensité de 0.1nA et d'une durée de 100ms sont appliquées à la microélectrode par l'intermédiaire du stimulateur isolé pendant toute la durée de l'approche, à la fréquence de 1 impulsion par s.

Aussitôt que la microélectrode est descendue dans la tranche, le réglage du pont de Wheastone est effectué sur l'amplificateur, ce qui permet de mesurer la résistance de la microélectrode. Cette opération est réalisée sur la trace du potentiel en réponse aux impulsions de courant. La déflexion du potentiel induite par la résistance de la microélectrode est contrebalancée et mise à zéro par ce procédé. Ainsi, lorsque le neurone est empalé, seul le potentiel transmembranaire est enregistré.

Puis, l'électrode est descendue dans la tranche par pas successifs de 2 μm à l'aide d'un micromanipulateur motorisé (Nanostepper). Le Nanostepper est programmé pour réaliser une descente accélérée de l'électrode et provoquer une légère oscillation de sa pointe en fin de pas.

Sur l'oscilloscope, les variations d'amplitude du potentiel en réponse aux impulsions dépolarisantes sont significatives de l'approche d'une membrane cellulaire.

Dès que la proximité d'une cellule est estimée, la pointe de l'électrode est amenée à osciller grâce au système électrique de surcompensation de la capacité de l'électrode. Cela permet de perforer la membrane du neurone.

Lorsque le neurone est empalé, des créneaux de courant polarisant sont appliqués pour observer le potentiel électrotonique. Le front de montée de ce potentiel est une exponentielle dont la constante de temps τ est égale au produit de la résistance membranaire par la capacité membranaire.

Un réglage du pont de Wheastone est nécessaire pour isoler le potentiel électrotonique du potentiel créé par la résistance de la microélectrode.

L'empalement cellulaire, permettant la sélection d'un neurone pour l'analyse de ses paramètres électrophysiologiques lors de l'enregistrement en mode "pont", est jugé de bonne qualité selon les critères suivants:

- résistance membranaire ou $R_{mb} \geq 70M\Omega$,
- constante de temps de membrane ou $\tau \geq 20ms$,
- potentiel de repos ou $PR \leq -50mV$,
- amplitude du potentiel d'action $\geq 50mV$, cette dernière mesure est effectuée

entre le seuil de déclenchement et le sommet du potentiel d'action.

VII. Technique du *patch-clamp* en configuration "cellule entière" réalisée en aveugle sur tranche de cerveau

1. Préparation des électrodes ou pipettes de *patch-clamp*

Les pipettes de *patch-clamp* sont fabriquées à partir de tubes de borosilicate (Clark Electromedical Instruments) de 1.5mm de diamètre externe et de 1.17mm de diamètre interne avec un filament de verre interne.

Avant l'étirement, les extrémités des tubes sont légèrement érodées à la flamme d'un bec Bunsen.

Les pipettes sont étirées sur l'étireuse horizontale P87 Flaming-Brown décrite précédemment pour la fabrication des microélectrodes intracellulaires.

La première condition pour l'obtention d'un enregistrement en *patch-clamp* en configuration "cellule entière", notamment en potentiel-imposé, repose sur la bonne qualité de l'électrode. Selon Brown et Flaming (1986), les pointes des électrodes doivent être courtes, avec un angle de pointe le plus obtus possible. Le seul moyen d'obtenir un tel résultat est de multiplier le nombre de cycles d'étirement du tube de borosilicate. Un programme d'étirement du tube, en quatre étapes, a donc été mis au point avec un réglage très précis des paramètres de l'étireuse. Les trois premières étapes permettent de diminuer progressivement le diamètre du verre par le chauffage, avec un étirement doux uniquement provoqué par le retour des ressorts qui maintiennent le tube, afin de ne pas trop allonger la pointe. La quatrième et dernière étape termine le façonnage des pipettes. Les paramètres utilisés lors de cette étape vont déterminer en même temps la longueur et le diamètre de la pointe de l'électrode. Ici, l'étirement est effectué plus

fortement et la modulation de la durée du jet d'air froid permet de faire varier de manière précise la longueur et le diamètre. Le procédé permet de réaliser les pipettes de manière reproductible.

Le choix du diamètre interne de la pointe de l'électrode a été fixé à 2µm environ. Il est vérifié sous microscope, au grossissement $\times 60$. Ce diamètre optimise la qualité du contact étanche de très forte résistance qui se réalise entre la membrane et la paroi interne de la pointe de la pipette, favorise une rupture nette de la membrane neuronale et permet une adhérence optimale de la membrane à la paroi de l'électrode.

Quelques auteurs (Henderson et Dryer, 1992; Akaike *et al*, 1993; Allen *et al*, 1993; Alreja et Aghjianian, 1995) recommandent le polissage de la pointe de la pipette et l'enrobage de la pipette par du silicone afin de réduire les résistances en série. Dans cette étude, aucun de ces procédés n'a été utilisé, puisque les enregistrements étaient satisfaisants lorsque les pipettes étaient utilisées telles quelles.

Contrairement aux microélectrodes intracellulaires, les pipettes de *patch-clamp* sont confectionnées juste avant l'enregistrement et ne sont remplies qu'au dernier moment avec un milieu intrapipette dont la composition est choisie en fonction de l'étude à réaliser.

Lorsque la membrane du neurone est rompue, le milieu intrapipette diffuse immédiatement dans le milieu intracellulaire d'origine. Dans ce milieu, pourront s'ajouter des marqueurs fluorescents et des substances pharmacologiques destinées à modifier les courants ioniques.

2. Solutions de remplissage des pipettes (solutions intrapipettes)

Selon Kay (1992), deux types de solutions intrapipettes, dont les compositions sont données dans le tableau 3, ont été imaginés et préparés.

La solution intrapipette standard est la solution 1. Cette solution 1 se rapproche fortement du milieu intracellulaire naturel d'origine. Par conséquent, elle est utilisée pour réaliser des enregistrements électrophysiologiques de type global, sans sélection préférentielle par la voie intracellulaire de certains types de conductance. Ce milieu comprend un cation majoritaire, le K^+ et un anion accompagnant, le **gluconate**.

Pour l'étude du courant calcique bas-seuil réalisée en potentiel-imposé, la solution 2 est utilisée. La composition de la solution 2 est définie dans le but d'isoler le courant calcique bas-seuil des autres courants ioniques. Il s'agit donc d'un milieu approprié à l'activation sélective de ce type de courant calcique. La substitution du fluorure de césium (CsF) au gluconate de K^+ est dictée par les considérations suivantes :

* le Cs^+ qui remplace le K^+ du milieu intrapipette standard, est utilisé pour supprimer des courants potassiques spécifiques tels que le courant potassique de la rectification retardée (I_K) (Armstrong et Binstock, 1965; Tillotson, 1979).

* le fluorure (F^-), utilisé comme anion majeur à la place du gluconate, a surtout été choisi parce qu'il altère les propriétés cinétiques des courants calciques haut-seuil sans toucher celles des courants calciques bas-seuil (Kay *et al*, 1986). Plus récemment, il a été démontré qu'il inhibait les canaux calciques haut-seuil en bloquant principalement les courants calciques de types N et L (Akaike *et al*, 1989; Scott, 1991; Bertolini *et al*, 1994). L'utilisation du F^- intracellulaire peut aussi favoriser la réalisation du contact étanche (Huang, 1989). Il a également été montré que l'anion $[\text{AlF}_4]^-$ pouvait mimer l'action du guanosine 5'-O-(3'-thiotriphosphate) ($\text{GTP-}\gamma\text{-s}$) en activant les protéines G dans un certain nombre de préparations (Sternweis et Gillman, 1982). Ainsi, si les ions multivalents ne sont pas précipités dans la cellule, des traces d'aluminium provenant du verre de la pipette mises en association avec le F^- pourraient activer les protéines G de manière persistante et ralentir l'activation des courants calciques (Huang, 1989) et pourraient de manière générale altérer les caractéristiques des courants ioniques (revue dans Surmeier *et al*, 1994). Ce désavantage est éliminé lorsqu'un agent chélateur du Ca^{2+} tel que l'acide éthylène-glycol-bis (β -aminoéthyl éther) N,N,N',N'-tétraacétique (EGTA) est ajouté dans la solution de remplissage de la pipette. Quelque soit la composition de la solution intrapipette, l'EGTA est toujours présent dans le milieu intrapipette, afin de fixer une concentration intracellulaire calcique constante, pour maintenir un gradient calcique stable, mais aussi pour éviter une activation constante des protéines G par le F^- . L'EGTA est un chélateur moins rapide que l'acide 1,2-bis(2-aminophénoxy)éthane-N,N,N',N'-tétraacétique (BAPTA) mais il est souvent utilisé pour des études semblables à celles réalisées ici.

De la même manière, les deux solutions intrapipettes contiennent de l'adénosine 5'-triphosphate (ATP) qui est nécessaire au maintien du métabolisme des neurones et à la conservation de leur activité physiologique. La présence d'ATP dans le milieu intrapipette permet en outre de préserver les canaux calciques et de maintenir leur fonctionnement normal (Forscher et Oxford, 1985), ainsi que les nombreuses phosphorylations intracellulaires.

Les milieux intrapipettes sont préparés par volumes de 50ml qui sont immédiatement divisés en aliquotes de 1ml portés à congélation à -20°C où ils sont conservés jusqu'à 6 mois. Un aliquote est utilisé pour une seule expérience.

Le milieu intrapipette est décongelé juste avant l'expérience et il est filtré (filtres Millex-GV4, $0.22\mu\text{m}$, Millipore). Puis, il est aspiré dans une seringue de 1ml sur laquelle est fixée une

aiguille non métallique (MicroFil, World Precision Instruments), qui va permettre le remplissage de la pipette. Le milieu intrapipette est maintenu dans la seringue à température ambiante pendant toute la durée de l'expérience.

3. Solutions extracellulaires (milieux de perfusion)

Les compositions des différentes solutions extracellulaires utilisées sont données dans le tableau 3. Chacune de ces six solutions est utilisée dans un but différent défini par le type d'étude à réaliser.

La **solution a** (LCA) représente le milieu standard normal dont la composition ionique se rapproche le plus possible de celle du milieu extracellulaire d'origine.

Les solutions *b*, *c*, *d*, *e* et *f* sont destinées à moduler ou à isoler certaines conductances par la voie extracellulaire :

- La **solution b** est destinée à bloquer les courants calciques par l'intermédiaire du Co^{2+} .
- La **solution c** comprend 2mM de **4-AP** visant à bloquer de manière sélective la conductance potassique transitoire.
- La **solution d** est utilisée dans le but de connaître l'effet du Ba^{2+} sur différents types de conductance. L'emploi du BaCl_2 nécessite une préparation séparée dans laquelle le BaCl_2 est substitué au CaCl_2 de manière équimolaire.
- La **solution e** permet le blocage global des courants potassiques entrants responsables des rectifications anormales (I_H , I_Q) par le Cs^+ et des courants potassiques sortants tels le courant de la rectification retardée (I_K) par le **TEA** et le courant transitoire par une forte concentration de **4-AP**.
- Enfin la **solution f** est destinée à supprimer sélectivement le courant calcique bas-seuil par le Ni^{2+} et à réduire les courants potassiques de type entrant (I_H , I_Q) par le Cs^+ .

D'autres substances (TTX, TEA, NiCl_2 , CsCl_2 , ZnCl_2 , octanol, catéchol, amiloride, mibefradil, α -dendrotoxine) sont directement ajoutées à la solution standard *a* lorsqu'elles sont utilisées de manière ponctuelle pendant l'expérience.

Les expériences menées en absence de Ca^{2+} extracellulaire sont réalisées avec la solution *a* où le MgCl_2 est substitué de manière équimolaire au CaCl_2 .

Les substances hydrophobes, telles que la nifédipine et la flunarizine, ne sont pas

Etude réalisée	Technique utilisée	Milieu intrapipette	Milieux extracellulaires
Propriétés membranaires électriques générales	courant-imposé "pont"	1	a - b - c
Pharmacologie du potentiel dépolarisant lent	courant-imposé "pont" ou DCC	1	a - b - d
Cinétique du courant calcique bas-seuil	potentiel-imposé dSEVC	2	e
Pharmacologie du courant calcique bas-seuil	potentiel-imposé dSEVC	1	a - b - c - d
Pharmacologie de la rectification transitoire	courant-imposé "pont"	1	a - b - c
Cinétique du courant potassique transitoire	potentiel-imposé dSEVC	1	a - f
Pharmacologie du courant potassique transitoire	potentiel-imposé dSEVC	1	a - b - c

Tableau 5. Choix des solutions intra et extracellulaires en fonction de l'étude réalisée.

directement ajoutées au milieu extracellulaire *a* mais sont d'abord dissoutes dans l'éthanol absolu de manière que la concentration en alcool ne dépasse pas 0.02% dans la solution finale.

La nifédipine et le catéchol en solution sont conservés à l'obscurité pendant l'expérience car ils s'oxydent en présence de lumière.

Toutes les substances utilisées proviennent de Sigma, sauf l' α -dendrotoxine qui provient de Latoxan et le mibefradil donné par Hoffmann-La Roche.

4. Association des solutions intra et extracellulaires en fonction de l'étude réalisée.

Chaque recherche est réalisée avec l'association spécifique d'un type de milieu extracellulaire et d'un milieu intrapipette donné. Le tableau 5 indique les différentes associations de milieux en fonction de l'étude réalisée. Ce tableau comprend également des indications concernant les techniques électrophysiologiques utilisées pendant l'étude.

* **Lors de l'étude des propriétés membranaires électriques générales**, la solution intrapipette *1* et le milieu de perfusion extracellulaire *a* sont choisis.

* **La modulation des propriétés électriques par la pharmacologie** est réalisée en courant-imposé avec la solution intrapipette *1* associée soit avec les solutions *b* ou *c*, soit avec la solution *a* dans laquelle sont ajoutés directement les agents pharmacologiques (TTX, NiCl₂, CsCl, ZnCl₂, TEA).

* **L'étude cinétique du courant calcique bas-seuil** en potentiel-imposé est réalisée avec l'association de la solution intrapipette *2* et de la solution extracellulaire *e*. Ces deux solutions permettent conjointement d'isoler le courant calcique bas-seuil des autres types de conductance existant dans les neurones.

* **Lors de l'étude pharmacologique du courant calcique bas-seuil**, pour la majorité des enregistrements réalisés en potentiel-imposé, le milieu de perfusion extracellulaire de base est la solution *a*, dans laquelle les agents pharmacologiques (TTX, NiCl₂, ZnCl₂, amiloride, octanol, mibefradil, nifédipine, flunarizine) sont ajoutés, et la solution intrapipette est la solution *1*. Au cours de cette étude, les milieux *a* sans CaCl₂, *b* et *d* ont été également employés, associés à la solution intrapipette *1*. L'analyse de l'effet du Ba²⁺ sur le courant calcique bas-seuil est réalisée avec la solution intrapipette *2* associée aux milieux extracellulaires *e* normal ou *e* sans Ca²⁺, dans lequel le CaCl₂ est remplacé par le BaCl₂.

* **L'étude cinétique du courant potassique transitoire** en potentiel-imposé a été réalisée avec la solution intrapipette *1* et, soit avec la solution extracellulaire *a*, avec ou sans

CaCl₂, soit avec la solution *f* et toujours additionnée de TTX.

* L'étude pharmacologique du courant potassique transitoire est réalisée avec la solution intrapipette *l* et, soit avec la solution extracellulaire α , avec ou sans CaCl₂, soit avec la solution *c* et toujours additionnée de TTX. Les autres drogues utilisées (TEA, α -dendrotoxine, catéchol, ZnCl₂) sont ajoutées directement au milieu extracellulaire α associé à la solution intrapipette *l*.

5. Méthodes d'enregistrement en *patch-clamp* en configuration "cellule entière"

a. Matériel utilisé

Les techniques d'enregistrement utilisées sont les mêmes que celles décrites au paragraphe V pour les enregistrements intracellulaires.

Le matériel électronique est également le même que celui décrit au paragraphe VI, 4, a.

Après remplissage, la pipette est placée dans un portoir adapté aux études en *patch-clamp* (Axon Instruments). Ce portoir présente 3 orifices. Le premier orifice, situé à l'extrémité supérieure du portoir, permet la connexion de la pipette à l'amplificateur Axoclamp 2A par le biais d'un fil d'argent maintenu dans la pipette. Ce fil d'argent est au préalable chloruré pendant plusieurs heures dans de l'hypochlorite de Na (eau de Javel) fortement concentré. L'orifice placé à l'extrémité inférieure du portoir permet l'introduction et le maintien de la pipette. Le troisième orifice est connecté à un cathéter de polyéthylène (Diagnostics Merck-Biotrol) par lequel des pressions positives et négatives peuvent être exercées à l'intérieur du portoir, pour qu'elles soient transmises à la pipette.

L'extrémité érodée de la pipette facilite sa pénétration dans le portoir et évite le frottement du fil d'argent chloruré lors de sa mise en place. Il faut noter que si la pipette n'était pas érodée, des débris émanant du fil d'argent chloruré pourraient produire un bouchage de la pointe de l'électrode.

L'Axoclamp 2A est utilisé pour la réalisation des enregistrements en courant-imposé et en potentiel-imposé, le passage d'un mode à l'autre sur une même cellule s'effectuant sans inconvénient majeur. Les modalités d'utilisation du mode dSEVC en *patch-clamp* ont été reprises d'après Finkel et Redman (1984).

b. Approche, réalisation du contact étanche et rupture de la membrane neuronale

La pipette est d'abord descendue sous contrôle visuel dans la région du NMD à l'aide du micromanipulateur manuel puis piquée en surface de la tranche. A ce moment, la résistance de la pipette est déterminée par le biais du réglage du pont de Wheastone, sur la trace du potentiel obtenue en réponse aux chocs délivrés en courant, dont les paramètres sont :

- fréquence de 6Hz
- intensité de 0.1nA
- durée de 20ms.

Il arrive souvent que la pipette s'obstrue au moment du contact avec la tranche, il est donc nécessaire de la déboucher en exerçant une légère pression positive en soufflant par la bouche dans le cathéter relié au portoir de la pipette.

Lorsque la résistance de la pipette a été mesurée, celle-ci doit se situer entre 4 et 10M Ω pour garantir un résultat convenable, l'amplificateur est placé en mode potentiel-imposé cSEVC après avoir ajusté l'offset à zéro.

A partir de ce moment, la technique d'approche en potentiel-imposé décrite par Blanton *et al* (1989) est suivie. L'approche s'effectue par pas de 2 μ m à l'aide du Nanostepper. Le micromanipulateur motorisé est alors programmé pour réaliser une descente dépourvue d'accélération et d'oscillation de pointe d'électrode. Cette approche est dite en aveugle car elle n'est pas contrôlée sous microscope. Ce sont uniquement les variations électriques du courant observées en réponse à des chocs dépolarisants, qui vont signaler la proximité de la cellule.

Les chocs dépolarisants, appliqués par l'intermédiaire du stimulateur isolé sont définis par les paramètres suivants :

- fréquence de 6 Hz,
- amplitude de 10mV,
- durée de 40ms.

La réponse en courant est observée sur l'oscilloscope numérique.

Lorsque la pipette approche d'une membrane cellulaire (figure 3A), une augmentation de la résistance à la pointe de l'électrode se manifeste par une diminution d'amplitude de la réponse en courant. Quand la réponse en courant a diminué de moitié, une légère aspiration à l'extrémité du cathéter est réalisée par la bouche. Cette succion permet la réalisation progressive d'un contact étanche entre la membrane du neurone et la paroi de la pipette.

A. Approche mécanique du neurone dans la tranche de cerveau

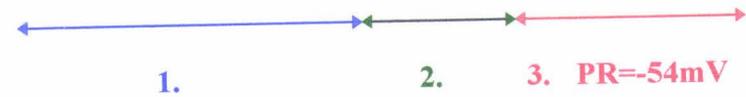
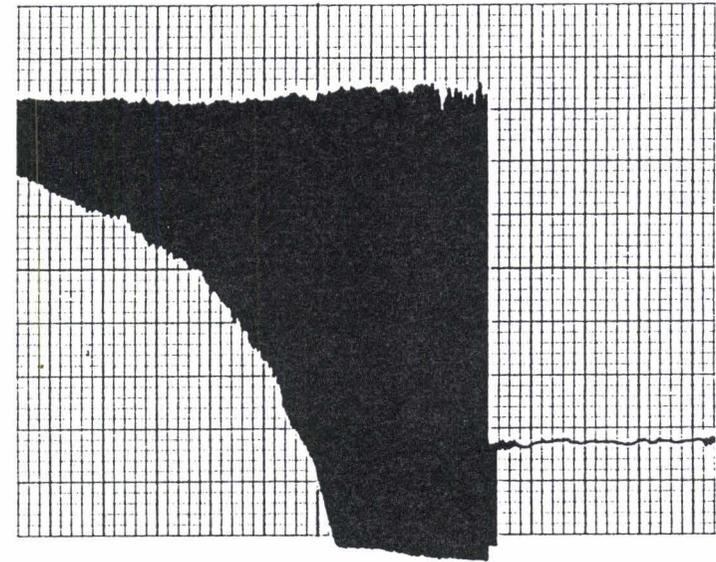
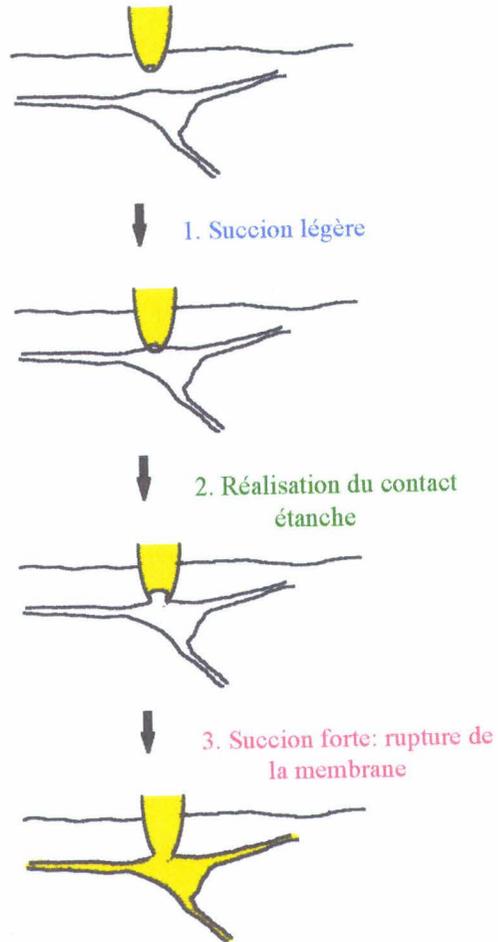


Figure 3.

B. Observation du potentiel à la pointe de l'électrode.

1. Augmentation progressive de la résistance à la pointe de l'électrode.
 2. Stabilisation du contact étanche ($>1G\Omega$).
 3. Rupture de la membrane: indication du potentiel de repos du neurone.
- Barres de calibration: 10mV, 10sec.

A ce moment, l'amplificateur est mis en mode "pont" du courant-imposé et des chocs dépolarisants, dont les paramètres sont décrits plus haut, sont appliqués selon la technique de Dillon et Waldrop (1992). L'augmentation progressive du potentiel proportionnelle à la valeur de la résistance est suivie sur l'enregistreur papier (figure 3B). Le changement de mode de l'amplificateur, placé lors de cette étape en courant-imposé, permet d'apprécier de manière très précise la valeur de la résistance. Ainsi, la formation du contact étanche est mesurée et contrôlée jusqu'à l'obtention d'un contact de résistance stable pouvant aller de 1 à plusieurs $G\Omega$ ($10^9\Omega$). A ce stade, si l'amplificateur était utilisé en mode potentiel-imposé, l'amplitude du courant observé en réponse aux chocs dépolarisants serait devenue très faible, il serait donc difficile de quantifier exactement la valeur de la résistance. Au moment où la résistance atteint une valeur stable supérieure à $1G\Omega$, la cellule est en configuration dite "cellule attachée".

A ce stade des opérations, une succion plus forte et plus rapide est effectuée et va permettre la rupture du morceau de membrane en contact avec la pipette. Lorsque la rupture est réalisée (figure 3A), la valeur du potentiel de repos membranaire est lue d'une part sur l'amplificateur placé en mode courant-imposé et d'autre part mesurée sur l'enregistreur papier (figure 3B). La cellule est, à ce stade ultime, dans la configuration "cellule entière".

Avant de stimuler le neurone, il est impératif de laisser pendant quelques minutes la cellule au repos, en évitant notamment de l'hyperpolariser, afin de stabiliser complètement les échanges entre le milieu intrapipette et le cytoplasme de la cellule. Pendant ce temps, l'amplitude du potentiel de repos du neurone est surveillée en permanence sur l'enregistreur papier.

Les enregistrements débutent en courant-imposé, avec le mode "pont" de l'amplificateur, cinq à dix minutes après la rupture de la membrane. Cette étape permet de juger immédiatement la qualité du contact entre le neurone et la pipette, de mesurer la résistance de la pipette (résistance dite d'accès) et de décider de poursuivre ou non une étude sur ce même neurone.

c. Mesure du potentiel de jonction

Par définition, le potentiel de jonction (PJ) est produit par la mobilité spécifique de chaque type d'ion contenu dans les milieux aqueux des solutions intracellulaire et extracellulaire.

Le potentiel de jonction est négligeable ($<1mV$), avec la technique intracellulaire, lorsqu'elle est réalisée avec des microélectrodes remplies de KCl 3M. En effet, comme la mobilité de l'ion K^+ est égale à 1.0000 (valeur de référence) et celle du Cl^- à 1.0388, le potentiel de

	Associations des solutions intra et extracellulaires						
Mesure du PJ (mV)	<i>1 - a</i>	<i>1 - b</i>	<i>1 - c</i>	<i>1 - d</i>	<i>1 - e</i>	<i>1 - f</i>	<i>2 - e</i>
mesure expérimentale	-11	-11	-11	-11	-10	-11	-7
calcul théorique	-11	-10	-11	-11	-11	-11	-8

Tableau 6. Valeurs des potentiel de jonction en fonction des milieux intra et extracellulaires utilisés.

jonction sera quasiment nul, et les corrections ne sont pas nécessaires sur les mesures effectuées en intracellulaire.

Par contre, le potentiel de jonction peut être important dans le cadre d'une mesure de potentiel réalisée en *patch-clamp* en configuration "cellule entière" et il peut fausser de manière considérable les mesures, notamment celle du potentiel transmembranaire. Dans ce cas, il est impératif de connaître la valeur précise du potentiel de jonction pour un type de milieu intrapipette mis en relation avec une solution extracellulaire donnée, afin d'effectuer des corrections soit sur les mesures expérimentales, soit directement sur l'amplificateur.

Il existe deux méthodes pour calculer le potentiel de jonction: la méthode expérimentale et la méthode théorique. Cette dernière est exclusivement basée sur les équations mathématiques relatives à la mobilité des ions et à l'équation de Henderson. Les deux méthodes ont été utilisées.

Le tableau 6 donne les valeurs mesurées du potentiel de jonction obtenues avec les deux méthodes de calcul pour les différentes associations de solutions extra et intracellulaires utilisées.

c1. Méthode expérimentale

La méthode expérimentale décrite par Neher (1992), consiste à remplir une pipette avec le milieu intrapipette qui sera utilisé lors de l'expérience. Une seconde pipette est remplie de KCl 3M afin d'assurer le retour du courant, puis les pointes des deux pipettes sont placées dans un petit récipient contenant le milieu intrapipette.

L'offset de l'amplificateur, mis en courant-imposé mode continu, est alors ajusté au zéro. Il est surveillé pendant dix minutes environ sur l'enregistreur papier. Si des variations supérieures à 1mV sont obtenues pendant cette période, le fil d'argent contenu dans la pipette doit être rechloruré, sinon la mesure est poursuivie normalement.

La seconde étape consiste à remplacer le milieu intrapipette contenu dans le récipient par le milieu extracellulaire qui sera utilisé pendant l'expérience. A ce moment, la valeur du potentiel de jonction est indiquée par une déflexion mesurable sur l'enregistreur papier.

L'ensemble de l'opération est repris à l'inverse en remplissant cette fois la pipette avec le milieu extracellulaire. L'amplitude du potentiel de jonction ainsi mesurée est de signe opposé mais doit être de valeur absolue équivalente à celle de la première mesure réalisée.

Lors des expériences, la correction des mesures en potentiel sera directement réalisée sur l'offset de l'amplificateur.

c2. Méthode théorique mathématique

L'équation de Henderson généralisée utilisée pour faire des calculs théoriques du potentiel de jonction (Morf, 1981; Barry et Lynch, 1991) est:

$$E^S - E^P = (RT/F)S_F \ln \left\{ \frac{\sum_{i=1}^N z_i^2 u_i a_i^P}{\sum_{i=1}^N z_i^2 u_i a_i^S} \right\}$$

où

$$S_F = \frac{\sum_{i=1}^N [(z_i u_i)(a_i^S - a_i^P)]}{\sum_{i=1}^N [(z_i^2 u_i)(a_i^S - a_i^P)]}$$

et où:

- $E^S - E^P$ représente la différence de potentiel entre la solution externe (S) et le milieu intrapipette (P) et u , a et z représentent respectivement la mobilité relative, l'activité et la valence (incluant le signe) de chaque type d'ion,

- R est la constante des gaz parfaits,

- T est la température en Kelvin,

- F est la constante de Faraday,

ainsi $RT/F \ln = 58.2 \log_{10}$ en mV à la température de 20°C (Barry, 1994).

Un programme contenu dans le logiciel JPCalc, version 2.02 commercialisé par Barry (Université de New South Wales, Sydney, Australie) permet de réaliser les calculs de potentiel de jonction directement par ordinateur. Il suffit d'introduire les concentrations de chaque ion présent dans les milieux extra et intracellulaires, et le logiciel fait automatiquement le calcul du potentiel de jonction (tableau 6).

d. Enregistrements en potentiel-imposé

La méthode utilisée lors des enregistrements en potentiel-imposé fait appel au mode discontinu (dSEVC). Elle nécessite un réglage optimal de l'amplificateur et l'utilisation du support informatique.

d1. Paramétrage de l'amplificateur

Le mode discontinu (dSEVC) est volontairement préféré au mode continu (cSEVC) car la cellule est maintenue plus rapidement à la valeur du potentiel programmé. C'est un avantage important lors de l'étude de courants qui s'activent rapidement tels que le courant calcique bas-seuil et le courant potassique transitoire.

L'inconvénient de la technique en discontinu est l'émission de traces bruitées. Pour y remédier, nous effectuons la moyenne de plusieurs enregistrements produits par le même protocole de stimulation, lorsque l'expérience permet la multiplication des stimulations sur un même neurone.

Avant de se placer dans les conditions de potentiel-imposé, il est nécessaire d'effectuer tous les réglages de l'amplificateur. Seuls sont choisis pour ce type d'analyse, les neurones enregistrés avec une pipette offrant une faible résistance d'accès ($R_{\text{accès}} < 30\text{M}\Omega$). La résistance d'accès est définie par la résistance de la pipette lorsqu'un neurone est enregistré en mode "cellule entière". En effet, la rupture de la membrane engendre toujours une augmentation de la résistance de la pipette, qui se traduit par une résistance d'accès à la cellule d'une valeur supérieure, de deux à six fois, à celle de la pipette.

Pendant la première partie du paramétrage, l'amplificateur est mis en courant-imposé, mode DCC, pour effectuer le réglage de l'échantillonnage. Cet échantillonnage dans le temps est déterminé par l'amplificateur. Il se décompose en deux périodes :

~ La première correspond à 30% du temps qui sont utilisés pour l'injection de la quantité de courant nécessaire au maintien de la cellule à la valeur imposée du potentiel.

~ La seconde équivaut aux 70% résiduels qui sont alloués à l'enregistrement et à la correction de la valeur du potentiel par rapport à la valeur imposée à l'origine.

Le potentiel enregistré par la pipette avant l'échantillonnage est visualisé tout au long de l'expérience sur un oscilloscope de contrôle séparé (Finkel et Redman, 1984).

La fréquence de l'échantillonnage, que nous fixons à 4kHz, est sélectionnée sur l'amplificateur. Cette fréquence permet le retour complet du potentiel à la ligne de base entre chaque échantillonnage.

Ensuite, la compensation de la capacité membranaire est effectuée par un procédé de neutralisation sur l'amplificateur.

Enfin le potentiel de membrane est amené à la valeur du potentiel de repos membranaire afin de maintenir la cellule au repos entre les stimulations.

L'ensemble de ce premier paramétrage constitue aussi une présélection des neurones car ceux qui ne répondent pas correctement aux paramètres imposés par l'amplificateur, sont immédiatement rejetés de l'analyse.

La deuxième partie du réglage s'effectue en potentiel-imposé en mode discontinu (dSEVC). Les paramètres concernés sont :

- le gain de l'amplificateur (de 0.15 à 0.8nA/mV en fonction de la résistance d'accès de la pipette),
- le filtre anti-alias (fixé à 10µs),
- la bande passante de l'amplificateur (fixée à 3kHz),
- et le déplacement de la phase (placée en "phase retardée" à -0.8ms).

Tous ces réglages sont effectués en examinant la réponse du neurone à un créneau dépolarisant de 10mV et de 100ms et en observant la fluctuation de l'échantillonnage sur l'oscilloscope de contrôle, cette dernière devant rester de faible amplitude tout au long de l'enregistrement.

d2. Procédés informatiques

Les protocoles de stimulation sont programmés sur ordinateur (486DX4-100 ou 486DX33) à partir du logiciel pCLAMP (version 6, Axon Instruments). Ce logiciel permet la stimulation, l'acquisition et l'analyse des enregistrements électrophysiologiques.

L'utilisation du matériel informatique est nécessaire en potentiel-imposé car les protocoles de stimulation utilisés sont plus complexes et l'analyse des tracés demande une grande précision dans les mesures ainsi que l'emploi de régressions non linéaires pour l'ajustement des tracés et des courbes.

Les protocoles de stimulation sont programmés et enregistrés sur l'ordinateur, et une interface Digidata 1200 permet de convertir le signal numérique de l'ordinateur en signal analogique vers l'amplificateur Axoclamp 2A. Inversement, pour l'acquisition, les données analogiques recueillies sont transmises à l'ordinateur par l'intermédiaire de l'interface.

L'acquisition s'effectue avec le programme Clampex du logiciel pCLAMP et les signaux sont analysés de manière différée sur le programme Clampfit de pCLAMP.

Enfin, les tracés électrophysiologiques et certaines analyses sont exportées vers Sigmaplot (versions 1.00 et 2.01 pour Windows 3.1, Jandel Scientific), logiciel graphique scientifique, et les

analyses statistiques sont réalisées sur Sigmastat (version 1.02 pour Windows 3.1, Jandel Scientific), logiciel statistique.

En potentiel-imposé, les soustractions du courant de fuite et du courant capacitif n'ont pas été effectuées car le protocole de soustraction pendant l'enregistrement nécessite des stimulations répétées qui, d'une part, ne garantissent pas le maintien des neurones et d'autre part diminuent de façon importante le rapport signal-bruit sur les enregistrements du courant.

e. Enregistrements en courant-imposé

Dans le cas des neurones enregistrés exclusivement en courant-imposé, la méthode adoptée est le mode "pont". Il en est de même pour les neurones enregistrés au départ en courant-imposé et soumis par la suite à la technique du potentiel-imposé.

Autrement, lorsqu'une étude pharmacologique approfondie est nécessaire, un même neurone peut être soumis de manière consécutive et répétée aux techniques du potentiel-imposé et du courant-imposé. Dans ce cas, le courant-imposé est utilisé en mode DCC, ce qui permet de conserver le réglage des paramètres de l'amplificateur utilisés en mode dSEVC.

Les conditions requises pour la sélection d'un neurone afin d'en analyser les propriétés électrophysiologiques, sont identiques à celles exposées précédemment dans le paragraphe concernant les enregistrements en courant-imposé effectués en intracellulaire.

VIII. Techniques d'identification neuroanatomique et de marquage intracellulaire

1. Technique d'identification des neurones enregistrés en intracellulaire

a. Injection des marqueurs

Cette technique consiste dans un premier temps à injecter une suspension de particules de latex marquées à la rhodamine (PLR) dans le septum latéral par approche stéréotaxique *in vivo*.

Dans un second temps, les animaux injectés sont utilisés pour les expériences électrophysiologiques sur tranches 14 à 35 jours après l'intervention stéréotaxique. Pendant l'enregistrement électrophysiologique, les neurones enregistrés sont injectés par la biocytine contenue dans la microélectrode.

a1. Injection du traceur fluorescent dans le septum latéral

Les animaux anesthésiés reçoivent une injection unilatérale de PLR. Les coordonnées stéréotaxiques utilisées pour réaliser les injections dans le septum latéral sont :

- distance antéro-postérieure mesurée à partir de l'axe inter-auriculaire: 11mm,
- latéralité par rapport au sinus longitudinal: 1.2mm,
- profondeur par rapport à la surface des méninges: 5mm.

Les PLR (diamètre: 0.02 à 0.2 μ m) sont fournies en suspension dans l'eau distillée (Lumaflor, New-York City, NY) et injectées sans autre dissolution. Deux procédés d'injection ont été utilisés :

~ Dans le premier cas, une seringue Hamilton de 5 μ l à aiguille fixe (75N) est remplie de la solution de PLR puis placée verticalement dans le support micrométrique de l'appareil stéréotaxique. Le piston de la seringue est commandé par une vis sans fin qui assure la démultiplication du déplacement. Des injections de 200nl sont réalisées en 10 minutes.

~ Le second procédé utilise une micropipette de verre, étirée à partir d'un tube de 1mm de diamètre externe, dont la pointe est recassée sous microscope, à 80-100 μ m. Une aiguille de seringue (0.45 \times 12mm) est engagée dans la micropipette et l'étanchéité assurée par un collage à l'araldite. L'aiguille est assujettie au corps d'une seringue Hamilton de 50 μ l (1705 LT), qui est remplie d'huile de paraffine. la micropipette est remplie d'huile jusqu'à la pointe et un petit volume de PLR est prélevé avant l'injection. La seringue est utilisée comme décrit plus haut. Des injections de 250nl sont réalisées en 10 minutes.

L'utilisation du second procédé est apparu préférable car il évite d'importantes remontées du produit le long de l'aiguille et réduit la probabilité d'injection dans le ventricule latéral.

a2. Injection du marqueur intracellulaire dans les neurones enregistrés

Les neurones enregistrés sont injectés par la biocytine contenue dans la microélectrode d'enregistrement. La biocytine est utilisée à la concentration de 2% dans une solution de KCl 0.75M + TRIS 0.025M, pH 7-7.6. Les résistances des microélectrodes sont alors de 45 à 160 M Ω .

L'injection de la biocytine dans le corps cellulaire est accomplie par l'application d'impulsions dépolarisantes réalisées en courant-imposé (mode continu) pendant 1 minute selon les paramètres suivants :

- fréquence de 2.5Hz,
- intensité de 1nA,
- durée de 200ms.

b. Techniques histologiques

b1. Observation des sites d'injection dans le septum latéral

Au cours de la dissection du cerveau qui précède la confection des tranches destinées à l'électrophysiologie, le septum est prélevé et immergé dans une solution de fixateur composé de 4% de paraformaldéhyde dans du tampon phosphate 0.1M contenant 0.9% de NaCl, pH 7,4 (PBS).

Après un séjour de 48 h dans le fixateur, le septum est plongé dans une solution de 20% de sucrose dans le PBS, pour assurer la cryoprotection du tissu.

Le septum est débité en coupes frontales de 80 μm à l'aide d'un cryotome (microtome Leitz 1300 et Kryomat Leitz 1700). Les coupes sont déposées sur lames gélatinées et séchées. Après déshydratation et passage dans le toluène, elles sont montées au Fluoromount (Gurr).

L'observation des sites d'injection est réalisée au microscope optique à épifluorescence (Leitz DMR), équipé d'une lampe au mercure de 200 W, avec le filtre adéquat pour rendre fluorescente la rhodamine (filtre N2,1). Les sites d'injection présentent l'aspect d'une sphère compacte, intensément fluorescente et montrant peu de diffusion.

b2. Observation des cellules marquées par transport axonal rétrograde et des cellules injectées par la biocytine dans le NMD

A la fin de la période d'enregistrement, les tranches contenant les cellules injectées par la biocytine sont fixées une nuit à 4°C dans une solution de PBS contenant 4% de paraformaldéhyde. La prolongation de la durée de fixation jusque 60 h n'altère en rien la qualité du marquage.

Avant la confection des coupes histologiques, la tranche est transférée dans une solution de 20% de sucrose dans le PBS (30min à 1h) puis rincée dans le PBS.

Des coupes de 40µm sont réalisées au cryotome et récupérées dans le PBS à température ambiante.

La technique de détection de la biocytine est basée sur le complexe que cette substance forme en présence d'une avidine couplée à la fluorescéine. Le protocole utilisé rejoint ceux décrits par Horikawa et Armstrong (1988) et Tseng *et al* (1991).

Les coupes sont incubées 10 à 20 min dans une solution de PBS + 2% BSA (Sigma) + 0,25% Triton-X. Elles sont ensuite transférées dans le réactif avidine-fluorescéine (Molecular Probes, Eugene, USA) dilué au 1/200° dans le PBS.

Après une série de rinçages successifs dans le PBS, les coupes sont placées sur lames gélatinées et montées avec un mélange réalisé d'après Platt et Michael (1983): 90ml de glycérine + 10 ml de PBS + 100 mg de p-phénylènediamine (Sigma). Ce milieu contrecarre les effets de la glycérine qui provoque une rapide extinction de la fluorescence du complexe biocytine-avidine-fluorescéine.

Les coupes sont examinées au microscope à fluorescence. Deux filtres sont utilisés en alternance au cours de l'observation d'un même champ. Le premier filtre N2,1 révèle les PLR dans le cytoplasme des cellules. Le deuxième filtre, qui rend fluorescente la fluorescéine (filtre L4), met en évidence les cellules injectées par la biocytine.

Des objectifs à sec de 25x et 40x sont utilisés pour examiner les cellules marquées et pour les photographier (Fujichrome, 400 ASA).

2. Technique d'identification des neurones enregistrés en *patch-clamp*, configuration "cellule entière"

a. Application du marqueur intracellulaire

La technique de *patch-clamp* en configuration cellule entière permet l'introduction, dans le milieu intrapipette, d'un marqueur tel que le Lucifer-Yellow (LY, Fluka). Ce marqueur fluorescent est immédiatement libéré dans le cytoplasme de la cellule après rupture de la membrane.

Le LY est ajouté au milieu intrapipette à la concentration de 0.05% (Konnerth, 1990). Ce marqueur reste neutre, il n'a d'effet ni sur les composants du milieu intrapipette ni sur les propriétés électrophysiologiques membranaires (Onn *et al*, 1993, 1994).

b. Identification des neurones marqués

Le neurone enregistré avec une pipette contenant du LY peut être retrouvé sur des coupes de 40 μ m réalisées au cryotome ou sur des coupes de 12 μ m réalisées au cryostat (Reichert). Il est alors visible au microscope optique à épifluorescence équipé du filtre E4.

Des objectifs à sec de 25x et 40x sont utilisés pour examiner les neurones marqués et pour les photographier (Fujichrome, 400 ASA) (figure 1C).

Des observations des neurones marqués ont également été réalisées au microscope confocal au cours d'une démonstration Leica (figure 1D).

PREMIÈRE PARTIE

Propriétés électriques des neurones de la région du noyau
magnocellulaire dorsal de l'hypothalamus de cobaye : étude en
courant-imposé

INTRODUCTION

Dans cette première partie, les propriétés membranaires des neurones du NMD ont été étudiées en courant-imposé sur tranches de cerveau de 400µm. Comme l'emplacement du noyau ne peut être apprécié au cours de la session d'enregistrement que sur la base de la localisation des structures bien repérables sur la tranche (3^{ème} ventricule, fornix), des neurones situés en dehors des limites du noyau ont également été enregistrés. Une identification par injection intracellulaire et transport axonal rétrograde a donc été réalisée pour déterminer si les neurones appartenant réellement au NMD présentaient des propriétés intrinsèques particulières par rapport à l'ensemble des neurones enregistrés.

RÉSULTATS

Les enregistrements ont été effectués sur 103 neurones appartenant au NMD ou aux régions voisines: 63 neurones ont été enregistrés avec des microélectrodes fines et 40 avec des pipettes de *patch-clamp*.

Deux classes, correspondant aux neurones de type I et aux neurones de type II, seront identifiées au cours de l'analyse des propriétés dynamiques des neurones (paragraphe IV). Pour les neurones de type I, seront distingués les neurones déchargeant sous forme de bouffées de potentiels d'action (neurones avec bouffées de potentiels d'action ou aBPA) et ceux ne présentant pas ce mode de décharge (neurones sans bouffée de potentiels d'action ou sBPA).

I. Propriétés électrophysiologiques passives

Le Tableau 7 donne les valeurs moyennes des propriétés électriques passives des neurones enregistrés en intracellulaire avec des microélectrodes fines (solution extracellulaire *a*) et en *patch-clamp*, configuration "cellule entière", avec des pipettes (solution intrapipette *l* et solution extracellulaire *a*).

1. Le potentiel de repos

Le PR des neurones est mesuré en fin d'enregistrement lorsque l'électrode est retirée de la cellule. La valeur moyenne du PR est de $-55.4 \pm 6.8\text{mV}$ ($n=63$) avec des microélectrodes fines et elle est de $-56.8 \pm 5.4\text{mV}$ ($n=40$) avec des pipettes de *patch-clamp*. Il n'existe pas de différence significative entre les résultats obtenus avec les deux méthodes d'enregistrement.

2. La constante de temps de membrane

La constante de temps de membrane (τ) est déterminée au PR en imposant des créneaux

Tableau 7. Valeurs moyennes des principales caractéristiques électrophysiologiques des 2 types de neurones localisés dans la région du NMD.

	Neurones de type I				Neurones de type II		TOTAL	
	Neurones avec bouffées de PA (neurones aBPA)		Neurones sans bouffée de PA (neurones sBPA)					
	(n=41)		(n=41)		(n=21)		(n=103)	
	électrode fine	pipette de patch	électrode fine	pipette de patch	électrode fine	pipette de patch	électrode fine	pipette de patch
<i>n</i>	25	16	27	14	11	10	63	40
PR, mV	-54,5 ± 6,84	-56,3 ± 5,84	-56,0 ± 6,32	-56,1 ± 3,80	-55,9 ± 7,86	-58,9 ± 6,27	-55,4 ± 6,85	-56,8 ± 5,40
Amplitude PA, mV	57 ± 6,07	60 ± 11,14	56 ± 4,20	57 ± 7,07	54 ± 6,74	59 ± 10,01	56 ± 5,56	59 ± 9,71
Rmb, MΩ	145 ± 44,4	272 ± 88,4	127 ± 45,4	291 ± 87,1	115 ± 37,8	244 ± 85,1	*132 ± 45,6	*270 ± 88,9
τ, ms	48,1 ± 14,5	54,8 ± 22,2	44,4 ± 21,4	54,6 ± 16,4	46,9 ± 26,0	60,0 ± 21,0	**46,8 ± 20,1	**56,0 ± 20,2

Comparaison des résultats obtenus en courant-imposé avec des microélectrodes fines et avec des pipettes de patch. Les valeurs moyennes (\pm écart-type) des principales propriétés membranaires ne sont pas différentes de manière significative entre les neurones enregistrés en intracellulaire et les neurones enregistrés en patch-clamp, sauf pour la résistance membranaire Rmb (*, $P < 0.001$) et pour la constante de temps membranaire τ (**, $P < 0.02$). Les valeurs moyennes de potentiel de repos (PR), d'amplitude de PA (potentiel d'action), de Rmb et de τ ne sont pas différentes de manière significative entre les différentes classes de neurones.

Figure 4. Rectifications anormales de sens entrant exprimées dans trois neurones enregistrés dans la région du NMD, en *patch-clamp*.

Dans toutes les illustrations en courant-imposé, les enregistrements en *patch-clamp* seront indiqués par une pointe de flèche pleine située sur la gauche de la trace en potentiel, tandis que les enregistrements obtenus avec des microélectrodes fines seront indiqués par une pointe de flèche vide. Ces pointes de flèche montrent le niveau du PR, dont la valeur en mV est indiquée en dessous.

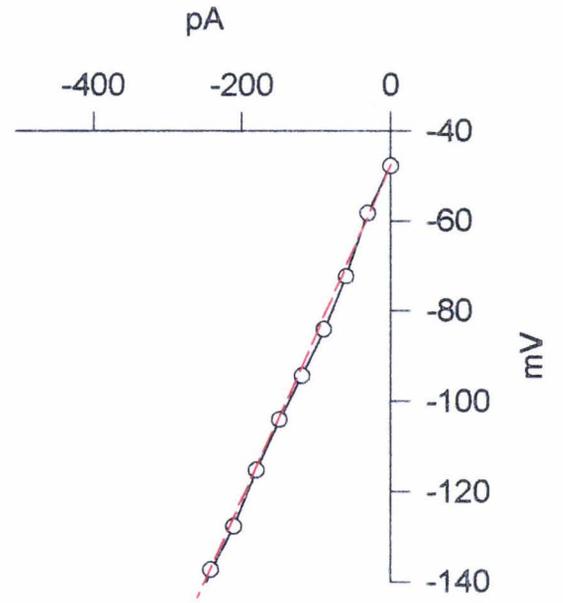
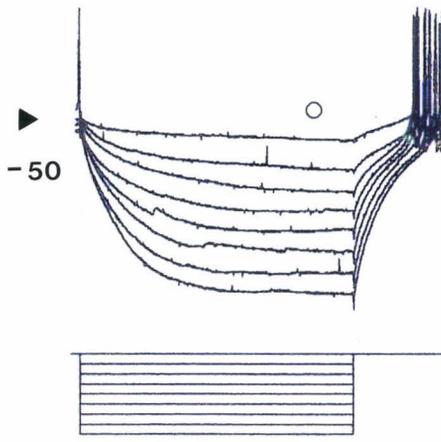
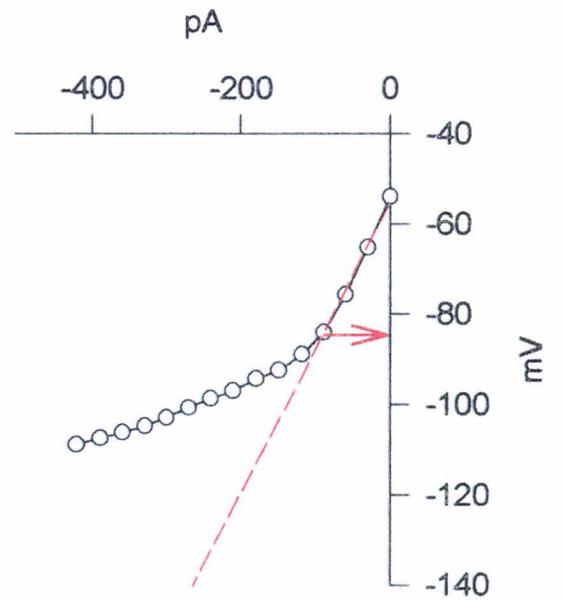
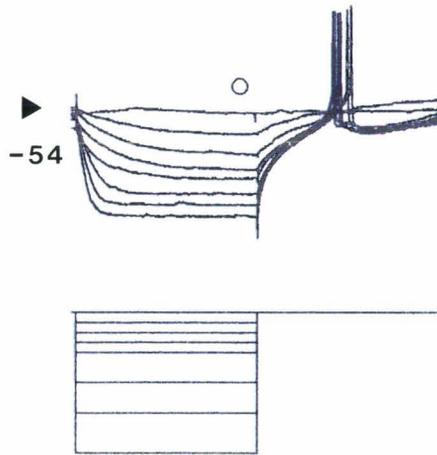
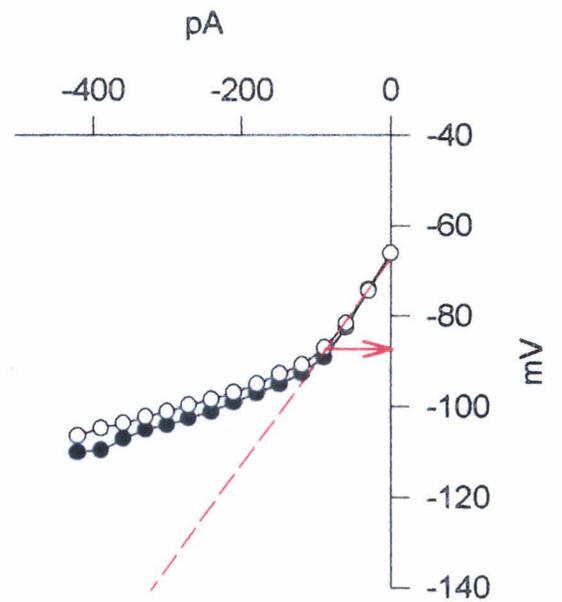
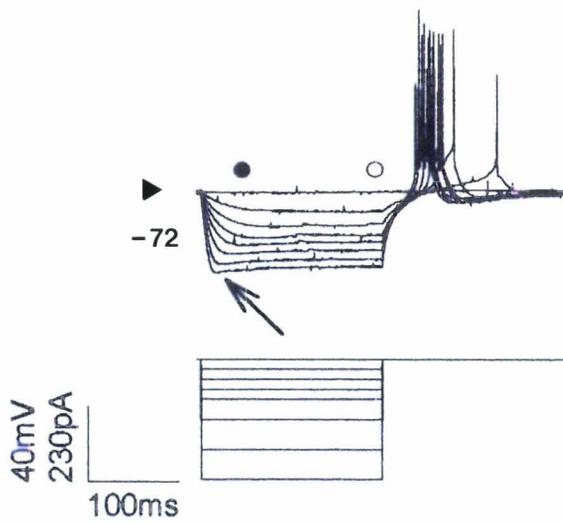
Les neurones ont subi une série de créneaux hyperpolarisants appliquée à partir du PR (*à gauche*). Les réponses obtenues ont permis la réalisation des courbes courant-potential (*à droite*) illustrant la présence ou l'absence de rectifications anormales et de mesurer leur seuil d'activation.

A. Réponses superposées du potentiel membranaire d'un neurone aBPA de type I. Les mesures du potentiel sont effectuées au point indiqué par le cercle vide. La courbe courant-potential est linéaire, ce qui indique l'absence de toute rectification anormale. Ce neurone est également illustré dans la figure 7C.

B. Réponses superposées du potentiel membranaire d'un neurone sBPA de type I indiquant la présence d'une rectification anormale instantanée. Les mesures du potentiel membranaire sont effectuées au point indiqué par le cercle vide. La courbe courant-potential d'abord linéaire montre une inflexion à partir de -85mV environ. Ce neurone est également illustré dans la figure 10C.

C. Réponses superposées du potentiel membranaire d'un autre neurone aBPA de type I indiquant la présence de deux rectifications anormales. Les mesures du potentiel membranaire sont réalisées en début de réponse (indiqué par le cercle plein) d'une part et en fin de réponse (indiqué par le cercle vide) d'autre part. Les courbes courant-potential issues de ces mesures montrent l'existence d'une rectification anormale instantanée (seuil d'activation proche de -90mV) et d'une rectification anormale dépendante du temps (seuil d'activation proche de -80mV) provoquant un léger fléchissement du potentiel membranaire (flèche sur les traces superposées). Ce neurone est également illustré dans la figure 6.

Barres d'échelle: 40mV, 230pA, 100ms.

A**B****C**

de courant hyperpolarisant de 0.15nA et en mesurant les réponses électrotoniques induites du potentiel de membrane. Par définition τ représente le temps mis par le potentiel membranaire pour atteindre 63% de la déflexion maximale du potentiel électrotonique. La valeur moyenne de τ enregistré avec des microélectrodes fines est de $46.8 \pm 20.1\text{ms}$ ($n=63$) et avec des pipettes de *patch-clamp* elle est de $56 \pm 20.2\text{ms}$ ($n=40$). Ces résultats sont différents de manière significative ($P<0.02$).

3. La résistance membranaire

La valeur de la résistance membranaire (R_{mb}) est obtenue en mesurant la déflexion du potentiel de membrane obtenue par l'imposition d'un créneau hyperpolarisant d'intensité connue. Lorsque la courbe du potentiel en fonction du courant injecté (courbe courant-potentiel) est réalisée à l'aide de créneaux de courant hyperpolarisant d'amplitudes croissantes, la résistance membranaire du neurone analysé est alors déduite de la partie linéaire de cette courbe. La valeur moyenne de la R_{mb} est de $132 \pm 45.6 \text{ M}\Omega$ ($n=63$) avec des microélectrodes fines et elle est de $270 \pm 88.9 \text{ M}\Omega$ avec des pipettes de *patch-clamp*. Ces résultats sont différents de manière significative ($P<0.001$).

II. Les rectifications membranaires "anormales" de sens entrant

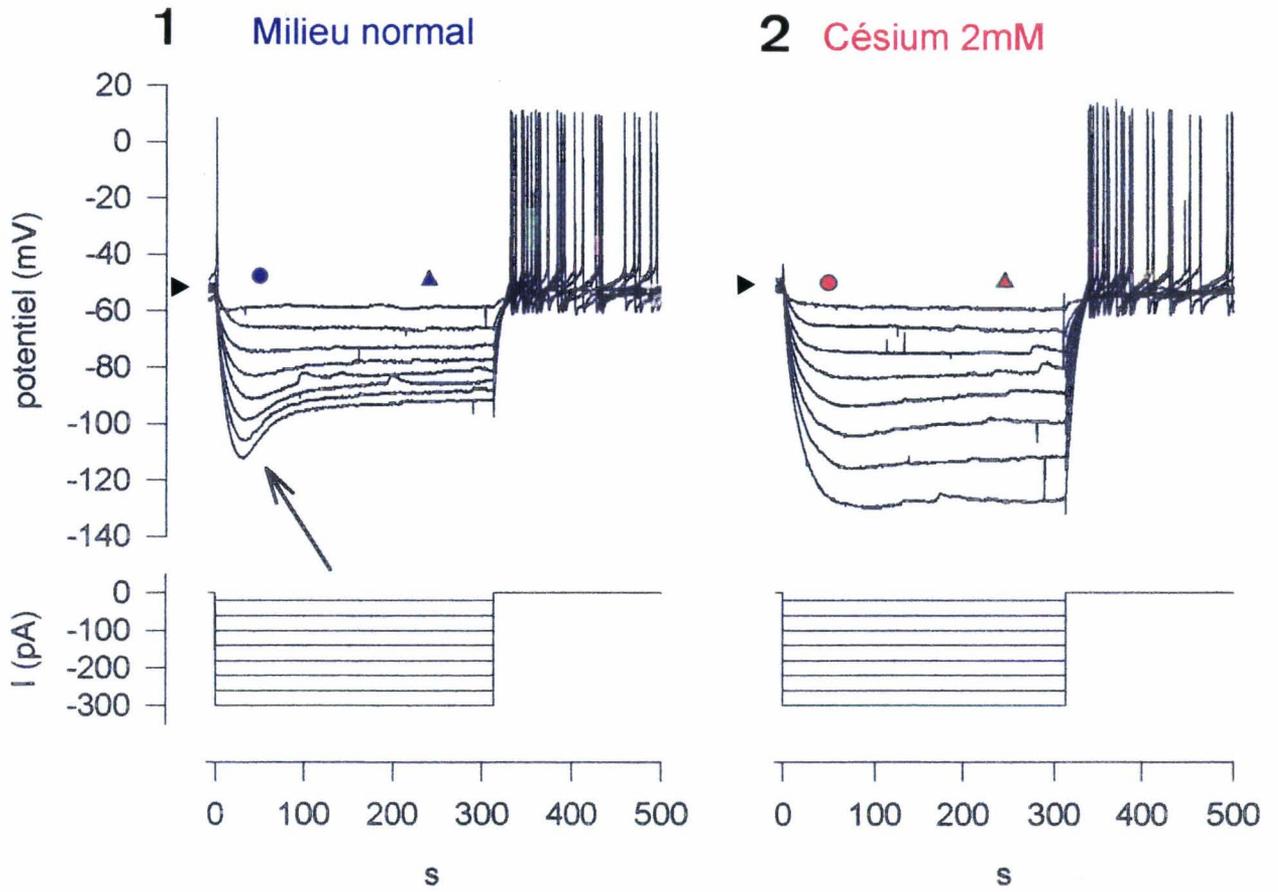
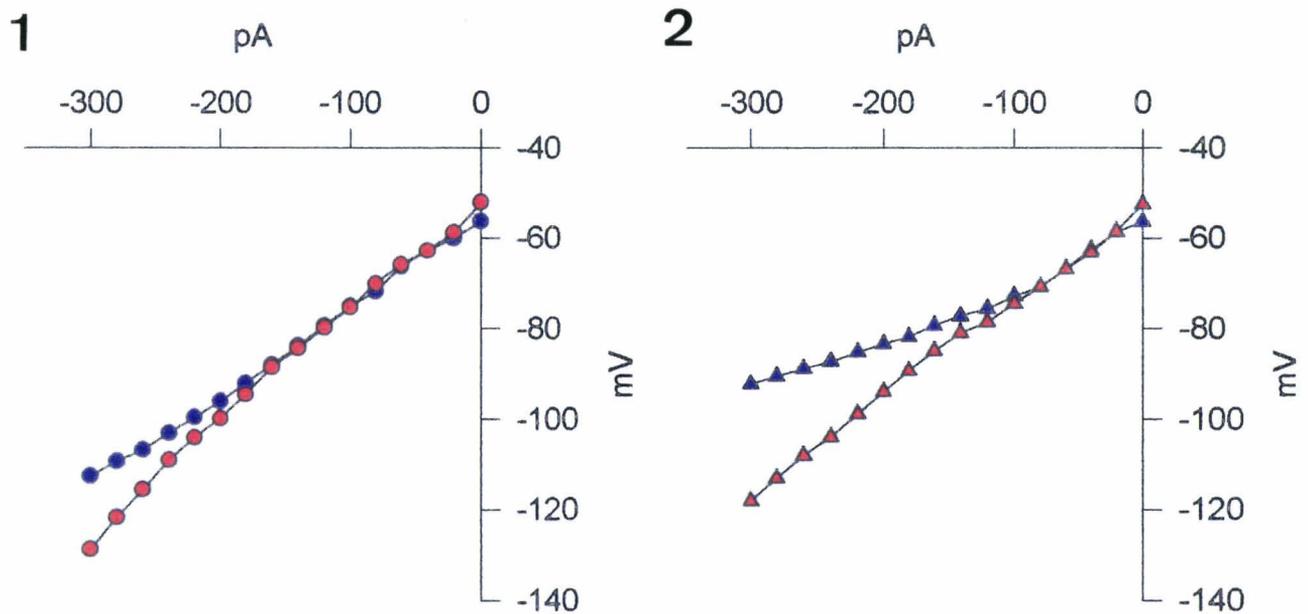
Certains neurones montrent une inflexion prononcée de leur réponse électrotonique lorsque sont appliqués des créneaux de courant hyperpolarisant (figures 4C et 5A). Cela indique la présence d'une rectification dite "anormale", dépendante du temps. Des courbes courant-potentiel sont réalisées pour 39 neurones: 18 neurones ont été étudiés avec des microélectrodes fines et 21 neurones ont été enregistrés avec des pipettes de *patch-clamp*.

Les protocoles de stimulation sont effectués à partir du PR des neurones et sont incrémentés par pas de 10 ou de 20pA.

Pour 8 neurones, ces courbes montrent que la rectification dépendante du temps apparaît pour des potentiels membranaires inférieurs à -70mV et reste active à -130mV (figures 4C et 5A). Les courbes ne sont pas linéaires, ce qui suggère la présence d'une rectification dite "anormale" instantanée, qui s'ajoute à la rectification dépendante du temps. Cette rectification instantanée est activée à partir d'un potentiel membranaire de -80mV environ et elle est observée pour 34

Figure 5. Effet du césium 2mM appliqué par perfusion extracellulaire sur les rectifications anormales de sens entrant présentes dans un neurone enregistré dans la région du NMD, en patch-clamp.

A. Les enregistrements du potentiel sont issus d'un neurone sBPA de type I sur lequel une série de créneaux de courant dépolarisant est appliquée à partir du PR. (A1) Les réponses sont obtenues en milieu extracellulaire normal α , elles indiquent la présence de deux rectifications, l'une instantanée et l'autre dépendante du temps, cette dernière est signalée par un net fléchissement du potentiel membranaire en début de réponse au choc (flèche). (A2) L'application de 2mM de césium directement dans le milieu extracellulaire α supprime les deux types de rectification anormale. **B.** Des mesures du potentiel membranaire sont effectuées à partir des enregistrements illustrés en A et à des temps différents indiqués par la présence des symboles (cercle: mesure en début de réponse; triangle: mesure en fin de réponse). (B1) Les courbes courant-potentiel réalisées en milieu normal (cercles bleus) et après addition de césium (cercles rouges) montrent que la rectification instantanée dont le seuil se situe vers -90mV est supprimée en présence de césium, ce blocage est illustré par la linéarisation de la courbe. (B2) Les courbes courant-potentiel réalisées en milieu normal (triangles bleus) et après addition de césium (triangles rouges) illustrent un phénomène de linéarisation après césium, indiquant la suppression totale de tout type de rectification anormale.

A**B**

neurones (figures 4B et 4C). Les deux types de rectification apparaissent simultanément pour 8 neurones. Cinq neurones ne montrent aucun type de rectification (figure 4A)

Les deux types de rectification anormale sont abolies par l'addition de césium (CsCl 2mM) dans le milieu de perfusion extracellulaire α (figures 5A et 5B). L'effet du césium est réversible au bout de 20 min lorsque la tranche est remplacée en présence de la solution extracellulaire d'origine (non illustré).

III. Activité spontanée des neurones au potentiel de repos

1. Neurones sans activité spontanée au PR

Sur 99 neurones testés, 40 d'entre eux (40.4%) ne montrent pas de déclenchement spontané de potentiels d'action au PR. Une décharge répétitive de potentiels d'action peut alors être évoquée en appliquant un courant dépolarisant de manière continue (figure 6A1).

2. Neurones avec activité spontanée au PR

Les neurones actifs spontanément au PR (figure 7A1, 7B1 et 10A) montrent des fréquences de décharge de potentiels d'action comprises entre 2 et 10 Hz.

L'amplitude des potentiels d'action est mesurée à partir du seuil de déclenchement jusqu'au sommet du potentiel d'action et elle est de 56 ± 5.5 mV ($n=63$) avec des microélectrodes fines et de 59 ± 9.7 mV ($n=40$) avec des pipettes de *patch-clamp*. Ces résultats obtenus avec les deux méthodes d'enregistrement ne sont pas différents de manière significative.

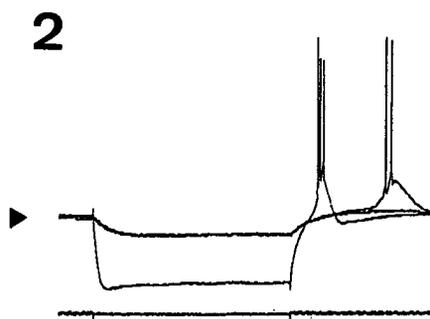
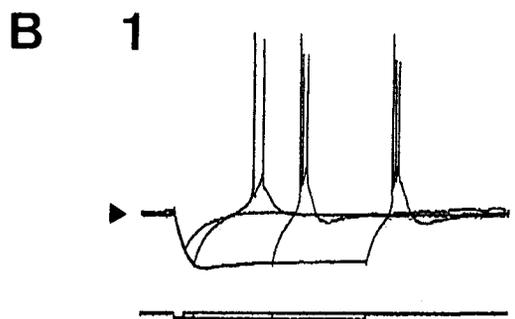
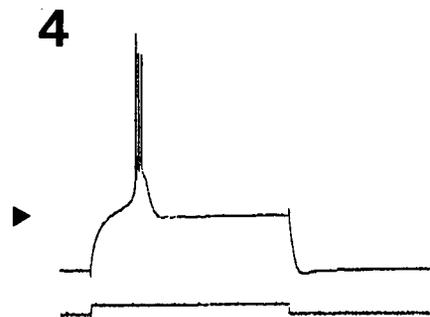
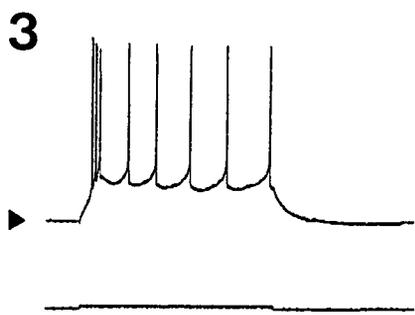
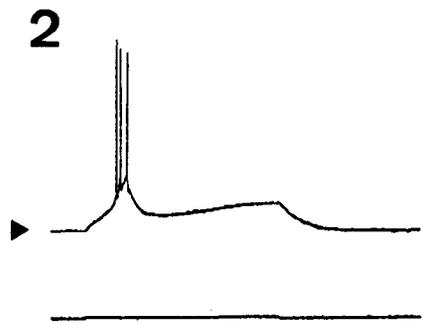
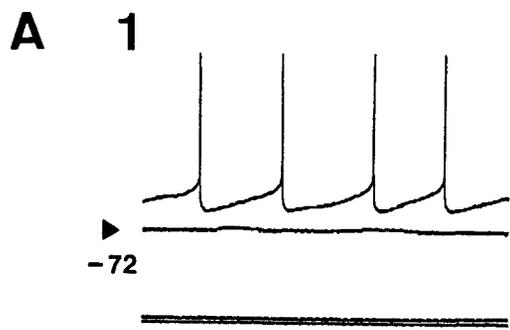
Les potentiels d'action présentent deux types de post-hyperpolarisation. Dans certains cas, une post-hyperpolarisation biphasique est observée. Celle-ci consiste en une repolarisation rapide du potentiel d'action suivie d'une post-hyperpolarisation plus lente. Un rebond dépolarisant, dont l'amplitude varie selon les neurones, sépare alors la post-hyperpolarisation rapide de la post-hyperpolarisation lente (figures 7A1, 7B1 et 10A). Dans d'autres cas, les potentiels d'action sont suivis par une post-hyperpolarisation unique et ample (figure 6A1).

L'application de $2\mu\text{M}$ de TTX provoque la suppression de la décharge des potentiels d'action. Sous TTX, des oscillations du potentiel de membrane ne sont jamais observées ni au PR

Figure 6. Activité spontanée et décharge d'un neurone aBPA de type I enregistré dans la région du NMD, en *patch-clamp*.

A. (A1) Au PR, aucune activité spontanée n'est déclenchée mais des potentiels d'action générés spontanément sont obtenus lorsque la membrane est dépolarisée à -57mV . (A2) Au PR, l'application d'un créneau de courant dépolarisant produit un potentiel dépolarisant lent sur lequel une bouffée de potentiels d'action est déclenchée. (A3) Lorsque l'intensité du créneau de courant dépolarisant augmente, le potentiel dépolarisant est alors suivi par une décharge répétitive de potentiels d'action. (A4) L'amplitude maximale du potentiel dépolarisant lent est atteinte lorsque le potentiel membranaire est hyperpolarisé à -84mV . **B.** (B1) Un potentiel dépolarisant lent est évoqué en rebond au PR à la suite d'un créneau de courant hyperpolarisant (4 traces superposées). Son amplitude, sa pente ascendante et le nombre de potentiels d'action émis à son sommet augmentent lorsque la durée du créneau de courant hyperpolarisant augmente. (B2) Le même phénomène est observé en réponse à des créneaux de courant hyperpolarisant d'intensité croissante (3 traces superposées).

Barres d'échelle: 40mV , 2nA et 100ms .



ni pour des niveaux de potentiel plus dépolarisés atteints grâce à une application continue d'un courant positif.

IV. Classification électrophysiologique des neurones de la région du NMD par analyse de leurs propriétés dynamiques

Deux classes distinctes sont définies à partir des 103 neurones enregistrés.

Les neurones de type I, qui constituent 79.6% de l'échantillon total ($n=82$), génèrent des potentiels dépolarisants lents en réponse à des créneaux de courant dépolarisant lorsqu'un courant négatif est imposé en continu. Le potentiel dépolarisant lent est représenté par une dépolarisation lente et momentanée du potentiel membranaire.

Cette première classe de neurones est subdivisée en deux sous-groupes distincts en fonction de la capacité du potentiel dépolarisant lent à générer une bouffée de potentiels d'action (neurones de type I aBPA) ou à ne générer qu'un seul, voire aucun, potentiel d'action (neurones de type I sBPA).

Les neurones de type II, qui correspondent aux neurones restant (20.4% de l'échantillon, $n=21$), n'évoquent jamais de potentiels dépolarisants lents.

Les neurones de l'échantillon global ne montrent pas de différence significative pour les valeurs du PR, de τ , de la résistance membranaire et de l'amplitude des potentiels d'action (Tableau 7).

1. Les neurones de type I

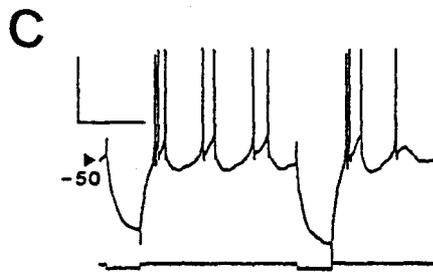
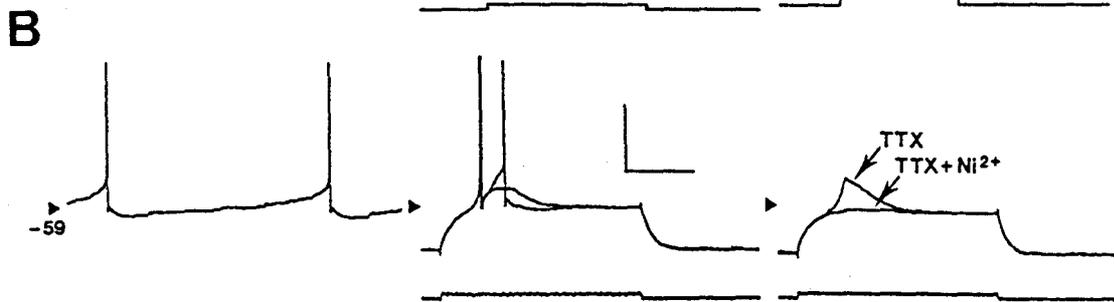
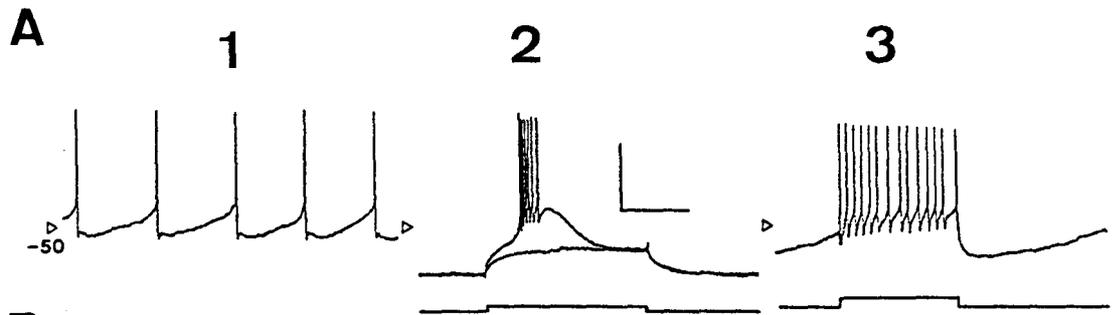
a. Les neurones de type I avec bouffée de potentiels d'action (neurones aBPA)

Quarante et un neurones de type I sont répertoriés en tant que neurones aBPA: 25 sont enregistrés avec des microélectrodes fines et 16 avec des pipettes de *patch-clamp*.

Figure 7. Caractéristiques électrophysiologiques des neurones aBPA de type I enregistrés dans la région du NMD.

A. (A1) Activité spontanée obtenue au PR. (A2) Des créneaux de courant dépolarisant d'intensité croissante et appliqués à partir d'un niveau hyperpolarisé (-78mV) déclenchent un potentiel dépolarisant lent sur lequel une bouffée de potentiels d'action est émise. (A3) Un train de potentiels d'action est obtenu en réponse à l'application d'un créneau dépolarisant à partir d'un potentiel membranaire moins hyperpolarisé (-61mV). Ce neurone marqué par la biocytine est localisé dans le NMD. **B.** (B1) Activité spontanée au PR d'un autre neurone. (B2) Un potentiel dépolarisant lent est généré par l'application d'un saut de courant dépolarisant à partir de -84mV (2 réponses pour le même choc sont ici superposées). Les réponses consistent en l'émission d'un ou de deux potentiels d'action au sommet du potentiel dépolarisant lent; elles se différencient de la réponse en bouffée de potentiels d'action décrite dans la figure 6 et ici en A. (B3) Le potentiel dépolarisant lent est complètement supprimé après la perfusion de la solution α dans laquelle 500 μ M de Ni^{2+} et 2 μ M de TTX sont ajoutés. **C.** Oscillations du potentiel membranaire obtenues en rebond lors de l'enregistrement d'un autre neurone. Des créneaux de courant hyperpolarisant appliqués à partir du PR génèrent une série décroissante de potentiels dépolarisants lents.

Barres d'échelle: 40mV, 2nA et 100ms.



a1. Description du potentiel dépolarisant lent dans les neurones aBPA de type I

Pour les neurones ayant un PR inférieur à -70mV , des créneaux de courant dépolarisant, appliqués à partir du PR, permettent l'expression d'un potentiel dépolarisant lent robuste supportant une bouffée de potentiels d'action sodiques (figure 6A2). Ce potentiel dépolarisant lent est semblable aux LTS décrits précédemment pour d'autres neurones (Llinás, 1988).

En général, le PR des neurones enregistrés lors de cette étude n'est pas assez négatif pour permettre le déclenchement d'un potentiel dépolarisant lent en réponse au créneau de courant dépolarisant. La stimulation des neurones produit alors uniquement des trains de potentiels d'action (figure 6A3) dont la fréquence augmente lorsque l'intensité du courant injecté augmente.

Les potentiels dépolarisants lents sont générés soit lorsque le PR est suffisamment bas (figure 6A2) soit par une hyperpolarisation artificielle générée par une injection continue de courant négatif (figures 6A4, 7A2 et 7B2). Ils atteignent leur amplitude maximale lorsque le potentiel de membrane est proche de -90mV (figures 6A4, 7A2 et 7B2).

Les figures 6A2-4 montrent que l'amplitude des potentiels dépolarisants lents est dépendante de la valeur du potentiel de membrane et qu'elle augmente avec l'hyperpolarisation.

Les potentiels dépolarisants lents peuvent également être observés à la fin d'un créneau de courant hyperpolarisant comme les figures 6B1, 6B2 et 7C l'illustrent.

Lorsque l'intensité du créneau est augmentée, l'amplitude du potentiel dépolarisant ainsi que le nombre de potentiels d'action générés à son sommet croissent également.

La pente de la phase ascendante du potentiel dépolarisant lent augmente de manière concomitante avec la diminution de la durée totale du potentiel dépolarisant lent (figure 6B1). Cette évolution de la pente du potentiel dépolarisant lent est observée aussi bien avec des créneaux dépolarisants d'amplitude croissante (non illustré), qu'à la fin des créneaux hyperpolarisants de durées variables (figure 6B2).

Dans quelques cas, le retour au PR après un créneau de courant hyperpolarisant produit une série de potentiels dépolarisants lents dont l'amplitude diminue progressivement provoquant en conséquence une diminution du nombre de potentiels d'action évoqués à leur sommet (figure 7C).

Les potentiels dépolarisants lents présentent de grandes variations de durée comme le montrent les figures 6A4, 7A2 et 7B2. La pente ascendante des potentiels dépolarisants lents varie selon les neurones enregistrés mais dans tous les cas, la phase ascendante de ces potentiels

Figure 8. Effets du TEA et du $ZnCl_2$ sur les potentiels dépolarisants lents produits par deux neurones aBPA de type I enregistrés dans la région du NMD, en *patch-clamp*.

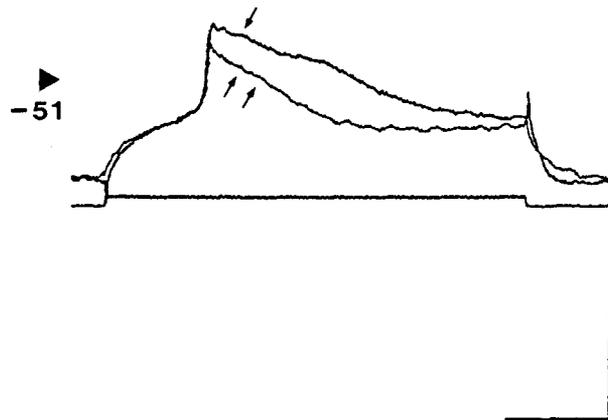
A. L'application de 10mM de TEA dans la solution extracellulaire α provoque un ralentissement de la repolarisation du potentiel dépolarisant lent pour ce neurone enregistré en présence de 2 μ M de TTX. Les réponses du neurone enregistrées avant et après l'application de TEA sont superposées; la simple flèche indique le potentiel obtenu en milieu normal et la double flèche celui obtenu en présence de TEA. **B.** L'addition de 100 μ M de $ZnCl_2$ sur un autre neurone enregistré sous TTX provoque la réduction de l'amplitude du potentiel dépolarisant lent sans modifier la pente de la phase dépolarisante du potentiel. Les réponses du neurone avant et après l'addition du $ZnCl_2$ dans la solution extracellulaire α sont superposées; la simple flèche indique le potentiel dépolarisant obtenu en milieu α normal et la double flèche celui obtenu en présence du $ZnCl_2$.

Barres d'échelle: 40mV, 2nA et 100ms.

A Effet du TEA (10mM)



B Effet du ZnCl₂ (100μM)



est toujours plus rapide que leur phase descendante. Ces variations de durée sont observées de manière plus évidente en présence de $2\mu\text{M}$ de TTX dans le milieu de perfusion, qui supprime les potentiels d'action sodiques au sommet des potentiel dépolarisants lents. Il faut noter que l'application de la TTX n'a pas d'effet bloquant sur les potentiels dépolarisants lents.

Sous TTX, l'amplitude des potentiels dépolarisants lents s'échelonne de 19 à 39mV (moyenne: $26.7 \pm 8.6\text{mV}$, $n=6$) et leur durée de 70 à 175ms (moyenne: $138.2 \pm 39\text{ms}$, $n=6$).

a2. Modulation pharmacologique du potentiel dépolarisant lent

α . Effet des bloqueurs des conductances calciques

L'application des bloqueurs classiques des conductances calciques indique la nature calcique des potentiels dépolarisants lents. En effet, des applications de $500\mu\text{M}$ de Ni^{2+} ajoutés dans la solution *a* (figure 7B3) et de 2.3mM de Co^{2+} dans la solution *b* (non illustré) suppriment les potentiels dépolarisants lents.

β . Effet du TEA

L'application de 10mM de TEA par le milieu de perfusion *a* provoque une augmentation de la durée de la repolarisation du potentiel dépolarisant lent (figure 8A) ($n=2$). Cette modulation dépend de l'amplitude initiale du potentiel dépolarisant laissant supposer que la conductance potassique retardée I_K , également responsable de la repolarisation rapide des potentiels d'action sodiques, participe au phénomène de repolarisation rapide des potentiels dépolarisants lents.

δ . Effet du zinc (Zn^{2+})

L'addition de ZnCl_2 $100\mu\text{M}$ dans le milieu de perfusion *a* induit une réduction de l'amplitude du potentiel dépolarisant lent sans modifier la pente ascendante du potentiel (figure 8B) ($n=2$).

a3. Les rectifications anormales

Les relations entre le courant et le potentiel pour les neurones aBPA de type I montrent

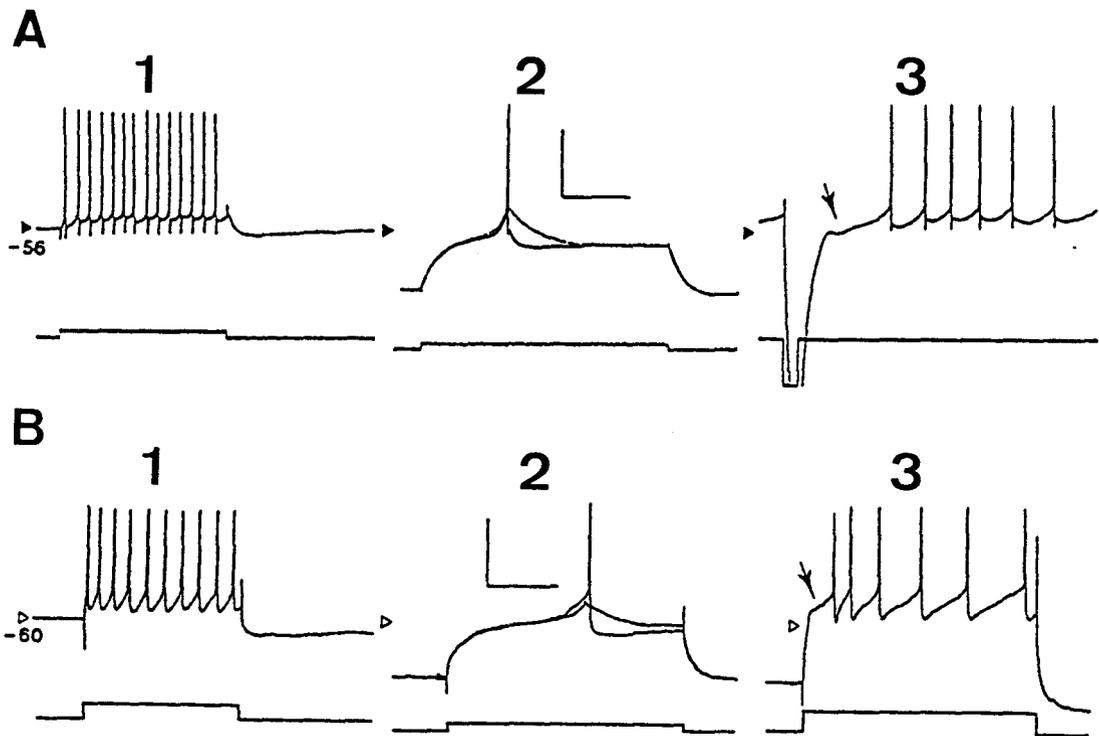


Figure 9. Variations du potentiel membranaire observées en réponse à des créneaux de courant appliqués sur deux neurones sBPA de type I enregistrés dans la région du NMD.

A. Les trois figures proviennent de l'enregistrement d'un même neurone. (A1) L'application de créneaux de courant dépolarisant à partir du PR induit une décharge répétitive de potentiels d'action. (A2) Après avoir hyperpolarisé la membrane à -88mV , un créneau de courant dépolarisant déclenche l'apparition d'un potentiel dépolarisant lent sur lequel un seul potentiel d'action est émis (deux réponses au même choc sont superposées). (A3) Suite à un créneau de courant hyperpolarisant de grande intensité appliqué à partir du PR, le retour à la ligne de base retardé (flèche) indique l'existence d'une rectification transitoire de sens sortant. **B.** (B1-B2) Un neurone différent présente le même type de décharge que le neurone illustré en A. (B3) La rectification transitoire de sens sortant est mise en évidence pour le même neurone par l'apparition d'un délai (flèche) avant le déclenchement du train de potentiels d'action. Ce neurone, marqué avec la biocytine, appartient au NMD.

Barres d'échelle: 40mV , 2nA , 100ms .

une certaine hétérogénéité: 12 des 16 neurones montrent une rectification instantanée, et 3 d'entre eux une rectification dépendante du temps (figure 4C). Quatre neurones produisent une courbe courant-potentiel linéaire témoignant de l'absence de toute rectification (figure 4A).

b. Les neurones de type I sans bouffée de potentiels d'action (neurones sBPA)

Quarante et un neurones sont classés en tant que neurones sBPA de type I; 27 sont enregistrés avec des microélectrodes fines et 14 avec des pipettes de *patch-clamp*.

Ce groupe de neurones est également caractérisé par un potentiel dépolarisant lent qui est produit en réponse à des créneaux de courant dépolarisant lorsque le potentiel membranaire est plus négatif que -70mV (figures 9A2, 9B2, 10B1, 10C1 et 10C2) ou lors du retour au PR suite à un créneau de courant hyperpolarisant (figures 10B2, 10C3 et 10D).

La différence principale entre les potentiels dépolarisants lents décrits dans les deux groupes de neurones réside dans le fait que le potentiel dépolarisant lent des neurones sBPA de type I ne génère jamais de bouffée de potentiels d'action mais il déclenche au maximum l'apparition d'un seul potentiel d'action.

Une fois ce potentiel d'action émis, la post-hyperpolarisation repolarise la membrane de manière abrupte (figures 9A2, 9B2, 10B1, 10B2 et 10C1). Une analyse complète de cette post-hyperpolarisation n'est pas réalisée lors de cette étude. Néanmoins, des mesures de l'amplitude maximale de la post-hyperpolarisation montrent une différence significative entre les deux sous-groupes de neurones. Ces mesures indiquent que l'amplitude de la post-hyperpolarisation des neurones sBPA de type I est plus importante (moyenne: 19.6 ± 4.1 mV, $n=33$) que celle des neurones aBPA de type I (moyenne: 15.5 ± 2.7 mV, $n=32$; $P<0.001$).

Une autre différence significative ($P<0.001$) est montrée au niveau des amplitudes des potentiels dépolarisants lents produits par les deux groupes de neurones de type I. En effet les neurones sBPA de type I génèrent des potentiels dépolarisants lents d'amplitude moyenne inférieure à ceux déclenchés par les neurones aBPA de type I. En présence de TTX $2\mu\text{M}$, l'amplitude des potentiels dépolarisants lents des neurones sBPA de type I varie de 10 à 20mV (moyenne: 14.1 ± 3.3 mV, $n=5$).

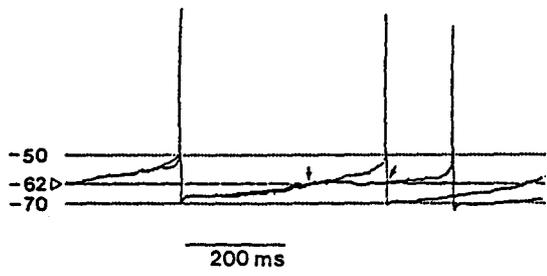
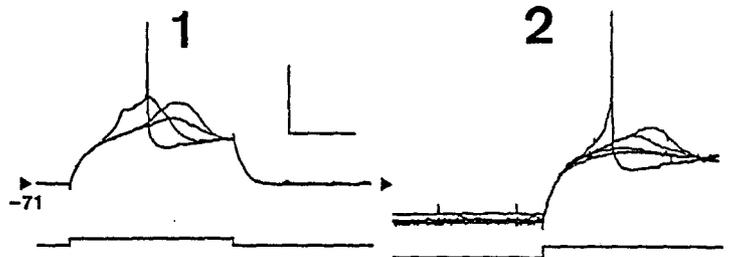
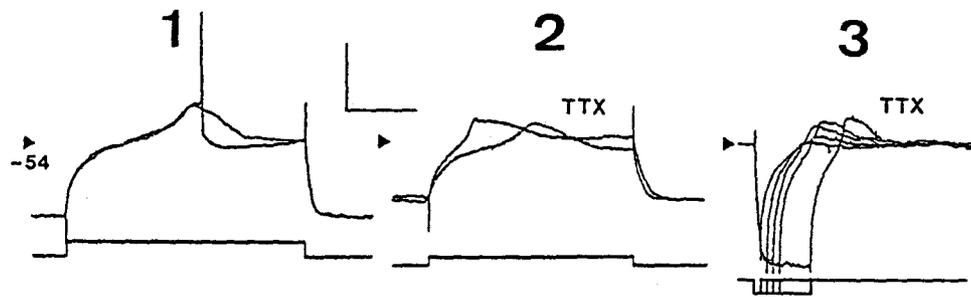
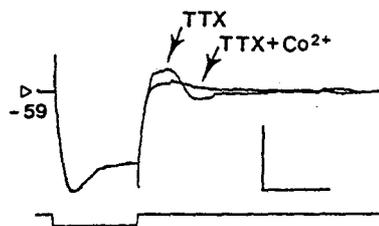
Par contre les durées des potentiels dépolarisants des neurones des deux groupes ne sont pas différentes de manière significative; elles sont comprises entre 140 et 180ms (moyenne: 159.3 ± 16.9 ms, $n=5$) pour les neurones sBPA de type I.

Lors de leur activité spontanée, la plupart des neurones sBPA de type I montrent une

Figure 10. Activité spontanée et caractéristiques du potentiel dépolarisant lent exprimé par des neurones sBPA de type I enregistrés dans la région du NMD.

A. Activité spontanée caractéristique. Noter la lente dépolarisation jusqu'au seuil de déclenchement du potentiel d'action et l'ample post-hyperpolarisation qui le suit. En superposant deux traces, l'inflexion du potentiel de membrane (flèche) indiquant le niveau du PR (-62mV) est clairement apparente. **B.** Deux séries de traces superposées et enregistrées à partir d'un autre neurone sont présentées. (B1) Cette première série de traces illustrant l'augmentation de l'amplitude et de la pente ascendante du potentiel dépolarisant lent est obtenue suite à l'application d'une série de créneaux de courant dépolarisant incrémentés de 3pA (l'incrémentation des créneaux de courant n'est pas apparente à l'échelle de la figure). Noter le point d'inflexion dans la phase ascendante du potentiel dépolarisant lent, indiquant la présence de la rectification transitoire de sens sortant. (B2) Une deuxième série de traces illustrant le même phénomène qu'en B1 est obtenue en réponse à l'application d'une série de créneaux de courant hyperpolarisant. **C.** Un neurone différent génère un potentiel dépolarisant lent en réponse à l'application d'un créneau de courant dépolarisant lorsque le potentiel de membrane est maintenu à -90mV (deux traces en réponse au même choc sont superposées en C1). En présence de 2 μ M de TTX, l'amplitude et la pente ascendante du potentiel dépolarisant lent augmentent soit lorsque l'intensité du créneau de courant hyperpolarisant croît par pas de 3pA en C2, soit lorsque la durée du créneau hyperpolarisant augmente en C3. **(D)** Pour une autre cellule, l'application de créneaux de courant hyperpolarisant à partir du PR et en présence de 2 μ M de TTX met en évidence d'une part une rectification dépendante du temps signalée par le fléchissement du potentiel membranaire et d'autre part un potentiel dépolarisant lent qui est aboli après perfusion de la solution extracellulaire *b* comprenant 2.4mM de Co²⁺ à la place du Ca²⁺.

Barres d'échelle: 40mV, 2nA, 100ms.

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

dépolarisation initiale caractéristique amenant le potentiel membranaire au seuil de déclenchement du potentiel d'action. Pour ces cellules, la fin de la post-hyperpolarisation d'un potentiel d'action et le départ de la dépolarisation initiale précédant le prochain potentiel d'action sont indiquées par une inflexion du potentiel membranaire qui peut être utilisée comme indication de la valeur du PR (figure 10A). La phase ascendante du potentiel dépolarisant lent montre une correspondance frappante avec celle de la dépolarisation initiale qui précède le potentiel d'action (figures 9A2 et 9B2).

Les neurones sBPA de type I montrent en général une phase ascendante des potentiels dépolarisants lents moins rapide que les neurones aBPA de type I. L'amplitude et la vitesse de montée des potentiels dépolarisants lents augmentent proportionnellement avec l'intensité des créneaux dépolarisants (figures 10B1 et 10C2) ou avec l'amplitude (figure 10B2) ou la durée (figure 10C3) du créneau hyperpolarisant.

L'administration de $2\mu\text{M}$ TTX (figures 10C2, 10C3 et 10D) dans la solution *a*, de 2.5mM Co^{2+} (figure 10D) avec la solution *b* ou de $500\mu\text{M}$ Ni^{2+} dans la solution *a* (non illustré) montrent que le potentiel dépolarisant lent est résistant à la TTX et qu'il implique des conductances calciques.

La rectification anormale de type instantanée est observée pour 15 neurones sBPA de type I examinés (figure 4B) et 4 d'entre eux montrent une rectification anormale dépendante du temps (figure 10D).

2. Les neurones de type II

Vingt deux neurones appartiennent au type II; 11 sont enregistrés avec des microélectrodes fines et 10 avec des pipettes de *patch-clamp*.

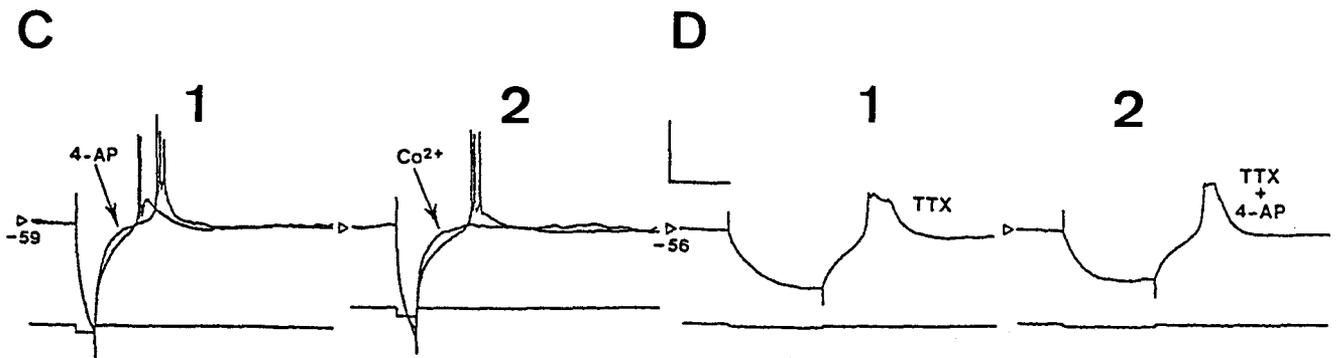
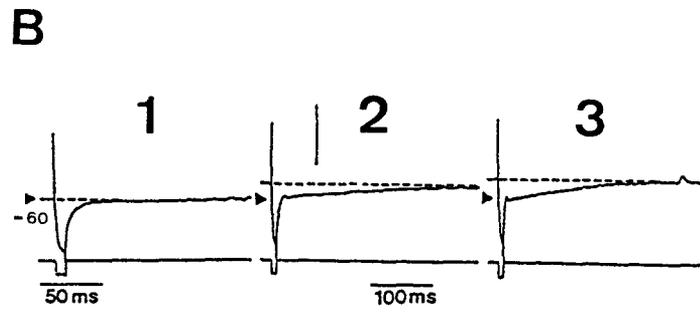
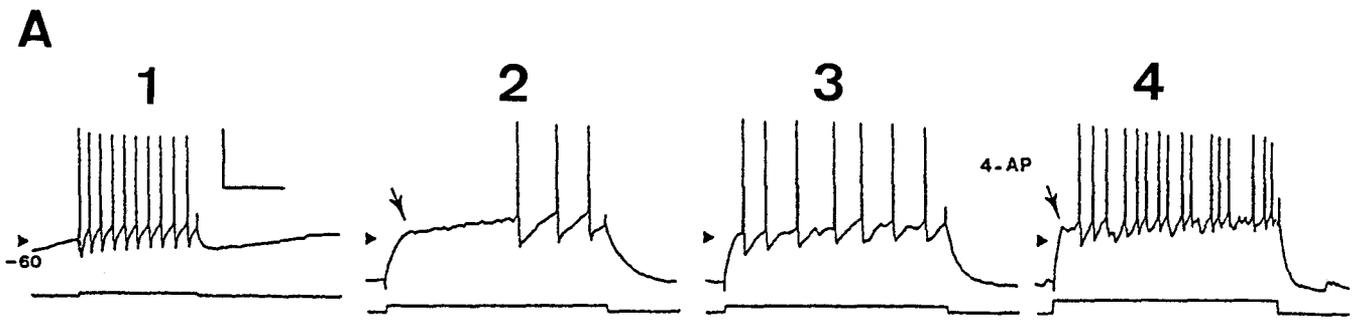
Les neurones appartenant à ce groupe ont la particularité de ne jamais évoquer de potentiel dépolarisant lent même lorsque le potentiel de membrane est hyperpolarisé (figures 11A1 et 11A2).

Par contre une forte rectification transitoire de sens sortant devient visible lorsque des créneaux dépolarisants sont appliqués soit à partir du PR soit à partir de niveaux plus hyperpolarisés. Le déclenchement du premier potentiel d'action est alors retardé et la trajectoire du potentiel adopte une pente caractéristique en forme de rampe (figure 11A2). Ce phénomène est également mis en évidence lors de l'application de courts créneaux hyperpolarisants de fortes amplitudes qui induisent un retour retardé à la ligne de base du potentiel (figures 11B1-3). Cet

Figure 11. Caractéristiques électrophysiologiques des neurones de type II enregistrés dans la région du NMD et rectification transitoire de sens sortant dans les neurones des types I et II.

A. Réponses d'un neurone de type II à des créneaux de courant dépolarisant. (A1) Si le créneau est appliqué à partir du PR (-60mV), un train de potentiel d'action est émis. (A2) Lorsque la membrane est initialement hyperpolarisée (-84mV), le début de la décharge répétitive est retardée. (A3-A4) Une application de 2mM de 4-AP (solution extracellulaire *c*) réduit le délai d'apparition du train de potentiels d'action mais ce retard est encore apparent si l'intensité du choc dépolarisant augmente. **B.** (B1-B3) Pour un autre neurone de type II, la rectification transitoire de sens sortant est apparente lors du retour à la ligne de base du potentiel suite à des chocs hyperpolarisants. L'amplitude de cette rectification augmente lorsque la membrane est dépolarisée. **C.** (C1) Deux réponses superposées d'un neurone aBPA de type I à des créneaux de courant hyperpolarisant appliqués à partir du PR, l'une en milieu extracellulaire *a* normal et l'autre après addition de 2mM de 4-AP (solution *c*). La substance a un effet sur la rectification transitoire de sens sortant qui est sensiblement réduite; de plus l'amplitude du potentiel dépolarisant lent est augmentée de manière notable. (C2) Deux traces superposées sont issues de l'enregistrement du neurone précédant, l'une en présence du milieu extracellulaire *a* normal, l'autre après perfusion du milieu extracellulaire *b* comprenant 2.4mM de Co^{2+} à la place du Ca^{2+} . En présence de Co^{2+} le potentiel dépolarisant lent est supprimé et la rectification transitoire de sens sortant est réduite. **D.** Les deux traces suivantes proviennent de l'enregistrement d'un autre neurone aBPA de type I en présence de 2 μM de TTX. (D1) Ce neurone ne montre pas de manière évidente la rectification transitoire de sens sortant lorsqu'un créneau de courant hyperpolarisant est appliqué à partir du PR. (D2) Par contre, une application de 2mM de 4-AP (solution extracellulaire *c*) provoque une augmentation de 12mV de l'amplitude du potentiel dépolarisant lent.

Barres d'échelle: 40mV, 2nA, 100ms.



évènement est en contraste avec le retour passif, généralement observé après un créneau hyperpolarisant, du potentiel membranaire.

L'amplitude de cette réponse retardée est dépendante de l'amplitude et de la durée du créneau de courant hyperpolarisant. Elle est également dépendante de la valeur du potentiel de membrane comme l'illustrent les figures 11B1-3.

Sept sur 8 neurones de type II montrent une rectification anormale instantanée et l'un d'eux présente aussi une rectification anormale dépendante du temps. Un seul neurone de type II ne montre aucun type de rectification anormale.

IV. La rectification transitoire de sens sortant dans les 3 classes de neurones

1. Description de la rectification transitoire

La rectification transitoire de sens sortant qui caractérise les neurones de type II existe également dans les neurones aBPA et sBPA de type I mais elle y est plus ou moins masquée par la présence du potentiel dépolarisant lent.

Les figures 11C1-2 illustrent un exemple de rectification transitoire pour un neurone aBPA de type I et les figures 9A3 et 9B3 le montrent pour un neurone sBPA de type I.

Cette rectification présente dans le neurone sBPA de type I illustré dans la figure 10B1, est difficilement discernable lorsque le neurone est perfusé dans un milieu normal. Le seul indice de sa présence est visible au niveau de la phase ascendante du potentiel dépolarisant lent dont la pente d'abord élevée s'infléchit pour devenir plus douce. Ce phénomène d'activation biphasique démontre bien l'effet modérateur de la rectification transitoire sur la pente du potentiel dépolarisant qui retentit en conséquence sur l'amplitude de cet évènement dépolarisant.

2. Effet de la 4-aminopyridine (4-AP)

L'effet de l'addition de 2mM de 4-AP par la perfusion de la solution extracellulaire *c* est testé dans les neurones des 2 types. A cette concentration, la 4-AP provoque seulement une réduction de la rectification transitoire. Un exemple de l'effet de la 4-AP sur un neurone de type II est montré dans les figures 11A3 et 11A4.

L'exemple illustré dans la figure 11C1 montre l'effet de 2mM de 4-AP sur un neurone

aBPA de type I. La 4-AP provoque sur ce neurone une légère réduction de l'amplitude de la rectification transitoire et de manière concomitante une augmentation de l'amplitude du potentiel dépolarisant lent activé en rebond.

Cet exemple ainsi que celui d'un autre neurone aBPA de type I illustré dans les figures 11D1 et 11D2 suggère que l'amplitude des potentiels dépolarisants lents varie en fonction de l'amplitude de la rectification transitoire.

Une application de 2mM de 4-AP sur un neurone sBPA de type I ne provoque également qu'une réduction de la rectification transitoire. En présence de 4-AP 2mM, l'amplitude du potentiel dépolarisant lent augmente mais ne provoque jamais l'apparition d'une bouffée de potentiels d'action à son sommet (non illustré).

3. Effet du Cobalt (Co^{2+})

Une application de 2.4mM de Co^{2+} par perfusion du milieu de perfusion extracellulaire *b* sur le même neurone aBPA de type I ne provoque pas seulement une suppression du potentiel dépolarisant lent calcique mais réduit également la rectification transitoire (figure 11C2). Cet effet suggère, soit que la conductance à l'origine de la rectification transitoire est dépendante d'une augmentation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} , soit que les ions Co^{2+} perturbent la perméabilité des canaux responsables de la rectification transitoire.

V. L'identification des neurones par marquage intracellulaire et par transport axonal rétrograde

1. Localisation des neurones marqués

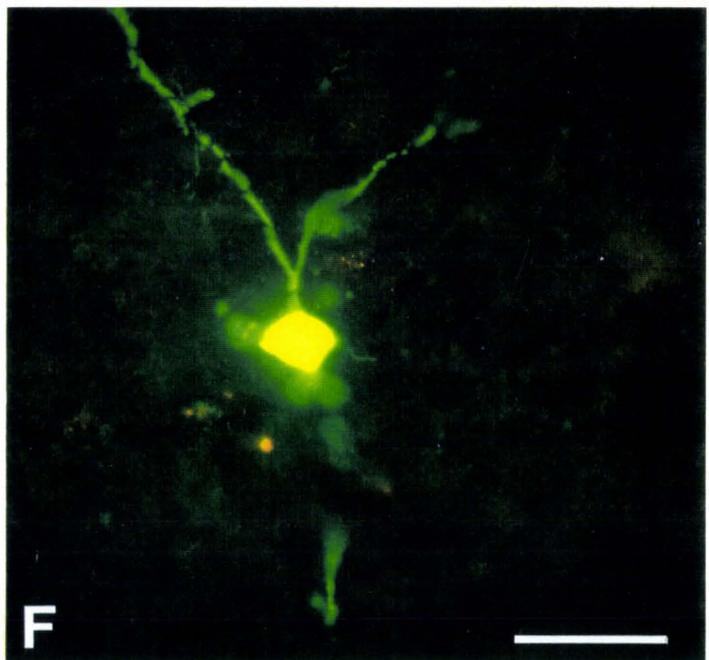
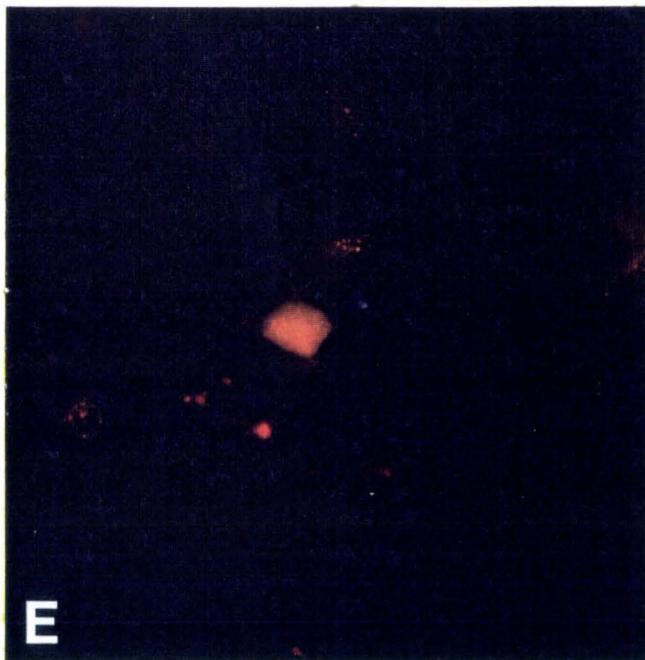
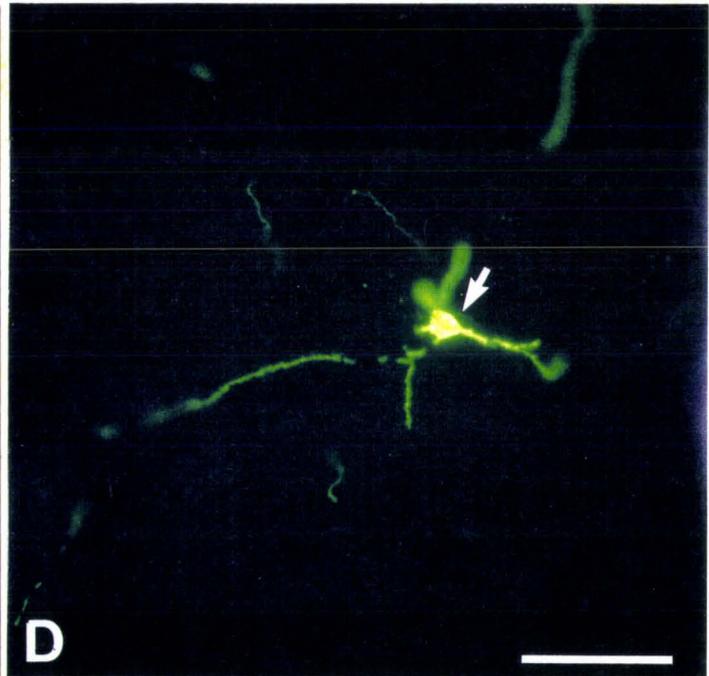
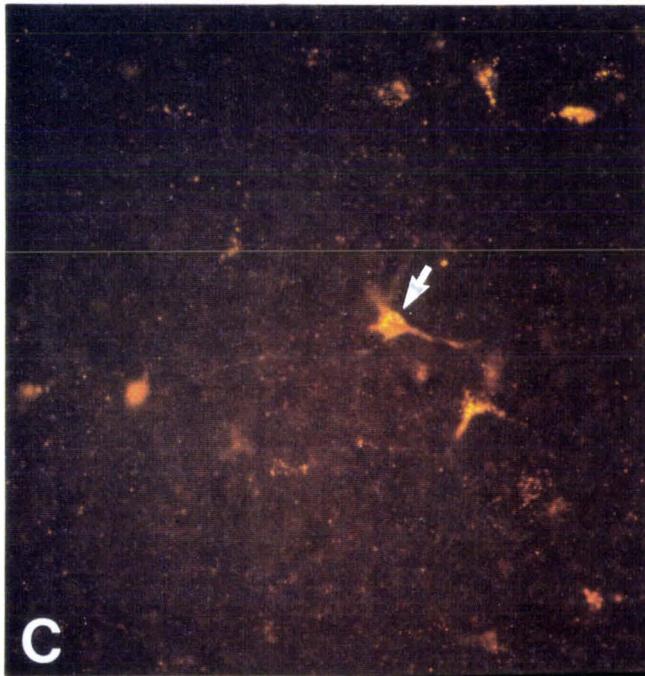
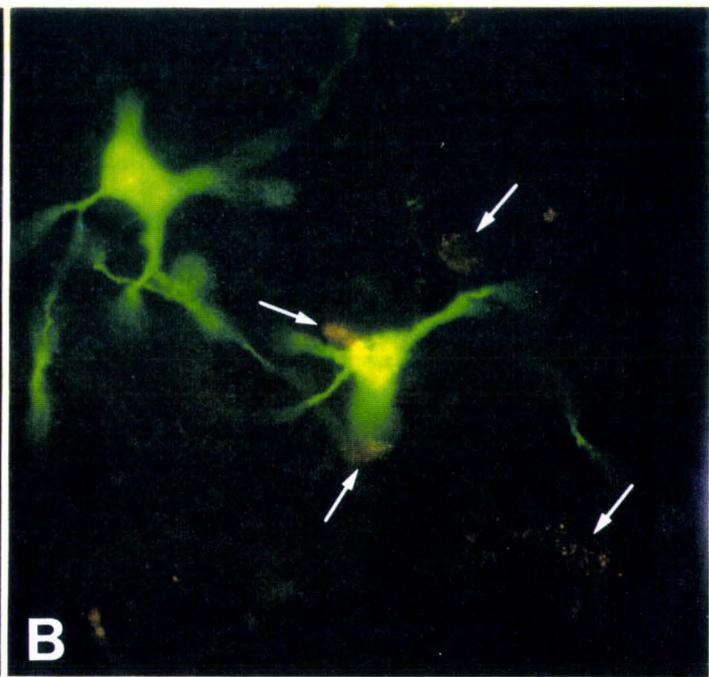
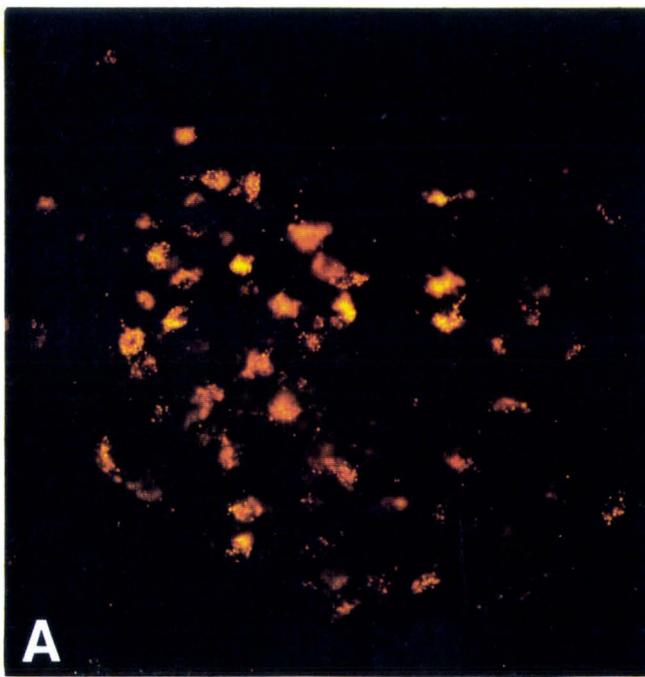
Suite à l'injection des PLR dans le SLml et le transport axonal rétrograde du traceur, des corps cellulaires marqués sont trouvés dans le NMD (figure 12A), dans la région périfornicale et dans l'hypothalamus latéral. Le marquage réalisé par les PLR consiste en une fluorescence de type granulaire présente au niveau des corps cellulaires et des dendrites proximales.

Le tableau 8 donne le nombre et la localisation des neurones retrouvés et marqués avec la biocytine ou doublement marqués avec la biocytine et les PLR.

Figure 12. Identification neuroanatomique des neurones enregistrés avec des microélectrodes fines: microphotographies en microscopie de fluorescence.

A. Aspect du NMD dont les neurones sont marqués par les PLR après transport axonal rétrograde depuis le septum latéral. Noter, ainsi que dans les autres figures, l'aspect granulaire du marquage. **B.** Deux neurones injectés par la biocytine contenue dans la microélectrode fine sont situés à proximité des neurones du NMD marqués par les PLR. Ce cliché est obtenu en photographiant successivement la fluorescence de la biocytine et celle des PLR. **C-D.** Neurone (flèche) situé dans le NMD doublement marqué par les PLR (C) et par la biocytine (D). **E-F.** Autre neurone situé dans le NMD doublement marqué par les PLR (E) et par la biocytine (F). Le cliché F est obtenu par double-exposition, comme le cliché B.

Barre d'échelle: 100µm pour A, C et D et 50µm pour B, E et F.



A, C, D : 100 μ m
B, E, F : 50 μ m

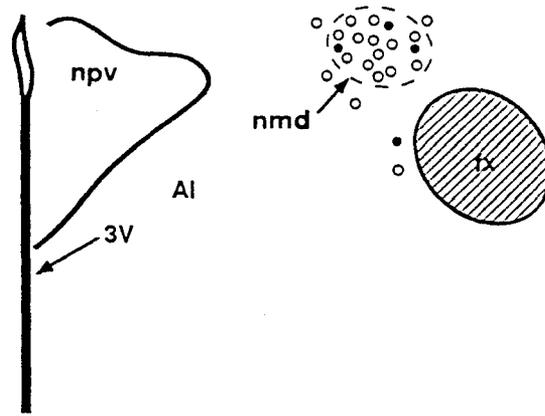


Figure 13. Schéma d'une section frontale indiquant la localisation des neurones injectés avec la biocytine (cercles vides) et des neurones doublement marqués avec la biocytine et les PLR injectés dans le SLml (cercles pleins). Al, noyau alaire; fx, fornix; nmd, noyau magnocellulaire dorsal; npv, noyau paraventriculaire; 3V, 3^{ème} ventricule.

Marquage (30 neurones injectés avec la biocytine)	Neurones situés dans le NMD	Neurones situés dans la région voisine du NMD	
		en zone périfornicale	à proximité du NMD
<i>biocytine</i>	16	2	4
<i>biocytine + PLR</i>	3	1	0

Tableau 8. Nombre et localisation des neurones marqués par la biocytine et/ou par les PLR.

Sur les 30 neurones injectés avec la biocytine, 22 neurones sont correctement marqués et montrent une fluorescence homogène et vive qui s'étend dans tous les constituants du neurone.

Seize neurones injectés avec la biocytine font visiblement partie du NMD car ils se situent à proximité immédiate d'autres neurones au corps cellulaire marqué par les PLR (figure 12B) :

- ~ 3 de ces 16 neurones sont doublement marqués par la biocytine et les PLR (figures 12C-F),
- ~ 6 neurones marqués avec la biocytine n'ont pas été retrouvés dans les limites du NMD :

- 4 de ces neurones sont repérés à proximité du noyau mais en dehors du groupe de cellules marquées par les PLR,
- les 2 autres neurones sont localisés dans la zone périfornicale, latéralement par rapport à la colonne du fornix et l'un d'eux contient également des PLR.

La distribution des neurones marqués grâce au transport rétrograde des PLR et des neurones injectés avec la biocytine est représentée dans la figure 13.

2. Classement électrophysiologique des neurones marqués

Les propriétés électriques des 16 neurones localisés dans le NMD ne diffèrent pas de celles des neurones enregistrés dans les régions voisines:

- ~ 6 neurones appartiennent à la classe des neurones aBPA de type I (figure 7A),
- ~ 5 neurones appartiennent à la classe des neurones sBPA de type I (figure 9B),
- ~ 5 neurones appartiennent à la classe des neurones de type II.

Deux neurones doublement marqués sont des neurones aBPA de type I et le troisième neurone doublement marqué est un neurone sBPA de type I.

DISCUSSION

Cette étude en courant-imposé décrit les propriétés électriques générales des neurones existant dans la région du NMD. Les enregistrements ont été réalisés de manière comparative avec la méthode intracellulaire classique et avec la méthode du *patch-clamp*, en configuration "cellule entière".

I. La caractéristique électrique principale observée dans les neurones de la région du NMD

La caractéristique la plus distincte et la plus immédiate qui ressort de cette étude est représentée par les potentiels dépolarisants lents qui sont émis lors de l'application de créneaux dépolarisants quand le potentiel membranaire est hyperpolarisé ou en rebond suite à l'application de chocs hyperpolarisants réalisés à partir du potentiel de repos membranaire. Cette propriété a servi de critère pour réaliser une classification électrophysiologique de ces neurones.

Deux premières conclusions peuvent être tirées de cette étude comparative.

Premièrement, dans les deux classes répertoriées, les propriétés électriques générales des neurones qui ont servi à les classer sont qualitativement identiques et le comportement des cellules ne varie pas en fonction de la durée de l'enregistrement lorsqu'il est effectué en *patch-clamp* configuration "cellule entière". Cette observation montre que, dans nos conditions expérimentales, les courants impliqués dans l'activité électrique cellulaire ne sont pas modulés par les échanges entre les composants de la solution contenue dans l'électrode et ceux du milieu intracellulaire d'origine.

Deuxièmement, la proportion de neurones appartenant aux deux classes n'est pas différente. Ceci indique que le type de l'électrode ne crée pas de différences dans

l'échantillonnage des neurones, ce qui pourrait être attendu étant donné la différence de diamètre de la pointe des électrodes.

II. Comparaison des propriétés électriques enregistrées en *patch-clamp* et avec la méthode intracellulaire classique

1. La résistance membranaire

Dans nos expériences, les enregistrements en *patch-clamp* mettent en évidence une résistance membranaire moyenne deux fois plus élevée que celle mesurée avec des microélectrodes fines. La faible résistance membranaire enregistrée avec le mode intracellulaire conventionnel résulte probablement d'un courant de fuite non spécifique auquel s'additionne une conductance potassique spécifique modulée par un flux ionique non spécifique, calcique ou potassique, passant par la fuite membranaire (Staley *et al*, 1992).

2. La constante de temps de membrane

De manière attendue du fait de l'augmentation de la résistance membranaire, la constante de temps de membrane, τ , est également plus importante lorsque les enregistrements sont réalisés en *patch-clamp*.

3. Le potentiel de repos et l'amplitude du potentiel d'action

Les autres paramètres mesurés, soit le potentiel de repos et l'amplitude du potentiel d'action, sont remarquablement identiques quelque soit la méthode utilisée. Cette observation est en accord avec les résultats obtenus dans d'autres études (Brooks *et al*, 1992; Gola et Niel, 1993; Jarolimek et Misgeld, 1993; Vanner *et al*, 1993), excepté ceux décrits par Staley *et al* (1992), qui indiquent que la valeur du potentiel de repos est également touchée par la fuite favorisée par l'introduction des microélectrodes fines dans le neurone.

III. Le potentiel dépolarisant lent dans les neurones de type I

La découverte la plus importante concerne la majorité des neurones enregistrés qui émettent un potentiel dépolarisant lent lorsque le potentiel membranaire est suffisamment hyperpolarisé. Ces neurones sont classés en tant que neurones de type I.

1. Description du potentiel dépolarisant lent dans les neurones aBPA

Pour la moitié des neurones de type I nommés **neurones aBPA**, le potentiel dépolarisant lent permet **l'émission d'une bouffée de potentiels d'action** à son sommet. Les potentiels dépolarisants lents des neurones aBPA de type I ressemblent aux potentiels calciques bas-seuil (LTS) décrits par ailleurs.

Les résultats de l'application des bloqueurs des canaux calciques (Co^{2+} , Ni^{2+}) montrent que le potentiel dépolarisant lent est déclenché par une entrée transitoire d'ions Ca^{2+} sans doute attribuable au courant calcique dépendant du potentiel activé à bas seuil de type T.

L'application du TEA extracellulaire sur les neurones aBPA a provoqué une augmentation de la durée de la repolarisation des potentiels dépolarisants. Il semble donc qu'une conductance potassique puisse contribuer à cette repolarisation lorsque l'amplitude du potentiel dépolarisant lent est suffisamment élevée pour atteindre son seuil d'activation, situé au dessus de -40mV dans les neurones du système nerveux central (Rudy, 1988).

La réduction de l'amplitude du potentiel dépolarisant lent provoquée par l'application du Zn^{2+} ($75\text{-}100\mu\text{M}$), laisse suggérer que le courant calcique qui est l'origine du potentiel dépolarisant est modulé par ce cation divalent. Cette hypothèse est en accord avec les résultats de Büsselberg *et al* (1992, 1994) qui ont montré que le Zn^{2+} à $50\mu\text{M}$ était un bloqueur du courant calcique de type T dans les neurones en culture du ganglion dorsal.

La décharge en bouffées de potentiels d'action est particulièrement impliquée dans la genèse de l'activité oscillatoire (voir paragraphe III, 3, f des Généralités). Une telle activité a été détectée seulement dans quelques neurones enregistrés lors de cette étude; toutefois, il faut noter que cette activité oscillatoire s'atténuait toujours au bout de 2 à 4 potentiels dépolarisants émis.

2. Description du potentiel dépolarisant lent dans les neurones sBPA

Dans la deuxième moitié des neurones de type I représentant les **neurones sBPA**, les

potentiels dépolarisants lents ne permettent l'émission que d'un seul potentiel d'action à leur sommet.

a. Comparaison avec l'activité électrique des neurones dopaminergiques

Ce type de décharge rappelle singulièrement l'activité électrique spécifique des neurones dopaminergiques enregistrés au niveau de la pars compacta de la substance noire (Grace et Onn, 1989; Yung *et al*, 1991; Nedergaard et Greenfield, 1992; Kang et Kitai, 1993a).

Cependant il existe une différence essentielle entre les potentiels dépolarisants lents issus des neurones de la région du NMD et ceux qui sont à l'origine de l'activité des neurones dopaminergiques. En effet, ces derniers génèrent des potentiels dépolarisants lents de manière spontanée et leur fréquence d'apparition est comparable à celle des potentiels d'action émis lors de l'activité spontanée au potentiel de repos, ce qui leur confère une activité rythmique.

Dans la présente étude, même si la phase ascendante du potentiel dépolarisant lent des neurones sBPA de type I est de conformation semblable à la phase dépolarisante initiale amorçant l'émission du potentiel d'action lors de l'activité spontanée, ces deux événements sont différents. En effet, lorsque les potentiels d'action sont supprimés par une application extracellulaire de TTX, le potentiel membranaire des neurones ne montre jamais de variations rythmiques.

Une autre différence est due au fait que les neurones sBPA de type I nécessitent une hyperpolarisation du potentiel membranaire pour pouvoir émettre un potentiel dépolarisant d'amplitude maximale alors que dans les cellules dopaminergiques ce potentiel dépolarisant s'active dans une gamme étendue de potentiels plus dépolarisés (Nedergaard et Greenfield, 1992; Kang et Kitai, 1993a).

b. Similitude avec l'activité électrique des neurones appartenant à d'autres régions du cerveau

Une décharge similaire à celle des neurones sBPA de type I, c'est-à-dire un potentiel dépolarisant lent surmonté d'un seul potentiel d'action, caractérise également les populations neuronales du noyau du raphé dorsal chez le rat (Burlhis et Aghajanian, 1987), de la substance grise périaqueducule chez le cobaye (Sánchez et Ribas, 1991) et du noyau suprachiasmatique chez le rat (Huang, 1993; Kim et Dudek, 1993).

3. Différences existant entre les deux types de potentiels dépolarisants lents présents dans les neurones aBPA et dans les neurones sBPA

La raison pour laquelle les potentiels dépolarisants lents déclenchent ou non des bouffées de potentiels d'action peut être expliquée, d'une part, par nos observations qui indiquent que l'amplitude du potentiel dépolarisant lent est significativement plus faible dans les neurones sBPA de type I. D'autre part, dans les neurones sBPA de type I, la post-hyperpolarisation suivant le potentiel d'action joue un rôle crucial dans la mesure où elle est suffisante pour repolariser abruptement le potentiel dépolarisant lent. L'amplitude de la post-hyperpolarisation est significativement plus élevée dans les neurones sBPA que dans les neurones aBPA. Ces deux particularités peuvent expliquer les différences des modes de décharge des neurones de type I.

4. La rectification transitoire de sens sortant dans les neurones de type I

Il est actuellement reconnu que des conductances diverses peuvent interagir avec le courant calcique de type T lors de la genèse du potentiel dépolarisant lent car elles s'activent dans une gamme de potentiel identique (Huguenard et McCormick, 1992; McCormick et Huguenard, 1992).

a. Description de la rectification transitoire de sens sortant

Dans cette étude, une rectification membranaire transitoire de sens sortant est observée de manière associative et simultanée avec le potentiel dépolarisant lent. Cette rectification résulterait de l'activation d'un courant potassique rapide et transitoire de type A (Connor et Stevens, 1971).

Cependant, l'application pharmacologique de l'antagoniste spécifique et reconnu du courant potassique de type A, la 4-AP (Gustafsson *et al*, 1982), ne provoque qu'une suppression partielle de la rectification lorsque la substance est utilisée à la concentration de 2mM.

Par ailleurs, le retard dans le retour à la ligne de base est réduit lorsque les conductances calciques sont bloquées. Ce résultat peut suggérer deux hypothèses :

hypothèse 1: il existerait deux rectifications de sens sortant, l'une étant la conséquence d'un courant appartenant au groupe des conductances potassiques dépendantes du Ca^{2+} (Zbicz et Weight, 1985; Bourque, 1988; Mayer et Sugiyama, 1988; Sánchez et Ribas, 1991), l'autre étant spécifiquement de nature potassique (Connor et Stevens, 1971).

hypothèse 2: il se peut de manière plus probable que l'action du Co^{2+} sur la rectification transitoire soit due à un effet toxique de ce cation divalent (revue dans Kiss et Osipenko, 1994). En effet, il a été montré que le Co^{2+} agirait en déplaçant les processus d'activation et/ou d'inactivation du courant potassique de type A en impliquant une modulation du système des "portes" d'activation et d'inactivation. Il en résulterait soit une dépression, soit une augmentation de l'amplitude de ce courant. D'après Mayer et Sugiyama (1988), la modulation réalisée par les cations divalents (Cd^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+}) suggère l'existence d'un site spécifique pouvant se situer soit sur la protéine du canal elle-même soit sur les phospholipides localisés à proximité des systèmes d'ouverture et de fermeture du canal.

b. Interaction entre la rectification transitoire et le potentiel dépolarisant lent

La rectification transitoire de sens sortant dans les neurones de type I joue un rôle de grande importance car elle peut déterminer la forme et la taille du potentiel dépolarisant lent.

Les expériences réalisées dans cette étude montrent que l'application de 4-AP provoque une augmentation de l'amplitude du potentiel dépolarisant lent des neurones sBPA de type I mais ne permet toutefois pas de démasquer une décharge en bouffées de potentiel. Cela suggère que l'activation du courant potassique de type A n'est pas suffisante pour empêcher le déclenchement des bouffées. Toutefois, il est impossible d'estimer le rôle exact du courant potassique de type A dans l'apparition des bouffées puisque ce courant ne peut pas être complètement supprimé par la 4-AP dans nos expériences qui ont été réalisées en courant-imposé.

Néanmoins, il apparaît que l'une des fonctions du courant potassique de type A est de moduler l'amplitude et la pente ascendante du potentiel dépolarisant lent des neurones de type I.

IV. Les neurones de type II

1. Les caractéristiques des neurones de type II

Dans cette étude, les neurones de type II déterminent une classe bien distincte de neurones qui n'évoquent **jamais de potentiel dépolarisant lent** mais qui par contre présentent **une forte rectification transitoire de type sortant**. Il semblerait donc que les neurones de type II ne présentent pas de courant calcique bas seuil de type T, mais cette hypothèse demande une

confirmation qui ne sera obtenue qu'à partir d'une étude des neurones de type II réalisée en potentiel-imposé.

2. Les hypothèses de l'absence des canaux calciques bas-seuil dans les neurones de type II

L'absence probable des canaux calciques de type T dans les neurones de type II pourrait être consécutive à la confection de la tranche, car il a été démontré expérimentalement que, dans certains neurones du système nerveux central, les canaux calciques bas-seuil étaient localisés au niveau des dendrites (Harris *et al*, 1989a). Cependant, en raison des observations morphologiques portant sur une vaste population de neurones colorés de manière intracellulaire après enregistrement électrophysiologique (Doutrelant *et al*, 1992), cette hypothèse ne semble pas être vraisemblable. En effet, ces observations montrent que, parmi les différents types morphologiques découverts dans la région du NMD, l'étendue des champs dendritiques des neurones évoquant des potentiels dépolarisants lents (41% de la population cellulaire totale) n'est pas différente de celle des neurones où les potentiels dépolarisants lents sont absents.

V. Comparaison des propriétés générales des neurones des différentes classes

1. Les propriétés membranaires et le potentiel d'action

Les propriétés membranaires telles que le potentiel de repos, τ et la résistance membranaire ne se distinguent pas entre les neurones des différents types. De même, l'amplitude des potentiels d'actions n'est pas différente pour les neurones des différents types.

2. Les post-hyperpolarisations et les rectifications anormales de sens entrant

La forme et l'amplitude de la post-hyperpolarisation varie d'un neurone à l'autre, indépendamment du type cellulaire. Il en est de même pour la présence et l'amplitude des rectifications anormales de sens entrant. L'application de Cs^+ extracellulaire provoque la suppression complète des deux types de rectifications anormales qui peuvent dès lors être attribuées à un courant potassique appelé $I_{K(IR)}$ ou encore I_H , pour la rectification instantanée

(Adrian, 1969) et à un courant mixte K^+ - Na^+ nommé I_Q , pour la rectification dépendante du temps (Halliwell et Adams, 1982).

3. L'hétérogénéité électrophysiologique des neurones de la région du NMD

Les variations observées d'un neurone à l'autre suggèrent que les neurones des deux classes ont individuellement des propriétés électriques distinctes.

La région du NMD comprend, en conséquence, une variété de neurones qui possèdent des propriétés membranaires intrinsèques différentes dues aux associations diverses de courants ioniques dépendants du potentiel. Ces associations multiples semblent résulter de la présence de canaux qualitativement et quantitativement différents à la surface des neurones.

De manière inattendue, les résultats montrent que les neurones localisés dans le NMD lui-même présentent également des types électrophysiologiques distincts.

VI. Identification neuroanatomique des neurones enregistrés

La technique du double marquage cellulaire permet de montrer que certains neurones enregistrés font partie du NMD puisqu'ils sont localisés dans le groupe de neurones marqués par le transport rétrograde des PLR depuis le SLml, cible principale du NMD (Poulain, 1983, 1986).

Seules quelques cellules contiennent à la fois le traceur rétrograde et le marqueur présent dans la microélectrode. Néanmoins, puisque tous les neurones du NMD sont enképhalinergiques (Beauvillain *et al*, 1982) et qu'ils se projettent vers le SLml (Poulain *et al*, 1984), ces résultats montrent de toute évidence que les neurones enregistrés dans les limites du NMD correspondent à des cellules enképhalinergiques se projetant vers le SLml.

En conséquence, les neurones du NMD semblent former un groupe électrophysiologique hétérogène, même s'ils renferment le même neuromodulateur et sont tous impliqués dans le même tractus hypothalamo-septal.

En outre, les propriétés électriques des neurones enregistrés dans le NMD ne diffèrent pas de celles des neurones trouvés à l'extérieur du noyau exploré.

Un parallèle intéressant peut être établi entre la différence des profils électrophysiologiques des neurones du NMD et la diversité morphologique des types cellulaires rencontrés dans les neurones de ce noyau (Doutrelant *et al*, 1992). D'un autre côté, le fait que les

propriétés électriques des neurones du NMD soient semblables à celles des neurones localisés dans les régions adjacentes peut être comparé aux résultats morphologiques obtenus dans cette étude, qui indiquent que les types morphologiques des cellules présentes dans le NMD sont également trouvés dans la région périfornicale et dans l'hypothalamus latéral.

VII. Comparaison des propriétés électriques des neurones de la région du NMD avec celles des neurones appartenant à des régions identiques ou proches chez le cobaye et chez le rat

Lors d'études réalisées chez le cobaye (Poulain et Carette, 1987), des neurones sBPA de type I n'ont jamais été enregistrés dans la région entourant le noyau paraventriculaire alors que cette zone est à proximité immédiate de la région du NMD. Cette observation pourrait signifier que les neurones sBPA de type I sont spécifiques de la région du NMD.

Néanmoins, chez le rat, la région proche du noyau paraventriculaire comprend des neurones émettant des potentiels dépolarisants lents de faible amplitude qui génèrent un voire deux potentiels d'action (Tasker et Dudek, 1991), semblables à ceux des neurones sBPA de type I décrits dans la présente étude.

Par ailleurs, des neurones avec des potentiels bas-seuil émettant des bouffées robustes de potentiels d'action sont présents chez le rat dans la même région (Tasker et Dudek, 1991) et chez le cobaye (Poulain et Carette, 1987). Par conséquent, si l'on ignore les différences d'espèce, les propriétés électriques intrinsèques cellulaires ne différencieraient pas pour les neurones compris dans une vaste région s'étendant du pourtour du noyau paraventriculaire jusqu'à l'aire périfornicale en incluant le NMD, et ce, quelque soit l'identité neurochimique et le rôle spécifique des différents groupes de neurones constituant cette région.

VIII. Conclusion

Les expériences réalisées en courant-imposé avec les techniques d'enregistrement intracellulaire et en *patch-clamp*, configuration "cellule entière", ont permis d'établir la classification électrophysiologique des neurones de la région du NMD, incluant les neurones enképhalinergergiques du tractus hypothalamo-septal.

La différence essentielle entre les deux sous-types (sBPA et aBPA) de la catégorie des

neurones de type I (79.6% de la population totale) est la capacité, pour le potentiel dépolarisant lent qui les caractérise, de déclencher l'apparition d'une bouffée de potentiels d'action ou son incapacité à le faire. Il est vraisemblable que l'amplitude de la post-hyperpolarisation qui suit le potentiel d'action soit un élément important pour la distinction des deux sous-types de neurones.

Des études récentes ont suggéré l'existence de différents canaux calciques de type T (voir paragraphe III, 3, g des Généralités). Les propriétés de ces courants pourraient donc différer dans les deux sous-types de neurones, ce qui expliquerait les différences d'aspect des réponses. La vérification de cette hypothèse nécessite une investigation en potentiel-imposé.

Les neurones de type II (20.4% de la population totale) n'émettent pas de potentiel dépolarisant lent mais ils présentent une forte rectification membranaire, induite par un courant potassique transitoire de type A. Cette rectification est également observée pour les neurones de type I et il semblerait que l'interaction des courants de type T et de type A soit importante pour déterminer leur mode de décharge. Pour argumenter cette suggestion, il est nécessaire de connaître les caractéristiques du courant de type A, ce qui peut être réalisé par une étude en potentiel-imposé.

DEUXIÈME PARTIE

Etude du courant calcique bas-seuil et du courant potassique
transitoire dans les neurones de la région du noyau
magnocellulaire dorsal de l'hypothalamus de cobaye

INTRODUCTION

Dans cette deuxième partie, la technique d'enregistrement en *patch-clamp*, "configuration cellule entière", a été exploitée pour une analyse en potentiel-imposé des propriétés membranaires des neurones de la région du NMD.

Dans un **PREMIER CHAPITRE** de l'exposé des Résultats (**A**), les propriétés biophysiques, cinétiques et pharmacologiques du courant calcique à l'origine du potentiel dépolarisant lent ont été analysées pour les neurones de type I. Cette étude avait un double objectif. Elle devait servir à déterminer si des catégories distinctes de canaux calciques bas-seuil existent pour les neurones de type I, ce qui aurait pu expliquer leurs différences de décharge. Elle devait ensuite servir à préciser les caractéristiques de ce courant calcique bas-seuil, pour examiner en quoi ces caractéristiques sont en accord avec les données de la littérature qui concernent le système nerveux central en général et l'hypothalamus en particulier.

Dans un **DEUXIEME CHAPITRE** de l'exposé des Résultats (**B**), les propriétés biophysiques, cinétiques et pharmacologiques du courant potassique transitoire ont été analysées pour les neurones des types I et II. Cette analyse devait permettre de déterminer la nature exacte de ce courant et de juger s'il différait dans les deux types de neurones. Elle devait également permettre de mieux comprendre le mode de fonctionnement des neurones de type I dans l'hypothèse selon laquelle l'interaction des courants de type T et de type A contribuerait à leur mode de décharge.

RÉSULTATS

A. LE COURANT CALCIQUE BAS-SEUIL DANS LES NEURONES DE LA REGION DU NOYAU MAGNOCELLULAIRE DORSAL: ETUDE BIOPHYSIQUE, CINETIQUE ET PHARMACOLOGIQUE

Les résultats sont basés sur l'enregistrement en *patch-clamp*, configuration "cellule entière", de 61 neurones localisés dans la région du NMD.

I. Observations préliminaires

1. Relation entre la décharge neuronale observée en courant-imposé et les courants ioniques globaux activés dans les neurones aBPA et sBPA de type I et dans les neurones de type II.

a. Observations générales en courant-imposé

Les expériences réalisées en courant-imposé et dans les conditions standard (solution intrapipette *I* et solution extracellulaire *a*) sur des neurones des deux types I et II hyperpolarisés en dessous de -60mV, montrent les deux types de potentiel dépolarisant lent émis par les deux sous-classes de neurones de type I (figures 14A *en haut* et 14B *en haut*) alors que les neurones de type II n'en présentent jamais (figure 14C *en haut*).

Les neurones aBPA montrent des potentiels dépolarisants lents de grande amplitude qui provoquent l'émission de bouffées de potentiel d'action (figure 14A *en haut*). La figure 14B *en haut* illustre la décharge d'un neurone sBPA qui produit un potentiel dépolarisant lent sur lequel un seul potentiel d'action est émis. Dans les deux cas, le potentiel dépolarisant lent peut être isolé et mesuré lorsque 2 μ M de TTX sont ajoutés au bain de perfusion (figures 14A *en haut* et 14B *en*

Figure 14. Comparaison des principales caractéristiques électrophysiologiques des neurones de types I et II de la région du NMD.

Dans cette figure, ainsi que dans toutes les figures suivantes, les enregistrements sont réalisés en *patch-clamp*, configuration "cellule entière".

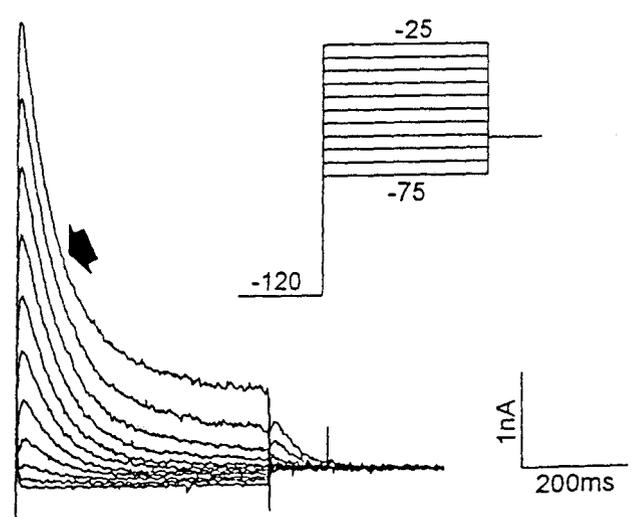
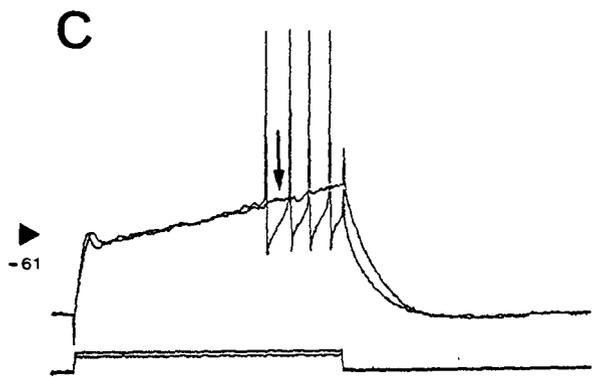
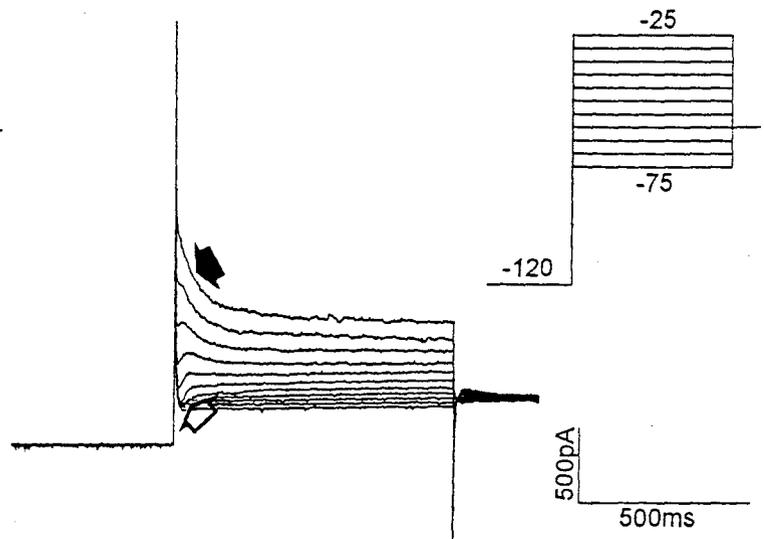
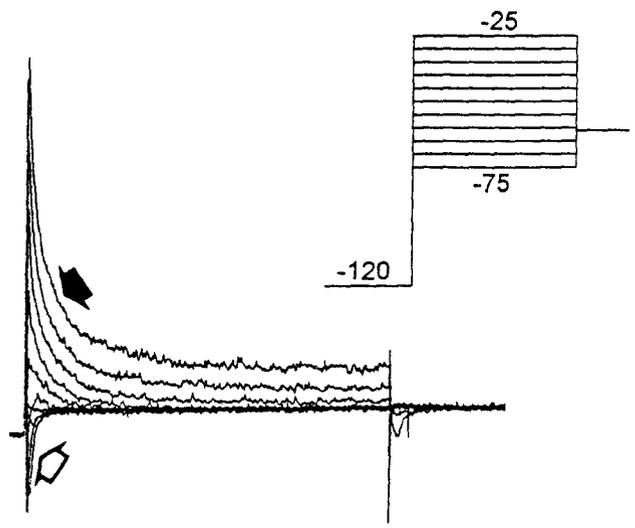
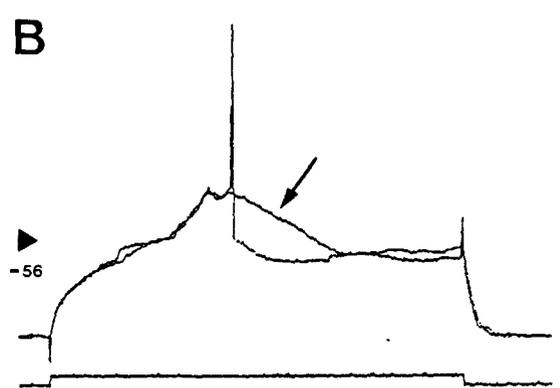
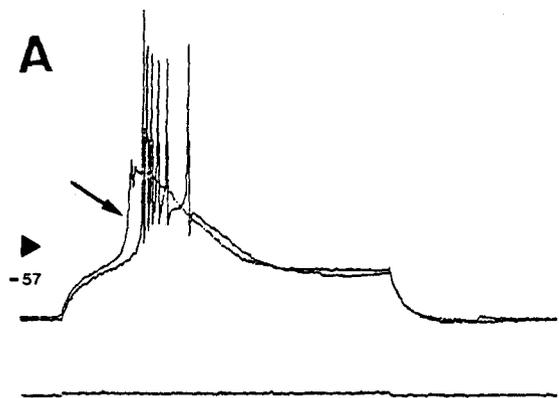
A-B. Caractéristiques des neurones de type I.

A. (A en haut) Décharge typique d'un neurone aBPA de type I enregistré en courant-imposé. Suite à l'application d'un créneau de courant dépolarisant à partir d'un potentiel membranaire hyperpolarisé à -100mV, le neurone présente un potentiel dépolarisant lent au sommet duquel une bouffée de potentiels d'action est déclenchée. Après addition de TTX 2 μ M (flèche), le potentiel dépolarisant lent est observé de manière isolée. (A en bas) En potentiel-imposé, le courant qui est à l'origine du potentiel dépolarisant lent observé précédemment apparaît être un courant bas-seuil transitoire de sens entrant (flèche vide). Lorsque les sauts de potentiel sont plus dépolarisés, un courant sortant transitoire devient apparent (flèche pleine).

B. (B en haut) Décharge typique d'un neurone sBPA de type I enregistré en courant-imposé. Suite à l'application d'un créneau de courant dépolarisant à partir d'un potentiel membranaire hyperpolarisé à -100mV, le neurone présente un potentiel dépolarisant lent au sommet duquel est déclenché un seul potentiel d'action suivi par une ample post-hyperpolarisation. Après addition de TTX 2 μ M (flèche), le potentiel dépolarisant lent est observé de manière isolée. (B en bas) En potentiel-imposé, un courant bas-seuil de sens entrant, d'intensité faible, à l'origine du potentiel dépolarisant lent est observé (flèche vide) ainsi qu'un courant sortant transitoire (flèche pleine).

C. Caractéristiques des neurones de type II. (C en haut) Décharge typique d'un neurone de type II enregistré en courant-imposé. Lorsque le neurone est hyperpolarisé à -100mV, l'application d'un créneau de courant dépolarisant provoque l'apparition d'une réponse tonique retardée. L'addition de TTX 2 μ M (flèche) permet d'observer le décours du potentiel en forme de rampe, signalant la présence d'une rectification transitoire de sens sortant. (C en bas) En potentiel-imposé, seul un courant sortant transitoire à l'origine de la rectification, est observé (flèche pleine).

Barres d'échelle pour les enregistrements en courant-imposé: 40mV, 2nA et 100ms.



haut). Les potentiels dépolarisants lents sont d'amplitudes plus faibles dans les neurones sBPA que dans les neurones aBPA.

Lorsqu'ils sont dépolarisés à partir d'un potentiel membranaire hyperpolarisé, les neurones de type II génèrent un train de potentiels d'action qui apparaît retardé (figure 14C *en haut*). L'addition de TTX met en évidence la réponse en forme de rampe caractéristique de l'existence d'une rectification de sens sortant dans les neurones de type II (figure 14C *en haut*).

b. Observations générales en potentiel-imposé

Des expériences sont réalisées sur les mêmes neurones et enregistrés dans les mêmes solutions expérimentales que précédemment. Les stimulations en potentiel-imposé sont réalisées de manière à s'approcher de celles qui sont utilisées en courant-imposé. A partir du potentiel membranaire d'abord hyperpolarisé sont appliqués des chocs dépolarisants permettant d'activer la conductance à l'origine du potentiel dépolarisant lent. Plus précisément, le potentiel membranaire est maintenu hyperpolarisé en dessous de -100mV (-120mV dans la figure 14) pendant 1s puis des créneaux de potentiels dépolarisants, incrémentés par pas de 5mV, sont appliqués à partir de -75mV pendant 1s.

Les résultats obtenus en réponse à ce protocole montrent la présence d'un courant bas-seuil, rapide, transitoire et de sens entrant (flèche vide dans les figures 14A *en bas* et 14B *en bas*), qui est de plus grande amplitude dans les neurones aBPA que dans les neurones sBPA.

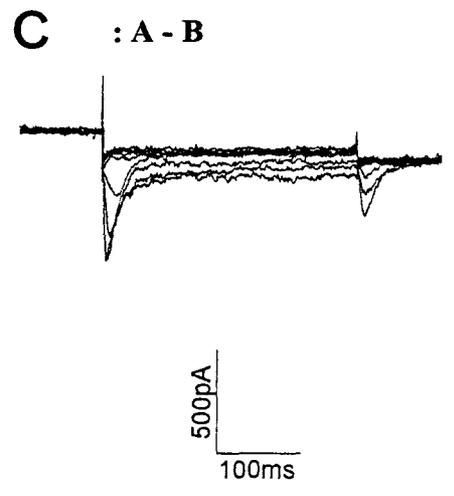
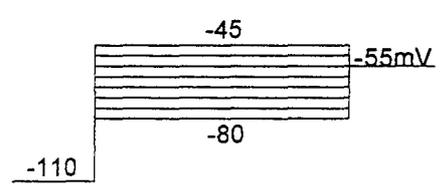
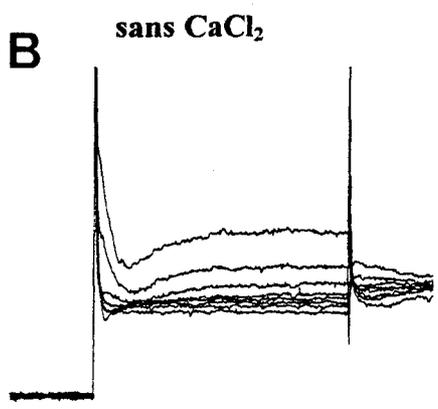
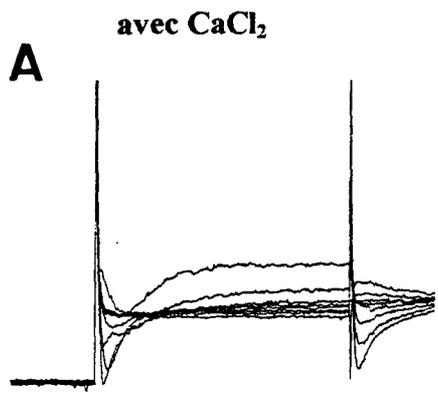
Ces enregistrements mettent également en évidence un courant transitoire, rapide et de sens sortant dans les deux sous-classes de neurones de type I (flèche pleine dans les figures 14A *en bas* et 14B *en bas*) et dans les neurones de type II (flèche pleine figure 14C *en bas*). Le courant transitoire de sens sortant est de plus grande amplitude dans les neurones de type II que dans les neurones de type I.

2. Démonstration de la nature calcique du courant bas-seuil, transitoire et de sens entrant existant dans les neurones de type I

Afin de confirmer la nature calcique du courant entrant bas-seuil, les neurones (n=5) sont d'abord enregistrés dans le milieu extracellulaire α , puis au bout de vingt minutes dans un milieu α où le Ca^{2+} est remplacé par du Mg^{2+} . Les solutions extracellulaires sont associées à la solution

Figure 15. Mise en évidence de la nature calcique du courant bas-seuil entrant dans un neurone aBPA.

A partir d'un pré-potentiel (potentiel de maintien) de -110mV, une série de sauts dépolarisants est réalisée entre -80 et -45mV. **A.** Lorsque le neurone est enregistré dans la solution standard α , parmi le courant global, un courant bas-seuil entrant et un courant sortant transitoire sont apparents. **B.** Lorsque le Ca^{2+} est retiré de la solution extracellulaire α , le courant bas-seuil entrant disparaît. **C.** Cet enregistrement correspond à la soustraction des enregistrements A et B. Il met en évidence le courant bas-seuil entrant supprimé lors du retrait du Ca^{2+} . Noter un courant persistant supprimé également.



intrapipette 1. Le protocole de stimulation utilisé est identique à celui qui a été décrit dans le chapitre précédent.

Les résultats illustrés dans la figure 15 montrent que les neurones aBPA (n=3) évoquent un courant bas-seuil entrant notable ainsi qu'un courant transitoire sortant moins apparent (figure 15A) en réponse à des créneaux de potentiel situés entre -75 et -45mV appliqués à partir d'un potentiel membranaire hyperpolarisé (-110mV dans la figure 15). Lorsque le Ca^{2+} est retiré de la solution extracellulaire, le courant entrant bas-seuil est aboli et en conséquence le courant transitoire de sens sortant est démasqué (figure 15B). La figure 15C, obtenue par soustraction des deux enregistrements précédents, représente le courant entrant bas-seuil qui a été entièrement supprimé par la perfusion du milieu extracellulaire sans Ca^{2+} . En même temps, un courant entrant persistant, ne s'inactivant pas, et d'amplitude faible est supprimé. En raison des conditions expérimentales, ce courant entrant persistant ne peut être qu'un courant calcique haut-seuil.

Des expériences réalisées avec un autre protocole de stimulation indiquent la suppression du courant entrant bas-seuil dans les neurones sBPA (figure 34) (n=2).

Les résultats de ces expériences indiquent que le flux à l'origine du courant entrant bas-seuil est porté par des ions de nature calcique. Cette conductance calcique bas-seuil est responsable de l'activation du potentiel dépolarisant lent observé en courant-imposé dans les neurones de type I.

II. Propriétés biophysiques et cinétiques du courant calcique bas-seuil

L'ensemble de l'étude biophysique et cinétique du courant calcique bas-seuil a été réalisée sur 14 neurones sélectionnés parmi 20 neurones enregistrés avec le milieu intrapipette 2 et la solution extracellulaire e. Le choix de ces deux solutions permet l'isolement du courant calcique bas-seuil par un blocage pharmacologique des conductances potassiques par le Cs^+ (intra et extracellulaire), la 4-AP et le TEA, de la conductance sodique par la TTX. Les courants calciques haut-seuil sont bloqués par l'action intracellulaire des ions F^- .

Il faut souligner que l'utilisation de ces milieux rend impossible la distinction du sous-type des neurones enregistrés, qui peuvent donc être indifféremment de sous-type aBPA ou sBPA. En effet, la classification des neurones de type I a été établie dans des conditions normales d'enregistrement avec les solutions 1 et a en courant-imposé sans addition de TTX. Or, lors de cette étude, la configuration "cellule entière" est réalisée directement en présence des solutions 2

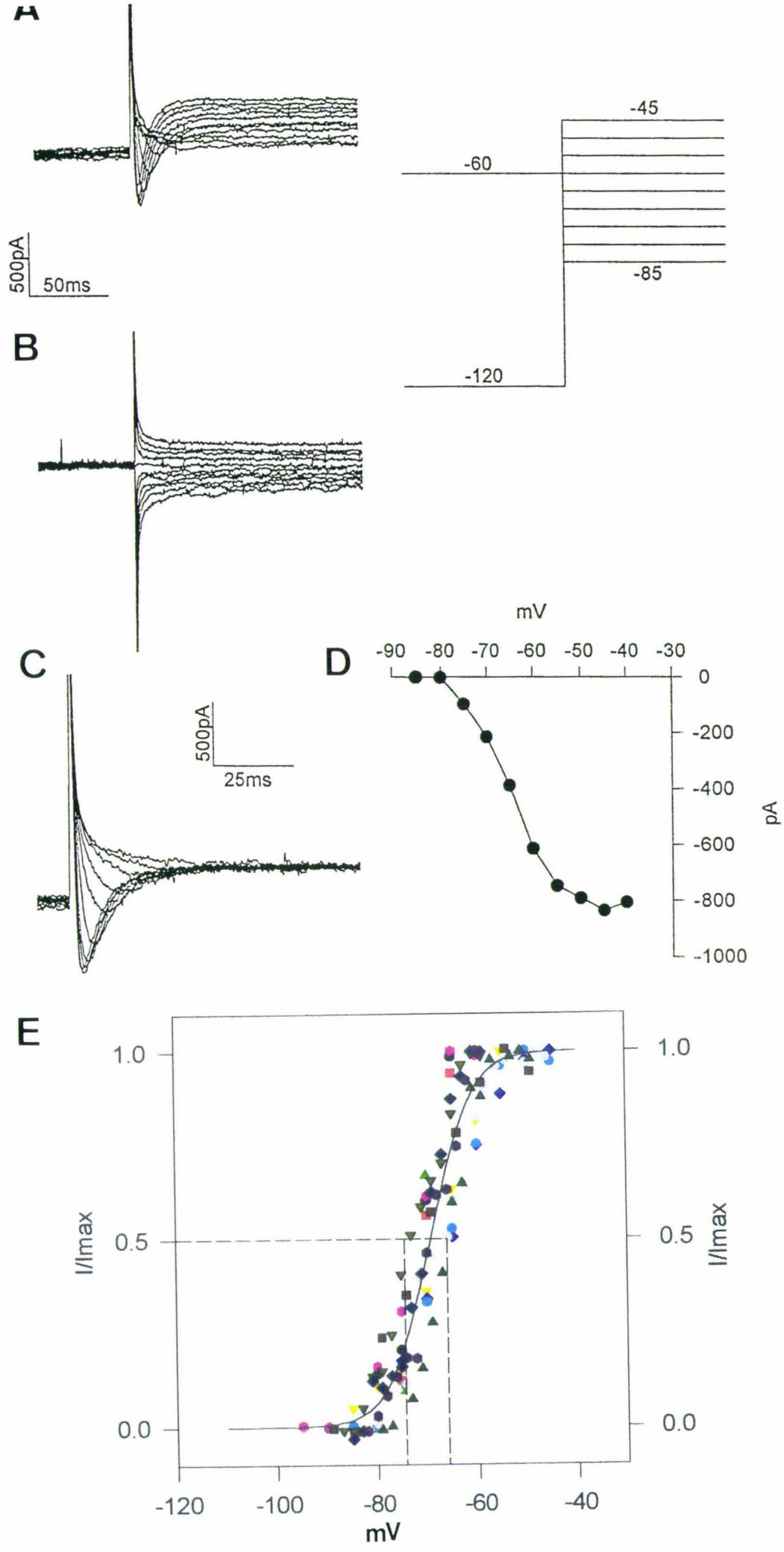
Figure 16. Activation du courant calcique bas-seuil dans un neurone de type I.

Le neurone est soumis à un double protocole de stimulation. **A.** Dans le premier protocole de stimulation, le pré-potentiel est fixé pendant 1s à -120mV pour permettre la dé-inactivation des canaux calciques bas-seuil et il est suivi par l'application d'une série de sauts de potentiel dépolarisant entre -85 et -45mV. La réponse du neurone à la série de sauts provoque l'activation progressive du courant calcique bas-seuil associée au courant de fuite et au courant capacitif. **B.** Dans le second protocole de stimulation, le pré-potentiel est fixé à -60mV ce qui permet d'inactiver les canaux calciques bas-seuil. La série de sauts appliquée ensuite est identique à celle qui est décrite dans le premier protocole. La réponse obtenue à cette seconde série de stimulation ne fait apparaître que le courant de fuite et le courant capacitif. **C.** Cet enregistrement provient de la soustraction des réponses A et B. Cette soustraction permet d'isoler l'enregistrement de l'activation du courant calcique bas-seuil en supprimant le courant de fuite. **D.** Courbe courant-potentiel réalisée à partir des enregistrements du courant calcique bas-seuil illustré en C. L'intensité du courant calcique bas-seuil est mesurée au point maximum du courant entrant (pic du courant). Le seuil d'activation du courant est situé à -80mV et l'amplitude maximale du courant est obtenue à -45mV. **E.** Courbe d'activation moyenne du courant calcique bas-seuil exprimé dans 14 neurones et ajustée selon l'équation de Boltzmann. I/I_{max} représente l'intensité relative du courant calcique bas-seuil, I_{max} est mesuré à -45mV. Les paramètres de la courbe ajustée sont: $V_{1/2} = -70.1 \pm 4.1$ mV (moyenne \pm écart-type) et $k = 3.58 \pm 1.29$ (moyenne \pm écart-type). Les symboles de couleur décrivent l'activation individuelle du courant calcique bas-seuil exprimé par chaque neurone.

Pour les enregistrements du courant calcique bas-seuil, la solution intrapipette 2 et la solution extracellulaire e ont été utilisées.

Cellules	I_{max} (pA)	Activation			Inactivation		
		seuil (mV)	$V_{1/2}$ (mV)	k	totale à (mV)	$V_{1/2}$ (mV)	k
1	-505	-80	-67.5	5.03	--	--	--
2	-1300	-84	-70.7	5.27	-64	-82.4	-4.92
3	-458	-77	-66.2	2.87	-67	-82.9	-4.88
4	-502	-85	-72.4	4.19	-69	-83.1	-4.31
5	-1078	-83	-70.4	3.11	-61	-77.0	-3.74
6	-1058	-82	-65.8	3.47	-57	-74.9	-4.95
7	-753	-85	-80.8	2.16	-65	-88.0	-3.99
8	-2364	-80	-71.2	1.64	-65	-79.7	-3.34
9	-2281	-90	-67.6	4.63	-65	-85.2	-6.09
10	-763	-80	-65.7	5.30	--	--	--
11	-1765	-85	-72.4	3.32	-70	-87.2	-4.23
12	-1005	-80	-66.0	4.81	-55	-79.1	-5.32
13	-150	-80	-73.1	2.06	-60	-79.0	-3.92
14	-740	-85	-71.5	2.27	--	--	--
moy \pm σ	-1051 \pm 670	-83 \pm 3.3	-70.1 \pm 4.1	3.58 \pm 1.29	-63 \pm 4.7	-81.7 \pm 4.15	-4.52 \pm 0.80
n	14	14	14	14	11	11	11

Tableau 9. Paramètres caractéristiques des processus d'activation et d'inactivation dépendants du potentiel du courant calcique bas-seuil mesurés dans 14 neurones de type I.



et *e*. Ainsi, les neurones n'évoquent pas les décharges typiques et spécifiques qui ont permis de les classer en courant-imposé. Les neurones sont immédiatement placés en mode potentiel-imposé (dSEVC) pour être maintenus et stabilisés à une valeur de potentiel proche du PR ($\sim 50\text{mV}$) ce qui permet d'obtenir des enregistrements de bonne qualité pendant 30min environ.

Le tableau 9 reprend toutes les mesures de 14 neurones sélectionnés pour réaliser l'analyse des processus d'activation et d'inactivation dépendants du potentiel du courant calcique bas-seuil.

1. Processus d'activation du courant calcique bas-seuil

a. Protocole expérimental d'activation du courant calcique bas-seuil

Le processus d'activation est étudié en utilisant deux protocoles de stimulation différents. Le premier protocole est constitué par une application de créneaux de potentiel dépolarisant d'amplitudes croissantes administrés pendant 1s à partir d'un potentiel de maintien (pré-potentiel) de -120 à -110mV (figure 16A). Ce protocole permet l'activation du courant calcique bas-seuil, du courant de fuite dont l'intensité augmente linéairement avec la dépolarisation et des courants capacitifs. Ensuite, un second protocole est appliqué de manière identique mais à partir d'un pré-potentiel de -50mV , valeur de potentiel pour laquelle le courant calcique bas-seuil est inactivé. Ce deuxième protocole ne permettant pas de dé-inactiver le courant calcique bas-seuil, seuls le courant de fuite et les courants capacitifs sont observés.

La figure 16 illustre la réponse d'un neurone de type I aux deux protocoles de stimulation. Le premier protocole active le courant calcique bas-seuil et la réponse au second protocole montre qu'il n'est pas activé (figure 16B). Ainsi, la soustraction des réponses aux deux protocoles permet d'isoler le courant calcique bas-seuil du courant de fuite (figure 16C).

La courbe courant-potentiel est réalisée à partir des tracés issus de la soustraction des réponses aux deux protocoles de stimulation. L'amplitude du courant calcique bas-seuil est mesurée entre le point situant l'intensité maximale de courant entrant (pic de courant) et le moment où le courant est complètement inactivé, c'est à dire environ 150ms après le début de son activation. Les résultats montrent que le courant calcique bas-seuil commence à s'activer pour un potentiel d'environ -80mV et qu'il gagne une amplitude maximale vers -50mV environ (figure 16D).

Figure 17. Evolutions du temps de latence du pic (t_p) et de la constante de temps de l'inactivation (τ_{inact}) du courant calcique bas-seuil en fonction du potentiel.

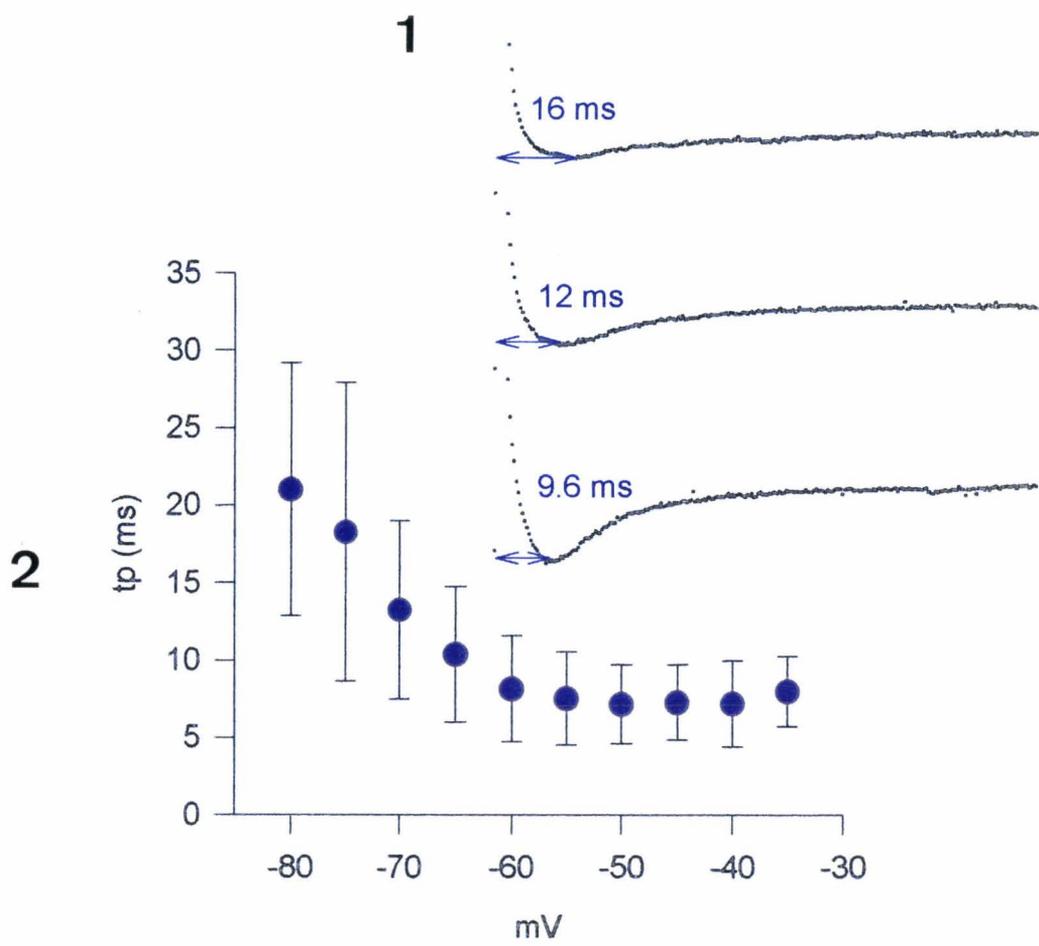
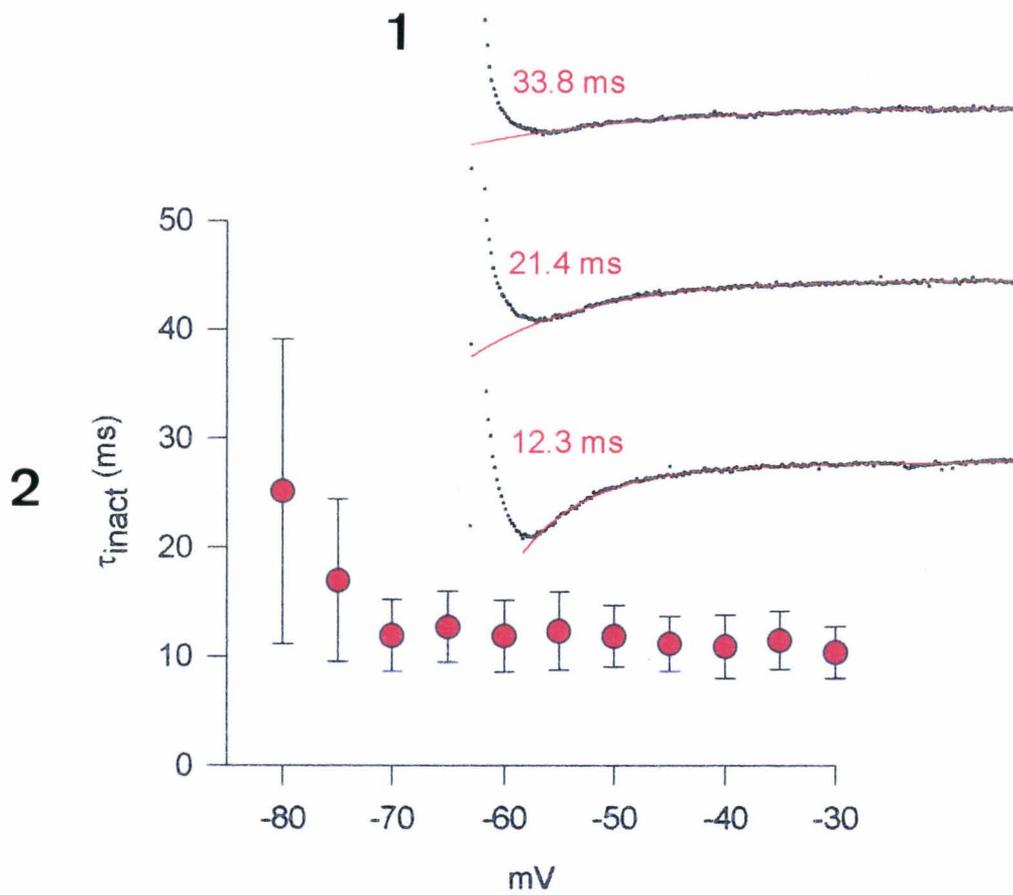
A. Evolution du temps de latence du pic du courant calcique bas-seuil en fonction du potentiel.

(A1) Trois sauts de potentiel dépolarisant ont été réalisés sur un neurone de type I selon un double protocole de stimulation (voir figure 16). Le t_p du courant calcique bas-seuil activé est mesuré entre le début de la charge du courant capacitif et le pic du courant. Les mesures sont respectivement de 16, 12 et 9.6ms pour des sauts réalisés à -80, -75 et -70mV. (A2) Les valeurs moyennes du t_p du courant calcique bas-seuil sont reportées dans une courbe en fonction du potentiel membranaire. Le temps de latence du pic du courant calcique bas-seuil diminue progressivement de 21ms à -80mV à 8ms à -50mV.

B. Evolution de la constante de temps de l'inactivation du courant calcique bas-seuil en fonction du potentiel.

(B1) Les enregistrements illustrés en A1 ont servi à réaliser la mesure de τ_{inact} du courant calcique bas-seuil exprimé par ce neurone. La mesure de la constante de temps de l'inactivation est obtenue par l'ajustement monoexponentiel de la phase d'inactivation du courant calcique bas-seuil. Les mesures sont respectivement de 33.8, 21.4 et 12.3ms pour des sauts réalisés à -80, -75 et -70mV. (B2) Les valeurs moyennes de τ_{inact} du courant calcique bas-seuil sont reportées dans une courbe en fonction du potentiel membranaire. La constante de temps de l'inactivation du courant calcique bas-seuil diminue sensiblement de 25 à 12ms entre -80 et -70mV et reste stable à environ 12ms au dessus de -70mV.

Chaque cercle en A1 et en B1 représente la moyenne \pm écart type des mesures réalisées à partir de 14 cellules différentes.

A**B**

L'analyse du courant calcique bas-seuil effectuée sur 14 neurones montre que l'amplitude de ce courant varie fortement d'un neurone à l'autre. Sa valeur est de -1051 ± 670 pA (moyenne \pm écart-type) (tableau 9).

b. Mise en évidence de la dépendance au potentiel du processus d'activation du courant calcique bas-seuil

Les résultats de cette étude sont indiqués dans le tableau 9.

La figure 16E illustre la courbe d'activation moyenne du courant calcique bas-seuil. Cette courbe, représentant l'intensité relative du courant calcique exprimé en fonction des sauts de potentiel appliqués, est ajustée avec l'équation de Boltzmann:

$$I / I_{max} = 1 / \{ \exp [(V_{1/2} - V_S) / k] \}$$

où I est l'intensité du courant pour un saut de potentiel donné V_S , I_{max} est l'intensité maximale du courant, $V_{1/2}$ est la valeur du potentiel permettant l'expression de la moitié de I_{max} et k est la pente de la courbe. L'ajustement non linéaire de la courbe rapporte les valeurs moyennes de $V_{1/2} = -70.1 \pm 4.1$ mV (moyenne \pm écart-type) et $k = 3.58 \pm 1.29$ (moyenne \pm écart-type) (tableau 9). Le seuil moyen de l'activation du courant calcique bas-seuil est de l'ordre de -80 mV et le courant atteint une amplitude maximale à -50 mV environ.

c. Evolution du temps de latence du pic de courant calcique bas-seuil en fonction du potentiel

Le temps de latence du pic (t_p) du courant calcique bas-seuil est mesuré à partir du début du courant capacitif jusqu'au pic de courant calcique bas-seuil (figure 17A1). Les enregistrements du courant calcique bas-seuil utilisés sont les mêmes que ceux qui ont servis à réaliser l'étude du processus d'activation du courant.

La valeur moyenne de t_p en fonction des sauts de potentiel est illustrée dans la figure 17A2. Les barres verticales représentent l'écart-type des points.

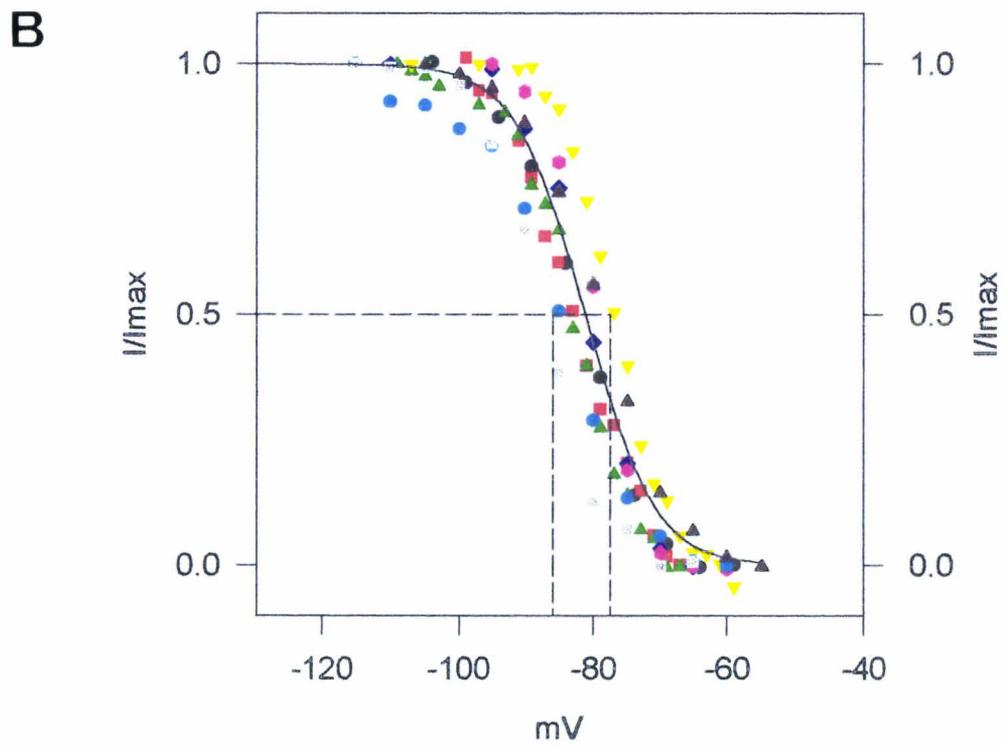
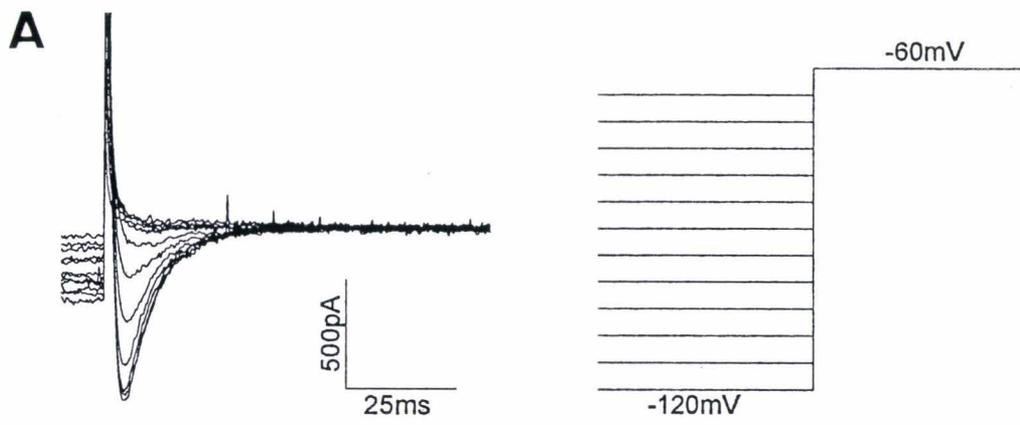
La courbe obtenue n'étant pas linéaire entre -80 et -50 mV, elle indique que le temps de latence du pic du courant calcique bas-seuil est dépendant du potentiel sur cette gamme de potentiel. Le temps de latence du pic du courant calcique bas-seuil varie entre 21 ms à -80 mV et 8 ms à -50 mV. Pour des potentiels plus positifs que -50 mV, t_p devient constant: il est donc insensible au potentiel au dessus de -50 mV.

Figure 18. Inactivation du courant calcique bas-seuil dans un neurone de type I.

A. Inactivation du courant calcique bas-seuil obtenue en réponse à l'application d'un simple protocole de stimulation constitué d'une série de pré-potentiels incrémentés par pas de 5mV à partir de -120mV jusqu'à -65mV et suivie d'un saut dépolarisant à -60mV.

B. Courbe d'inactivation moyenne du courant calcique bas-seuil exprimé dans 11 neurones et ajustée selon l'équation de Boltzmann. Les paramètres de la courbe ajustée sont: $V_{1/2} = -81.7 \pm 4.15\text{mV}$ (moyenne \pm écart-type) et $k = -4.52 \pm 0.80$ (moyenne \pm écart-type). Les symboles de couleur décrivent l'activation individuelle du courant calcique bas-seuil exprimé par chaque neurone (n=11).

Pour les enregistrements du courant calcique bas-seuil, la solution intrapipette 2 et la solution extracellulaire *e* ont été utilisées.



2. Processus d'inactivation du courant calcique bas-seuil

a. Protocole expérimental d'inactivation du courant calcique bas-seuil

L'inactivation du courant calcique bas-seuil est étudiée avec le protocole suivant. Une application incrémentée d'une polarisation du neurone (pré-potentiel) par pas de 2 ou de 5mV et comprise entre -120 et -50mV environ, précède un saut dépolarisant à -50mV environ permettant d'activer totalement le courant calcique bas-seuil. Les stimulations sont réalisées toutes les 30s. La réponse du neurone au saut dépolarisant varie en fonction de la valeur du pré-potentiel, ce qui permet de connaître l'état de disponibilité des canaux calciques bas-seuil en fonction de la valeur du pré-potentiel.

La figure 18A illustre les réponses d'un neurone de type I à ce protocole. Le courant calcique bas-seuil activé par le saut dépolarisant (-60mV dans la figure) gagne une amplitude maximale lorsque les pré-potentiels sont très hyperpolarisés (en dessous de -100mV dans la figure) et son amplitude diminue progressivement jusqu'à s'annuler lorsque les pré-potentiels deviennent progressivement moins négatifs.

b. Mise en évidence de la dépendance au potentiel du processus d'inactivation du courant calcique bas-seuil

Les résultats de cette étude sont indiqués dans le tableau 9.

L'amplitude relative moyenne du courant calcique en fonction du potentiel (courbe d'inactivation) enregistré sur 11 neurones, est illustrée dans la figure 18B. La courbe tracée provient de l'ajustement non linéaire selon l'équation dérivée de la relation de Boltzmann :

$$I / I_{max} = 1 / \{1 + \exp [(V_H - V_{1/2}) / k]\}$$

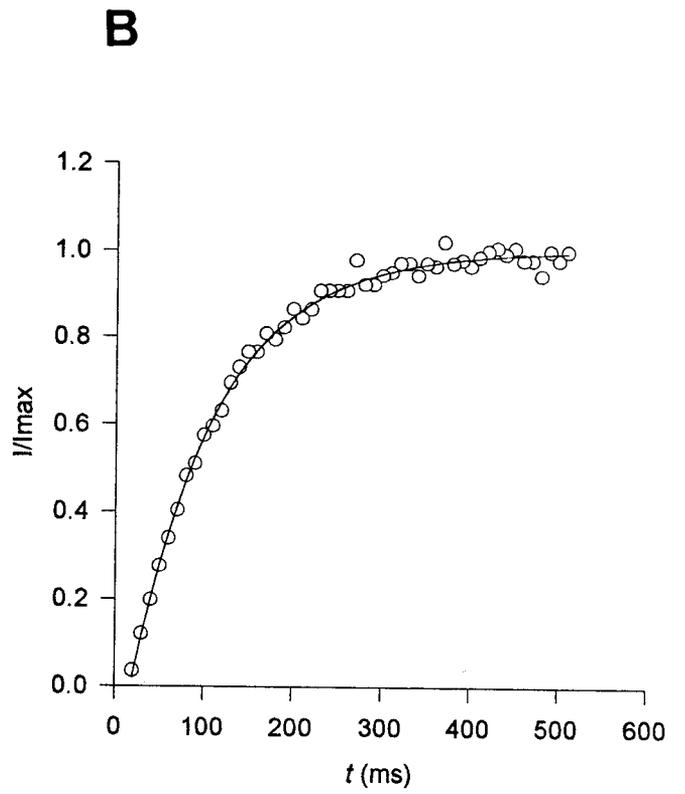
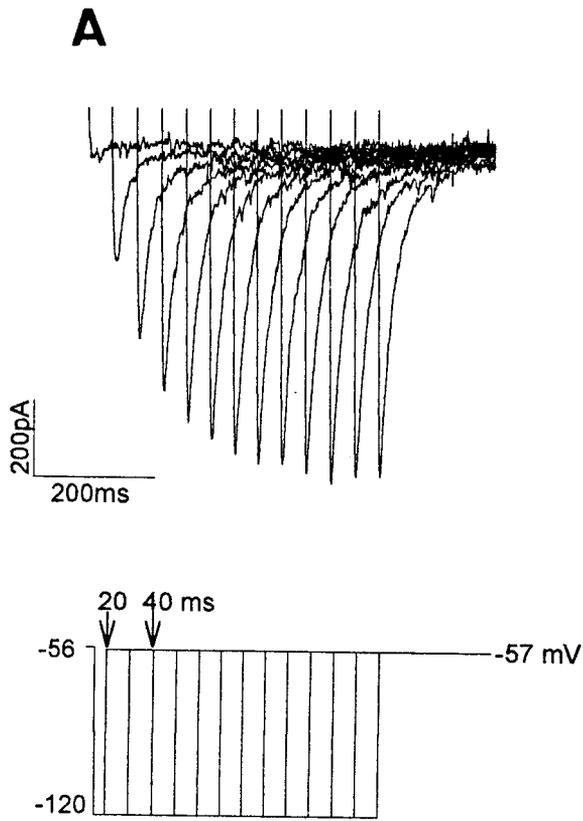
où I est l'intensité du courant pour le pré-potentiel V_H , I_{max} est l'intensité maximale du courant obtenue pour $V_H = -110\text{mV}$, $V_{1/2}$ est la valeur du potentiel permettant l'expression de la moitié de I_{max} et k est la pente de la courbe. La valeur moyenne de $V_{1/2}$ pour l'inactivation du courant calcique bas-seuil est de $-81.7 \pm 4.15\text{mV}$ (moyenne \pm écart-type) et la pente moyenne k est de -4.52 ± 0.80 (moyenne \pm écart-type) (tableau 9). L'inactivation totale du courant calcique est obtenue pour un potentiel de -60mV environ.

Figure 19. Cinétique de la restauration du courant calcique bas-seuil après inactivation des canaux.

A. Le potentiel membranaire du neurone est maintenu constamment à -56mV . A partir de ce potentiel dépolarisé, des sauts hyperpolarisants à -120mV et de durées croissantes, incrémentées par pas de 10ms , sont appliqués et précèdent le retour à un potentiel dépolarisé de -57mV . L'intensité du courant calcique bas-seuil augmente progressivement avec la durée du saut hyperpolarisant.

B. Les mesures de l'intensité du courant calcique bas-seuil pour ce neurone sont reportées dans une courbe en fonction de la durée du saut hyperpolarisant à -120mV . Les points suivent une courbe issue d'une fonction monoexponentielle, dont la constante de temps est de 97.08ms .

Pour les enregistrements du courant calcique bas-seuil, la solution intrapipette 2 et la solution extracellulaire *e* ont été utilisées.



c. Analyse de la constante de temps de l'inactivation (τ_{inact}) du courant calcique bas-seuil en fonction du potentiel

La phase du "déclin" progressif du courant calcique bas-seuil autrement appelée inactivation au sens strict, est due à la fermeture par inactivation des canaux calciques au cours du temps. Cette phase suit un décours de type exponentiel pouvant être défini par une constante de temps τ_{inact} qui est mesurable.

Pour déterminer la dépendance au potentiel de la cinétique d'inactivation du courant calcique bas-seuil, les enregistrements du courant utilisés sont issus du double protocole d'activation.

La figure 17B1 illustre des enregistrements du courant calcique bas-seuil activé pour un neurone de type I en réponse à trois sauts de potentiel dépolarisant d'intensité croissante et réalisés successivement à partir d'un pré-potentiel hyperpolarisé à -110mV. L'inactivation de chacun de ces courants est ajustée avec une courbe monoexponentielle issue de la fonction mathématique :

$$I = a \exp^{(bt)} + c$$

où I est l'intensité du courant membranaire, b est une constante, t représente le temps (ms), c est une constante et a représente la différence entre I et c pour des valeurs particulières de t . La constante de temps τ de l'inactivation du courant, exprimée en ms, est donnée par l'inverse de b , c'est-à-dire $1 / b$.

Les constantes de temps d'inactivation du courant calcique bas-seuil mesurées sont respectivement de 33.8, 21.4 et 12.3ms pour des sauts de potentiel réalisés à -80, -75 et -70mV pour le neurone illustré dans la figure 17B1.

La courbe illustrée dans la figure 17B2 représente les valeurs des constantes de temps d'inactivation moyennes du courant calcique bas-seuil en fonction des sauts de potentiel réalisés dans le double protocole de stimulation. Les barres verticales représentent l'écart-type des valeurs moyennes de τ_{inact} obtenues pour les 14 neurones.

Les résultats indiquent que la constante de temps d'inactivation est peu sensible au potentiel car elle diminue de 25 à 12 ms entre -80 à -70mV. Ensuite, lorsque le potentiel devient plus positif que -70mV, τ_{inact} reste relativement constante à la valeur approximative de 12ms.

Figure 20. Effets du cobalt et du nickel sur le courant calcique bas-seuil des neurones aBPA de type I.

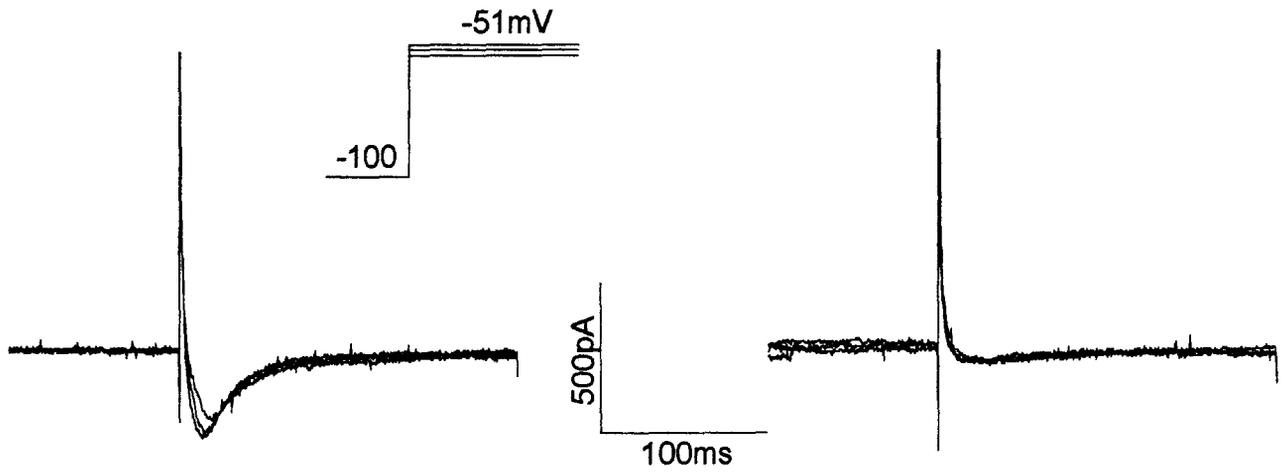
A. Effet du cobalt (Co^{2+}) sur le courant calcique bas-seuil d'un neurone aBPA. Trois sauts de potentiel dépolarisant à -47, -49 et -51mV sont réalisés à partir d'un pré-potentiel maintenu pendant 1s à -100mV. (A à gauche) Enregistrement de contrôle du courant calcique bas-seuil réalisé dans la solution extracellulaire normale *a*. (A à droite) En présence de la solution extracellulaire *b* contenant 2.5mM de Co^{2+} , le courant calcique bas-seuil est supprimé.

B. Effet du nickel (Ni^{2+}) sur le courant calcique bas-seuil d'un autre neurone aBPA. Trois sauts de potentiel dépolarisant à -44, -46 et -48mV sont réalisés à partir d'un pré-potentiel maintenu pendant 1s à -110mV. (B à gauche) Enregistrement de contrôle du courant calcique bas-seuil réalisé dans la solution extracellulaire normale *a*. (B à droite) En présence de la solution extracellulaire *a* contenant 500 μ M de Ni^{2+} , le courant calcique bas-seuil est supprimé.

Le milieu intrapipette utilisé dans ces deux expériences est la solution *I*.

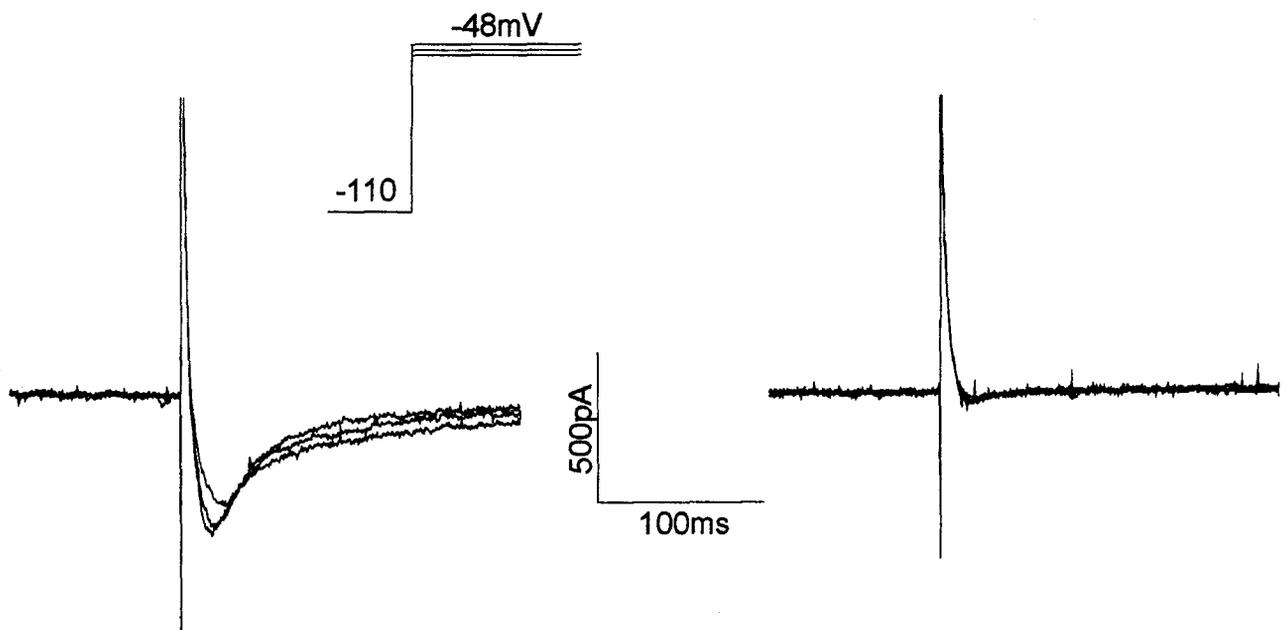
A

Cobalt



B

Nickel



d. Cinétique de restauration du courant calcique bas-seuil après inactivation des canaux

La restauration progressive du courant calcique bas-seuil après l'inactivation des canaux est étudiée en fonction du temps sur 5 neurones. La figure 19A illustre les réponses d'un neurone maintenu constamment à -56mV , ce processus permettant d'inactiver les canaux calciques bas-seuil. À partir de ce potentiel dépolarisé, des sauts hyperpolarisants à -120mV et de durées croissantes sont appliqués. Ils précèdent le retour vers un potentiel dépolarisé de -57mV , valeur de potentiel pour laquelle l'inactivation dépendante du potentiel du courant calcique bas-seuil est nulle selon les observations faites précédemment.

L'enregistrement du neurone illustré dans la figure 19A montre qu'une augmentation progressive de l'amplitude du courant calcique, significative de la restauration des canaux dans la configuration dé-inactivée, se produit en fonction de la durée du créneau hyperpolarisant. Ces résultats sont reportés sous la forme d'une courbe (figure 19B) qui représente l'amplitude relative du courant calcique restauré en fonction de la durée de l'hyperpolarisation. Cette courbe décrit un décours monoexponentiel défini par une constante de temps de 100ms environ.

III. Propriétés pharmacologiques du courant calcique bas-seuil

L'action des agents pharmacologiques a été étudiée sur des neurones de type I appartenant aux deux sous-classes aBPA et sBPA. Dans cette étude, les milieux intrapipettes et extracellulaires utilisés pour réaliser les différentes expériences permettent la distinction du sous-type cellulaire des neurones de type I. Comme les enregistrements du courant calcique bas-seuil ne pouvaient pas être maintenus plus de 30min dans les solutions 2 et e utilisées dans l'étude précédente, il n'a pas été possible de réaliser l'étude de ses propriétés pharmacologiques dans les mêmes conditions expérimentales, le laps de temps étant trop court pour observer les effets et la réversibilité potentielle de l'action des substances pharmacologiques utilisées. La majeure partie des expériences pharmacologiques a donc été réalisée à partir d'enregistrements du courant calcique bas-seuil non isolé, sauf de celui du courant sodique effectué par une addition de TTX dans la solution extracellulaire. Les résultats ainsi obtenus ont donc été exploités principalement de manière qualitative.

La solution intrapipette choisie est la solution 1 pour toutes les expériences décrites dans

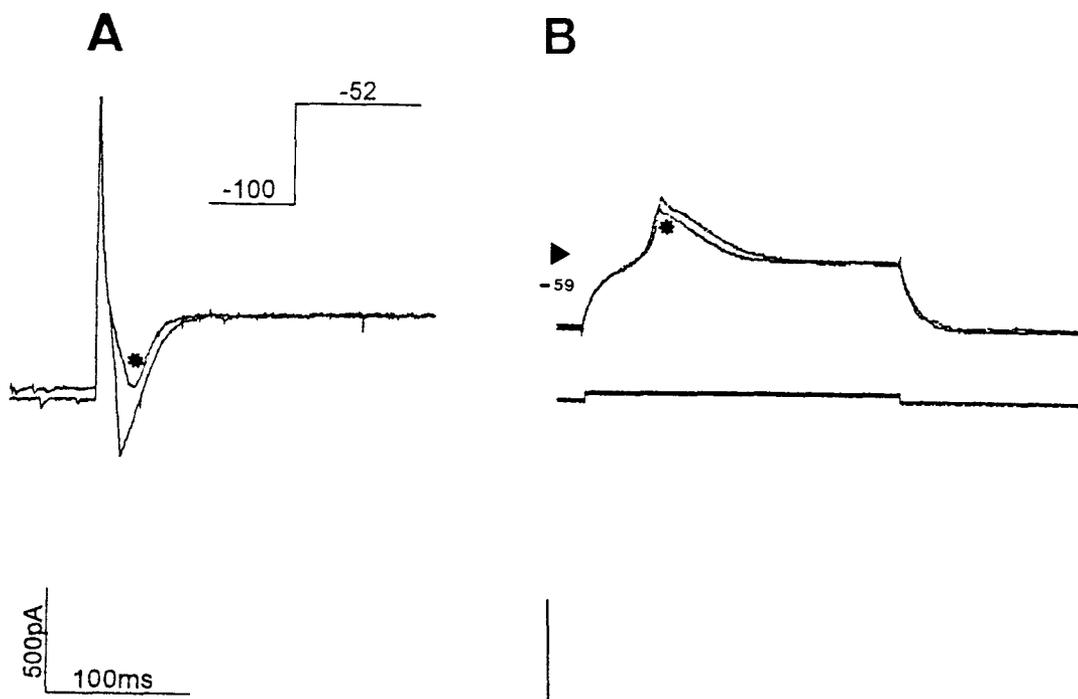


Figure 21. Effet de l'amiloride sur le courant calcique bas-seuil et sur le potentiel dépolarisant lent des neurones aBPA de type I.

A. Effet de l'amiloride (1mM) sur le courant calcique bas-seuil d'un neurone aBPA. Un saut de potentiel dépolarisant à -52mV est réalisé à partir d'un pré-potentiel à -100mV. Un enregistrement de contrôle du courant calcique bas-seuil est réalisé dans la solution extracellulaire normale α . Cette solution est ensuite remplacée par la solution α dans laquelle l'amiloride (1mM) est ajoutée. L'enregistrement du courant calcique bas-seuil réalisé en présence d'amiloride est indiqué par un astérisque. L'addition de l'amiloride provoque une diminution du courant calcique bas-seuil.

B. Effet de l'amiloride (1mM) sur le potentiel dépolarisant lent d'un autre neurone aBPA enregistré en présence de TTX (2 μ M). Un créneau de courant dépolarisant est réalisé à partir du potentiel membranaire hyperpolarisé à -100mV. Un enregistrement de contrôle du potentiel dépolarisant lent est effectué dans la solution extracellulaire α . Cette solution est ensuite remplacée par la solution α dans laquelle l'amiloride (1mM) est ajoutée. L'enregistrement du potentiel dépolarisant lent réalisé en présence d'amiloride est signalé par un astérisque. L'addition de l'amiloride provoque une faible diminution du potentiel dépolarisant lent.

Le milieu intrapipette utilisé dans ces deux expériences est la solution I.

Barres d'échelle pour les enregistrements en courant-imposé: 40mV, 2nA et 100ms.

Agents pharmacologiques	Effet sur I_T et sur le potentiel dépolarisant lent
TTX (1-2 μ M)	résistant
Ca^{2+} (2.5-0.1-0 mM)	très sensible
Ba^{2+} (2.5mM, Ca free)	sensible
Co^{2+} (2mM)	très sensible
Ni^{2+} (0.5mM)	très sensible
Amiloride (1mM)	sensible
Octanol (1mM)	sensible
Nifédipine (0.01-0.1mM)	résistant
Flunarizine (1 μ M)	résistant
Mibefradil (10 μ M)	peu sensible

Tableau 10. Propriétés pharmacologiques du courant calcique bas-seuil (I_T) et du potentiel dépolarisant lent dans les neurones de type I.

cette partie de l'étude excepté pour l'expérience visant à démontrer l'effet du Ba^{2+} . Les différentes solutions extracellulaires utilisées seront signalées pour chaque expérience.

Les protocoles de stimulation sont tous identiques. Ils débutent par l'imposition d'un pré-potentiel hyperpolarisé en dessous de $-100mV$, permettant de dé-inactiver les canaux calciques bas-seuil, et qui sont suivis par l'application d'une série de sauts dépolarisants incrémentsés par pas de 2 ou de $5mV$, réalisée dans la zone d'activation du courant qui est dépendante du potentiel, c'est à dire entre -90 et $-45mV$ environ.

L'ensemble des résultats obtenus dans cette étude est repris dans le tableau 10.

1. Effet des bloqueurs calciques

a. Effet du Co^{2+}

Les enregistrements de contrôle du courant calcique bas-seuil sont d'abord réalisés avec la solution extracellulaire α ; cette solution est ensuite remplacée par la solution b contenant du Co^{2+} , utilisé dans cette expérience en tant qu'inhibiteur des courants calciques. La réversibilité de l'effet du Co^{2+} n'a pas été testée.

Le Co^{2+} à $2.5mM$ supprime totalement le courant calcique bas seuil dans les neurones aBPA ($n=3$) (figure 20A) et dans les neurones sBPA (non illustré) ($n=2$). Ce résultat confirme la nature calcique du courant entrant bas-seuil.

b. Effet du Ni^{2+}

A la concentration de $500\mu M$, le Ni^{2+} ajouté à la solution extracellulaire α , supprime complètement le courant calcique bas-seuil dans les neurones aBPA ($n=3$) (figure 20B) et dans les neurones sBPA ($n=2$) au bout de 20 min d'application. L'effet du Ni^{2+} sur le courant calcique bas-seuil est totalement réversible (non illustré) au bout de 30min de perfusion de la solution α normale.

Le courant calcique bas-seuil est donc extrêmement sensible à $500\mu M$ de Ni^{2+} ; c'est une propriété qui caractérise un courant calcique de type T.

Figure 22. Effet de l'octanol sur le courant calcique bas-seuil et sur les potentiels dépolarisants lents des neurones aBPA et sBPA de type I.

A. Effet de l'octanol (1mM) sur le courant calcique bas-seuil d'un neurone aBPA. Un saut de potentiel dépolarisant à -60mV est réalisé à partir d'un pré-potentiel à -120mV. Un enregistrement de contrôle du courant calcique bas-seuil est réalisé dans la solution extracellulaire normale *a*. Cette solution est ensuite remplacée par la solution *a* dans laquelle l'octanol (1mM) est ajouté. L'enregistrement du courant calcique bas-seuil réalisé en présence d'octanol est indiqué par un astérisque. L'addition de l'octanol provoque une diminution du courant calcique bas-seuil.

B. (B1) Effet de l'octanol (1mM) sur le potentiel dépolarisant lent d'un autre neurone aBPA enregistré en courant-imposé. Un créneau de courant dépolarisant est réalisé à partir du potentiel membranaire hyperpolarisé à -100mV. (B1 à gauche) Un enregistrement de contrôle du potentiel dépolarisant lent est effectué dans la solution extracellulaire *a*. Le potentiel dépolarisant lent permet le déclenchement de quatre potentiels d'action à son sommet. (B1 à droite) L'addition d'octanol (1mM) dans la solution *a* provoque une diminution de l'amplitude du potentiel dépolarisant lent accompagnée d'une réduction du nombre de potentiels d'action (astérisque).

(B2) Effet de l'octanol sur le potentiel dépolarisant lent émis par un autre neurone aBPA en présence de TTX (2 μ M). (B2 à gauche) La trace du potentiel dépolarisant lent de contrôle enregistrée dans le milieu normal *a* est superposée avec celle du potentiel dépolarisant lent après 15min de perfusion d'octanol (1mM) ajouté dans la solution *a*. On note une faible réduction du potentiel dépolarisant lent (astérisque).

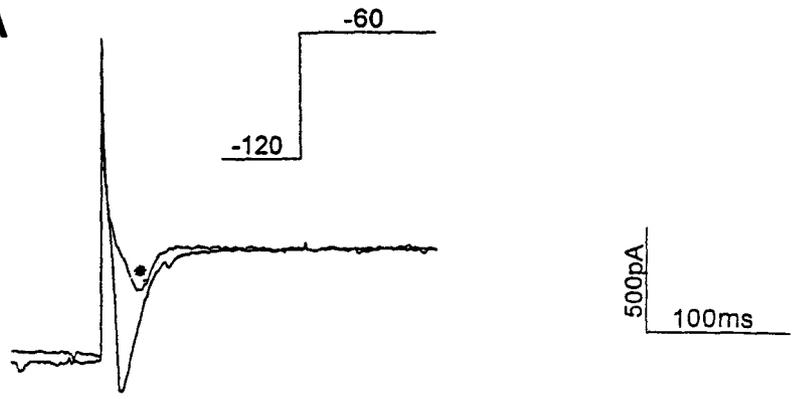
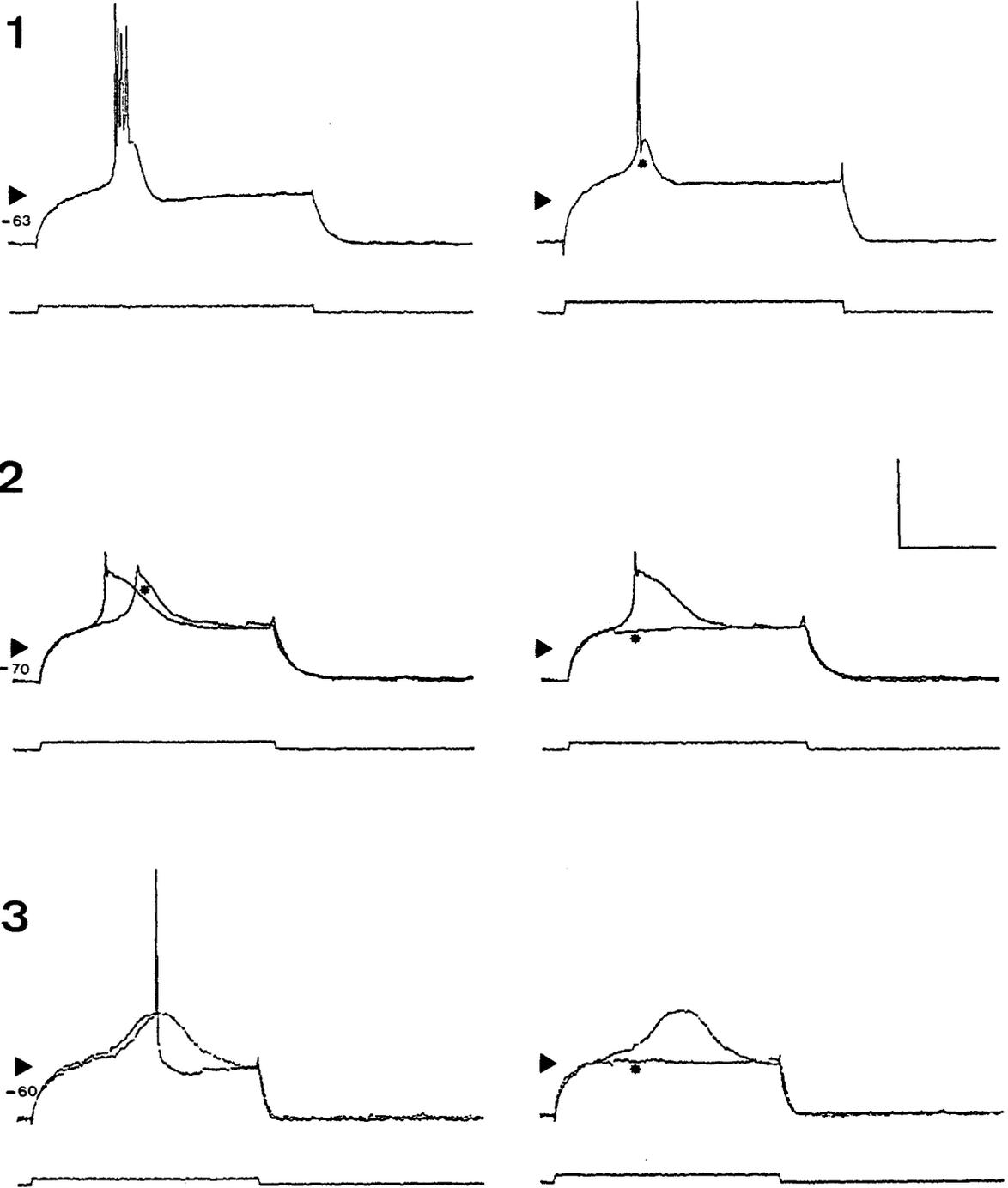
(B2 à droite) Après 25min de perfusion d'octanol, le potentiel dépolarisant lent est complètement supprimé (astérisque). L'enregistrement réalisé en milieu normal est superposé à celui réalisé en présence d'octanol.

(B3) Effet de l'octanol sur le potentiel dépolarisant lent émis par un neurone sBPA. (B3 à gauche) La trace du potentiel dépolarisant lent de contrôle enregistrée dans le milieu normal *a* est superposée à celle du potentiel dépolarisant lent enregistré sous TTX (2 μ M) qui abolit le déclenchement du potentiel d'action.

(B3 à droite) Au bout de 25min de perfusion d'octanol ajouté dans la solution *a*, le potentiel dépolarisant lent est totalement supprimé (astérisque). L'enregistrement réalisé en milieu normal est superposé à celui réalisé en présence d'octanol.

Le milieu intrapipette utilisé dans l'ensemble de ces expériences est la solution *I*.

Barres d'échelle pour les enregistrements en courant-imposé: 40mV, 2nA et 100ms.

A**B**

c. Effet de l'amiloride

Sur les neurones aBPA (n=3) comme sur les neurones sBPA (n=1), l'amiloride (1mM dans la solution *a*) bloque environ 45% du courant calcique bas-seuil. La figure 21A illustre l'effet de l'amiloride sur le courant calcique bas-seuil d'un neurone aBPA dont l'amplitude maximale est obtenue en réponse à un saut de potentiel dépolarisant (-52mV dans la figure). L'addition d'amiloride provoque une nette réduction du courant calcique bas-seuil activé par ce neurone.

En courant-imposé, l'amiloride ne provoque qu'une faible réduction du potentiel dépolarisant lent dans les neurones aBPA (n=4) et sBPA (n=1). La figure 21B montre l'effet de l'amiloride sur le potentiel dépolarisant lent d'un neurone de type aBPA.

Il faut remarquer que la nette dépression du courant calcique bas-seuil induite par l'amiloride ne provoque pas la diminution du potentiel dépolarisant dans les mêmes proportions.

d. Effet de l'octanol

L'octanol (1mM dans la solution *a*) réduit d'environ 70% le courant calcique bas-seuil des neurones aBPA (n=3) et sBPA (n=1) et cet effet est réversible après une heure de rinçage dans le milieu de perfusion de contrôle. La figure 22A illustre l'effet bloquant de l'octanol sur le courant calcique bas-seuil activé dans un neurone aBPA et dont l'amplitude maximale est obtenue avec un saut dépolarisant à -60mV appliqué à partir d'un pré-potentiel de -120mV.

En courant-imposé, l'effet inhibiteur de l'octanol est également observé sur les potentiels dépolarisants lents enregistrés dans les neurones aBPA (n=3) (figures 22B1 et 22B2) et les neurones sBPA (n=2) (figure 22B3). L'addition d'octanol provoque une réduction du nombre de potentiels d'action émis au sommet du potentiel dépolarisant lent des neurones aBPA (figure 22B1). Cet effet est dû à une réduction de l'amplitude des potentiels dépolarisants lents, ce qui est confirmé lorsque les potentiels dépolarisants lents des neurones aBPA sont enregistrés en présence de TTX (figure 22B2). L'amplitude du potentiel dépolarisant lent est réduite au bout de 10min de perfusion avec l'octanol et la pente ascendante du potentiel n'est pas affectée. Au bout de 25min de perfusion, le potentiel dépolarisant est complètement supprimé. Cependant lorsque le saut dépolarisant appliqué est d'amplitude plus élevée, un potentiel dépolarisant lent d'amplitude faible est encore observé en réponse (non illustré).

L'effet de l'octanol est testé de la même manière sur les neurones sBPA en courant-imposé (figure 22B3). Comme pour les neurones aBPA, le potentiel dépolarisant des neurones

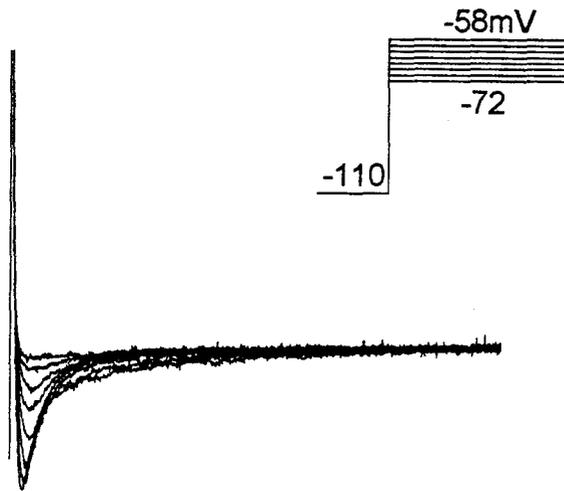
Figure 23. Effets de la nifédipine et de la flunarizine sur le courant calcique bas-seuil des neurones aBPA de type I.

A. Effet de la nifédipine sur le courant calcique bas-seuil exprimé dans un neurone aBPA. Une série de sauts dépolarisants entre -72 et -58mV est appliquée à partir d'un pré-potentiel à -110mV. (A à gauche) Des enregistrements de contrôle du courant calcique bas-seuil sont réalisés dans le milieu extracellulaire *a*. (A à droite) L'addition de la nifédipine (10^{-4} M) dans le milieu extracellulaire *a* ne modifie pas le courant calcique bas-seuil.

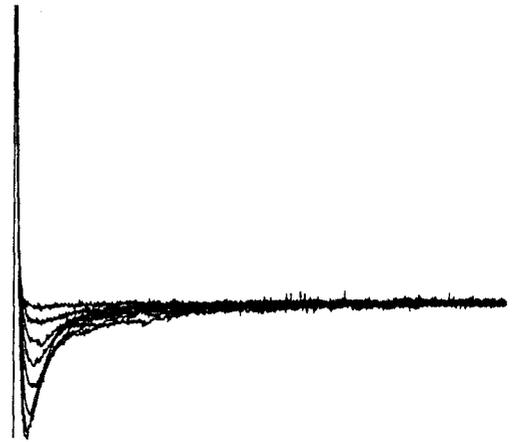
B. Effet de la flunarizine sur le courant calcique bas-seuil exprimé dans un autre neurone aBPA. Une série de sauts dépolarisants entre -68 et -54mV est appliquée à partir d'un pré-potentiel à -110mV. (B à gauche) Des enregistrements de contrôle du courant calcique bas-seuil sont réalisés dans le milieu extracellulaire *a*. (B à droite) L'addition de la flunarizine (1 μ M) dans le milieu extracellulaire *a* ne modifie pas le courant calcique bas-seuil.

Le milieu intrapipette utilisé dans l'ensemble de ces expériences est la solution *1*.

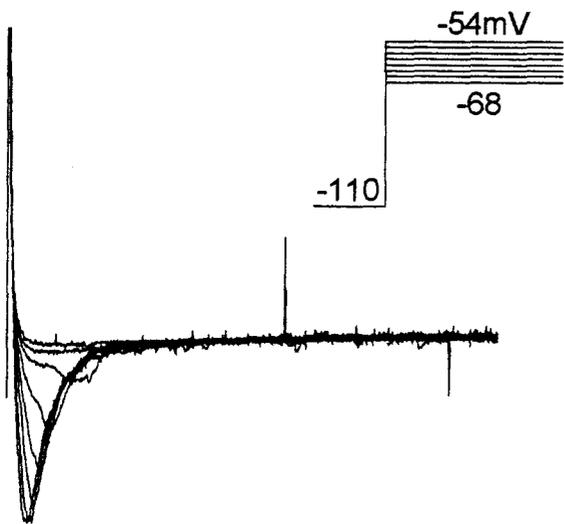
A



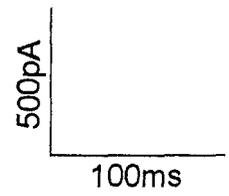
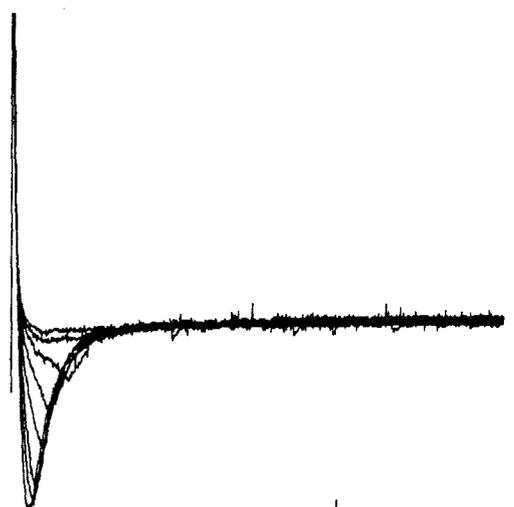
nifédipine



B



flunarizine



sBPA est complètement supprimé lorsque l'octanol est appliqué pendant 25 min. Comme pour les neurones aBPA, si le saut dépolarisant appliqué est plus fort, un potentiel dépolarisant d'amplitude faible peut parfois être émis (non illustré).

Dans tous les cas, l'effet de l'octanol est réversible au bout de 60min environ (non illustré).

e. Effet de la nifédipine

La nifédipine (10^{-4} M dans la solution extracellulaire α) ne modifie pas le courant calcique bas-seuil exprimé que ce soit dans les neurones aBPA (figure 23A) (n=3) ou dans les neurones sBPA (non illustré) (n=2).

f. Effet de la flunarizine

La flunarizine (1μ M dans la solution extracellulaire α) n'a aucun effet sur les courants calciques bas-seuil des neurones aBPA (figure 23B) (n=2) et sBPA (non illustré) (n=2). En courant-imposé, il est noté une absence d'effet de la flunarizine sur les potentiels dépolarisant lents émis par les neurones aBPA (n=1) et sBPA (n=1) (non illustré).

g. Effet du mibefradil (Ro 40-5967)

L'effet du mibefradil (10μ M dans la solution extracellulaire α) est testé sur les deux sous-types de neurones de type I (figure 24). Puisque l'effet de la substance est peu visible sur le courant calcique bas-seuil exprimé par les neurones, une soustraction des réponses obtenues en présence du milieu de contrôle (figures 24Aa et 24Ba) et des réponses obtenues en présence du mibefradil (figures 24Ab et 24Bb) est réalisée. Le résultat des soustractions est illustré dans les figures 24Ac et 24Bc.

Dans les neurones aBPA (n=3), la substance induit une suppression partielle du courant calcique bas-seuil (figure 24A).

Dans les neurones sBPA (n=2), les enregistrements montrent des résultats similaires (figure 24B). Il faut noter que l'effet supprimeur du mibefradil sur le courant calcique bas-seuil n'est perçu qu'au bout de 20 à 30 minutes d'application de la substance.

Figure 24. Effet du mibefradil sur les courants calciques bas-seuil des neurones aBPA et sBPA de type I.

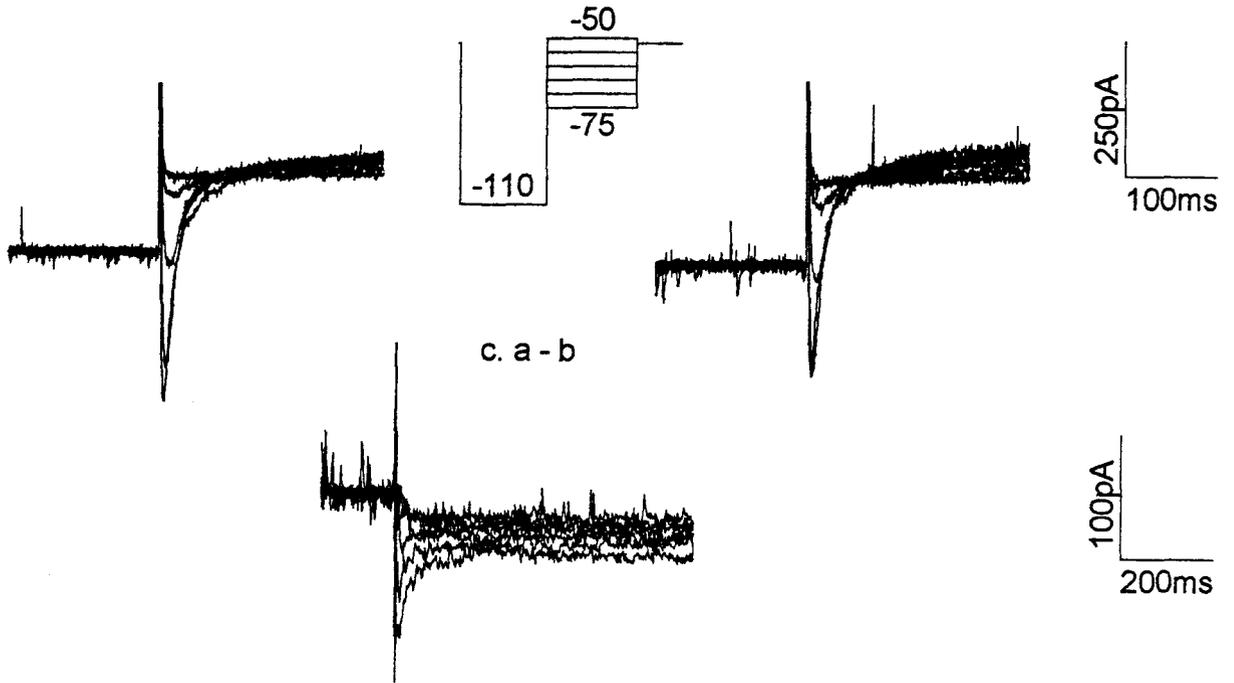
A. Effet du mibefradil sur le courant calcique bas-seuil d'un neurone aBPA. Une série de sauts dépolarisants entre -75 et -50mV est appliquée à partir d'un pré-potentiel à -110mV. (a) Des enregistrements de contrôle de l'activation du courant calcique bas-seuil sont réalisés dans le milieu extracellulaire *a*. (b) Des stimulations identiques sont réalisées en présence de mibefradil (10 μ M), ajouté à la solution *a*, au bout de 20min. (c) Les enregistrements obtenus en a et en b sont soustraits et mettent en évidence la légère suppression du courant calcique bas-seuil provoquée par le mibefradil.

B. Effet du mibefradil sur le courant calcique bas-seuil d'un neurone sBPA. Une série de sauts dépolarisants entre -70 et -25mV est appliquée à partir d'un pré-potentiel à -120mV. (a) Des enregistrements de contrôle de l'activation globale des courants de ce neurone sont réalisés dans le milieu extracellulaire *a*. (b) Des stimulations identiques sont réalisées en présence de mibefradil (10 μ M), ajouté à la solution *a*, au bout de 30min. (c) Les enregistrements obtenus en a et en b sont soustraits et mettent en évidence la légère suppression du courant calcique bas-seuil provoquée par l'addition du mibefradil.

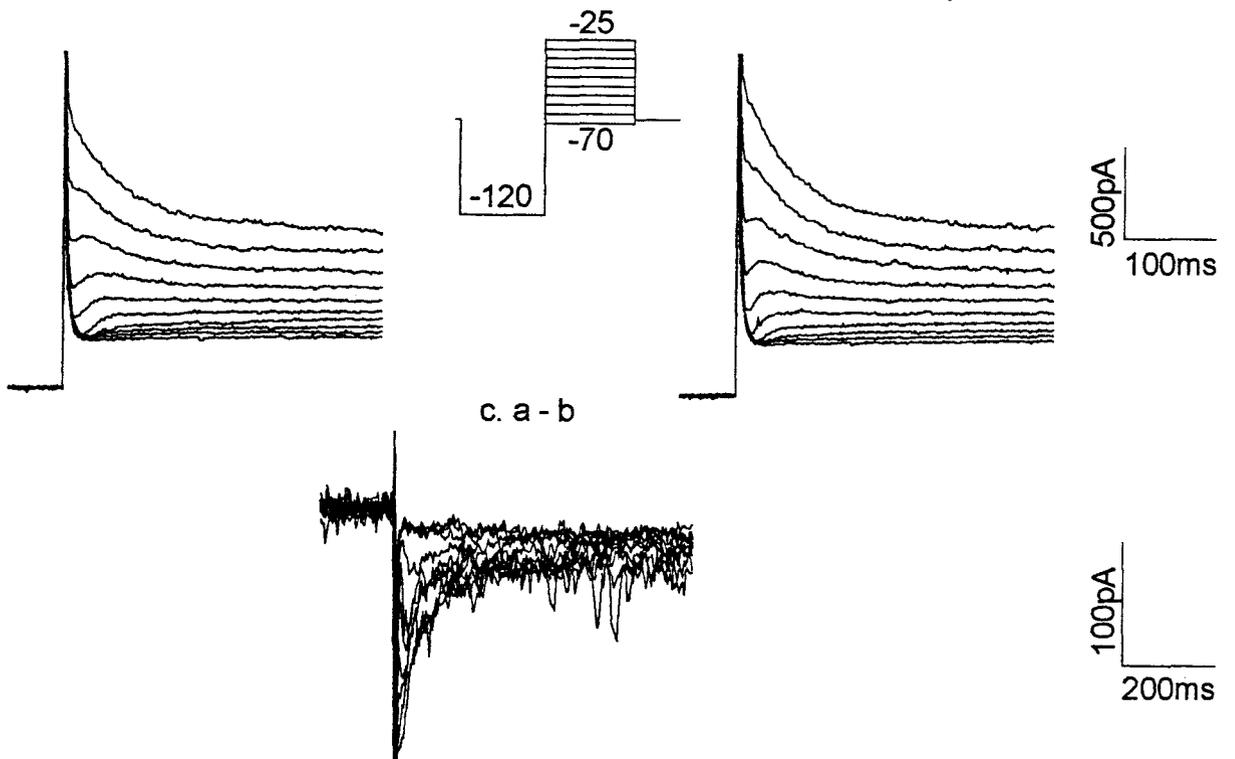
Le milieu intrapipette utilisé dans l'ensemble de ces expériences est la solution *I*.

A**neurone aBPA**

a. Milieu normal

b. Mibefradil 10 μ M**B****neurone sBPA**

a. Milieu normal

b. Mibefradil 10 μ M

2. Effet de la substitution du Ba^{2+} au Ca^{2+}

Les enregistrements du courant Ba^{2+} passant au travers des canaux calciques bas-seuil nécessitent l'isolement total du courant calcique bas-seuil et notamment l'élimination du courant potassique transitoire et des courants calciques haut-seuil. Afin d'éviter un effet du Ba^{2+} sur des conductances ioniques autres que celle du courant calcique bas-seuil, les conditions expérimentales ont nécessité l'utilisation des solutions intrapipette 2 et extracellulaire e qui, rappelons le, permettent d'isoler complètement le courant calcique bas-seuil.

Les enregistrements de contrôle du courant calcique bas-seuil sont d'abord réalisés avec la solution extracellulaire e ; ensuite ils sont réalisés en présence de la solution e dans laquelle le $BaCl_2$ remplace le $CaCl_2$.

Dans ces conditions, l'effet du remplacement équimolaire du Ca^{2+} par le Ba^{2+} est testé sur les neurones de type I ($n=5$). Pour des raisons identiques à celles qui ont été expliquées précédemment en introduction à l'étude des propriétés biophysiques et cinétiques du courant calcique bas-seuil, il n'est pas possible de distinguer le sous-type des neurones de type I enregistrés dans ces expériences.

Les résultats montrent que l'amplitude du courant passant par les canaux calciques bas-seuil est fortement réduite en présence du Ba^{2+} .

La figure 25A représente le courant calcique bas-seuil normal activé dans un neurone de type I par l'application d'une série de sauts de potentiel à partir de -80 jusqu'à -50 mV. La substitution du Ba^{2+} au Ca^{2+} induit une nette dépression de l'amplitude du courant bas-seuil (figure 25B), sans modifier la durée de son processus d'activation.

La courbe courant-potentiel illustrée dans la figure 25C indique plus exactement que 54.5% du courant bas-seuil est supprimé par cette substitution sans altération visible de son processus d'activation. En effet, le seuil d'activation et le potentiel donnant l'intensité maximale du courant entrant bas-seuil ne sont pas modifiés en présence de Ba^{2+} .

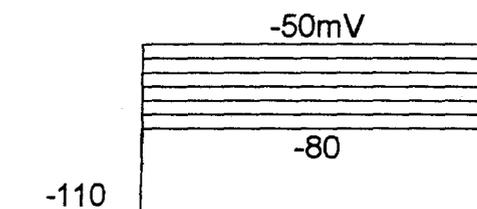
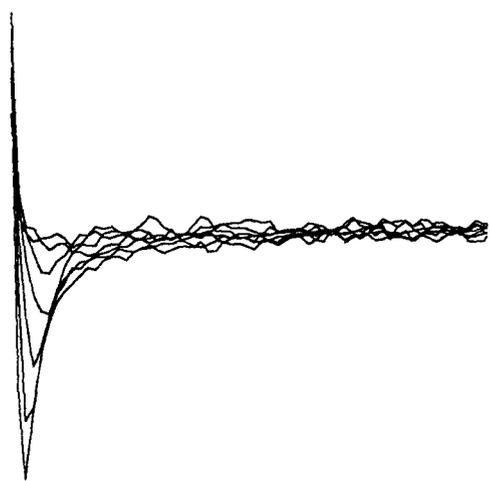
Figure 25. Effet du baryum sur le courant calcique bas-seuil d'un neurone de type I.

Une série de sauts dépolarisants entre -80 et -50mV est appliquée à partir d'un pré-potentiel à -110mV.

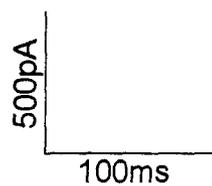
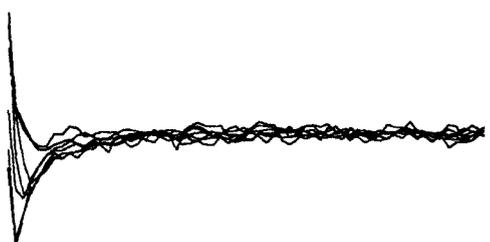
A. Des enregistrements de contrôle de l'activation du courant calcique bas-seuil sont réalisés dans le milieu extracellulaire *e*. **B.** Des stimulations identiques sont réalisées en présence de la solution extracellulaire *e* dans laquelle le CaCl_2 a été remplacé par le BaCl_2 de manière équimolaire. La présence du baryum provoque une nette réduction du courant bas-seuil. **C.** Courbes courant-potentiel des courants bas-seuil issus des enregistrements illustrés en A et en B. La courbe courant-potentiel réalisée en milieu BaCl_2 (cercles pleins) indique que les intensités du courant ont subi une réduction de moitié par rapport à celles qui sont observées en milieu CaCl_2 (cercles vides). La valeur du potentiel qui permet d'obtenir le maximum d'amplitude du courant bas-seuil n'est pas modifiée, elle se situe dans les deux cas à environ -40mV.

Le milieu intrapipette utilisé dans l'ensemble de ces expériences est la solution 2.

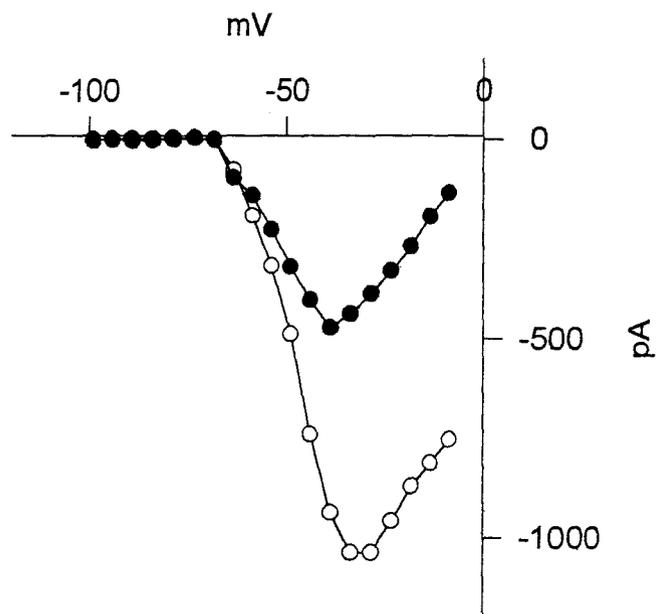
A CaCl_2



B BaCl_2



C



B. LE COURANT POTASSIQUE TRANSITOIRE DANS LES NEURONES DE LA REGION DU NOYAU MAGNOCELLULAIRE DORSAL : ETUDE BIOPHYSIQUE, CINETIQUE ET PHARMACOLOGIQUE

Les résultats sont basés sur l'enregistrement en *patch-clamp*, configuration "cellule entière", de 42 neurones localisés dans la région du NMD.

I. Propriétés biophysiques et cinétiques du courant potassique transitoire

L'ensemble de l'étude biophysique et cinétique du courant potassique transitoire a été réalisé sur 5 neurones de type I et 5 neurones de type II sélectionnés parmi 25 neurones enregistrés. Les neurones de type II sont enregistrés avec le milieu intrapipette *I* et la solution extracellulaire *a*. Les neurones de type I sont enregistrés avec le milieu intrapipette *I* et indifféremment la solution extracellulaire *a*, dans laquelle le CaCl_2 est remplacé par le MgCl_2 afin de supprimer les courants calciques, ou la solution *f*. La solution *f* contient du Ni^{2+} ce qui permet de bloquer le courant calcique bas-seuil et du Cs^+ ce qui permet de bloquer les conductances potassiques des rectifications anormales. L'utilisation de ces deux solutions extracellulaires a donné des résultats comparables.

1. Processus d'activation du courant potassique transitoire

a. Mesure du potentiel d'inversion du courant potassique transitoire

Le potentiel d'inversion du courant potassique transitoire est mesuré en réalisant une activation du courant pendant 4ms. L'activation du courant est effectuée en hyperpolarisant tout d'abord le potentiel membranaire à -120mV puis en réalisant un saut dépolarisant vers 0mV. Suite à ce saut, le potentiel membranaire revient à des valeurs incrémentées entre -100 et -30mV par pas de 5mV pendant au moins 300ms. Sachant que le milieu *I* intrapipette contient 130mM de K^+ et que la solution *a* extracellulaire sans CaCl_2 et la solution *f* contiennent chacune 4.7mM de K^+ , le

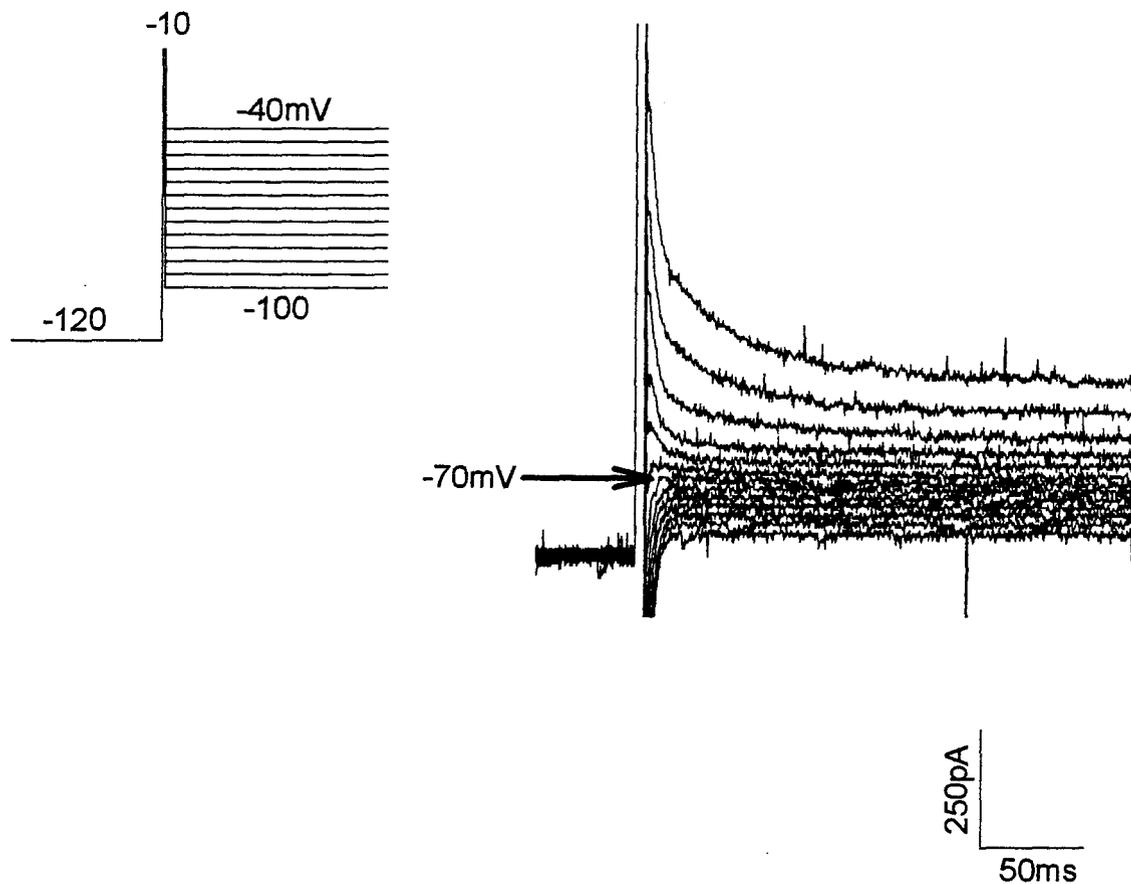


Figure 26. Mesure du potentiel d'inversion du courant sortant transitoire dans un neurone de type I.

Le pré-potentiel est maintenu à -120mV pendant 1s puis un saut dépolarisant de 4ms à -10mV est effectué, permettant d'activer le courant sortant transitoire. Suite à ce saut, le potentiel revient à des valeurs incrémentées par pas de 5mV entre -100 et -40mV . Ce protocole entraîne la désactivation des canaux qui va provoquer l'apparition de courants de queue de sens entrant pour des potentiels très négatifs et de sens sortant pour des potentiels moins négatifs. Lorsque le courant de queue s'annule, cela indique la valeur du potentiel d'inversion du courant qui est à l'origine du courant sortant transitoire. L'enregistrement illustré ici indique une inversion du potentiel à -70mV .

Les solutions utilisées dans cette expérience sont le milieu intrapipette *I* et la solution extracellulaire *f* contenant respectivement 130 et 4.7mM de K^+ .

potentiel d'équilibre aux ions K^+ , calculé selon l'équation de Nernst, est de -83mV environ. La valeur du potentiel d'inversion du courant potassique transitoire est trouvée entre -75 et -70mV dans les neurones de type I (n=3) (figure 26) ainsi que dans les neurones de type II (n=1), ce qui correspond environ au potentiel d'équilibre d'un canal spécifique au potassium calculé avec l'équation de Nernst.

b. Protocole expérimental d'activation du courant potassique transitoire

Le processus d'activation du courant potassique transitoire est étudié en utilisant un double protocole de stimulation appelé protocole AB. La première partie (A) du protocole AB consiste à maintenir pendant 1s le potentiel membranaire hyperpolarisé vers -120mV (pré-potentiel) ce qui permet de dé-inactiver les canaux potassiques transitoires. A partir du pré-potentiel, une série de créneaux dépolarisants incrémentés par pas de 5mV est appliquée. Le protocole A permet d'enregistrer l'activation du courant potassique transitoire, du courant potassique de la rectification retardée I_K et du courant de fuite (figures 27A et 28A). Dans la seconde partie (B) du protocole AB, l'addition d'un court créneau dépolarisant à -50mV est réalisée juste avant les sauts dépolarisants incrémentés. Le protocole B permet d'inactiver le courant potassique transitoire tout en conservant les courants I_K et de fuite (figures 27B et 28B). La soustraction des réponses obtenues par les deux protocoles de stimulation permet d'isoler le courant potassique transitoire par élimination des deux autres courants (figures 27C et 28C).

Le courant potassique transitoire évoqué par les deux types de neurones s'active rapidement et s'inactive au bout de 300 à 400ms environ dans les neurones de type II (figure 28C) et de 50 à 100ms environ dans les neurones de type I (figure 27C). Les courbes courant-potentiel issues des réponses des deux neurones illustrés dans les figures 27 et 28 montrent que le courant potassique transitoire s'active vers -65mV dans les deux cas (figure 29). La figure 29 montre que le courant potassique transitoire est de plus grande amplitude dans les neurones de type II (3nA au maximum d'activation) que dans les neurones de type I (1nA au maximum d'activation). Dans les deux cas, l'amplitude maximale du courant potassique transitoire est atteinte vers 0mV.

Figure 27. Activation du courant potassique transitoire dans un neurone de type I.

Le neurone est soumis à un double protocole de stimulation appelé protocole AB. **A.** Dans le premier protocole de stimulation, le pré-potentiel est fixé pendant 1s à -120mV pour permettre la dé-inactivation des canaux potassiques transitoires et il est suivi par l'application d'une série de sauts de potentiel dépolarisant entre -90 et 5mV. La réponse du neurone à la série de sauts provoque l'activation progressive du courant potassique transitoire associée au courant de fuite et au courant potassique de la rectification retardée I_K . **B.** Dans le second protocole de stimulation, le pré-potentiel toujours fixé à -120mV suivi d'un court saut dépolarisant à -50mV permet d'inactiver les canaux potassiques transitoires. La série de sauts appliquée ensuite est identique à celle qui est décrite dans le premier protocole. La réponse obtenue à cette seconde série de stimulation ne fait apparaître que le courant de fuite et I_K . **C.** L'enregistrement provient de la soustraction des réponses A et B. Cette soustraction permet d'isoler l'enregistrement de l'activation du courant potassique transitoire du neurone de type I en supprimant le courant de fuite et I_K .

Les solutions utilisées dans cette expérience sont le milieu intrapipette *l* et la solution extracellulaire *f*.

neurone sBPA de type I

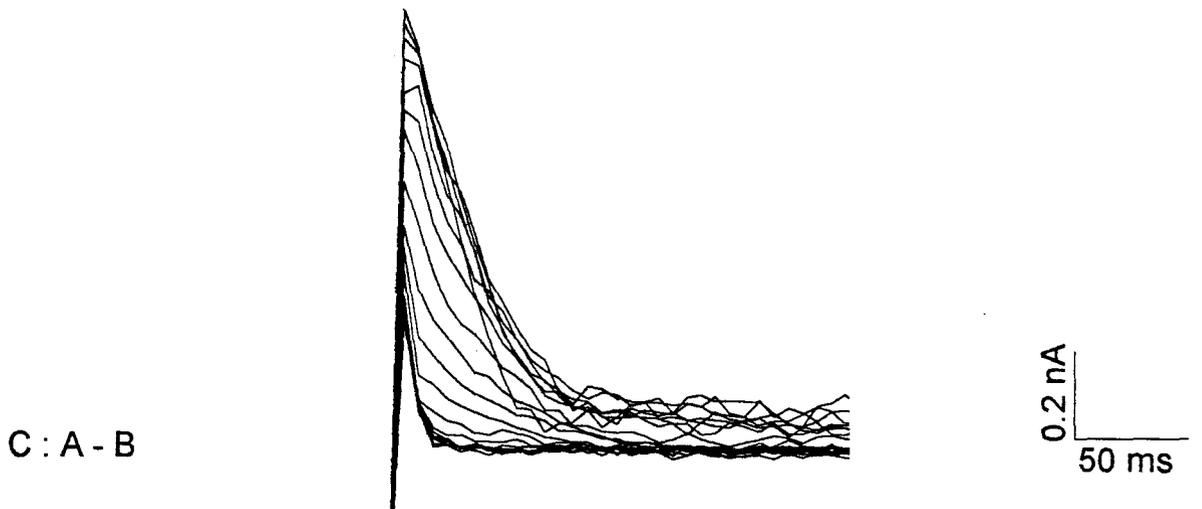
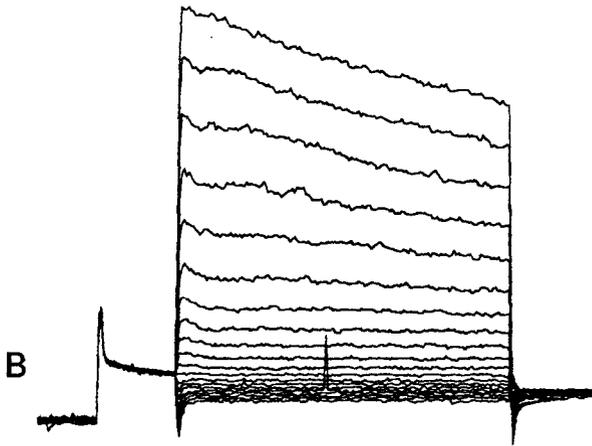
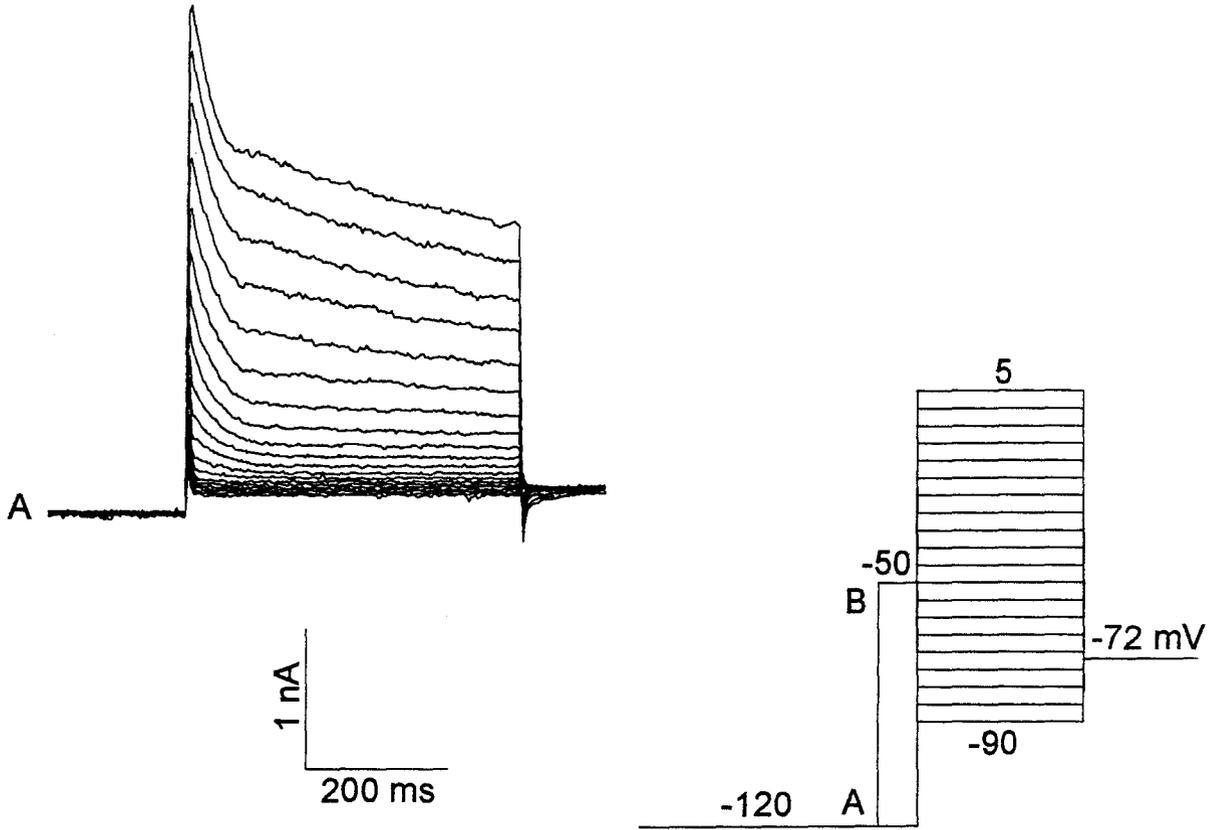
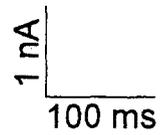
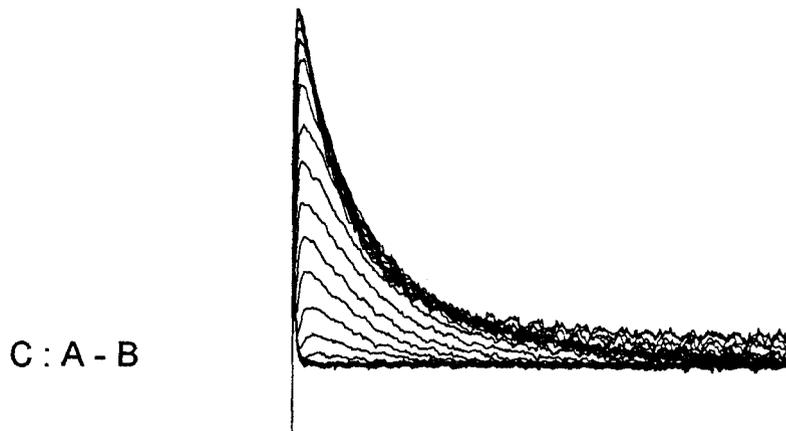
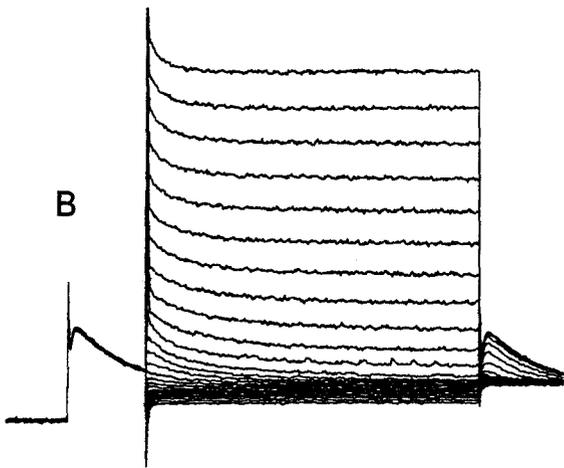
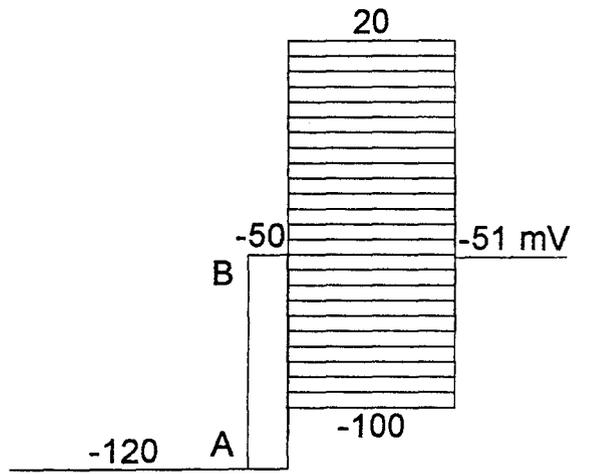
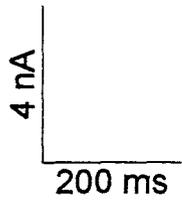
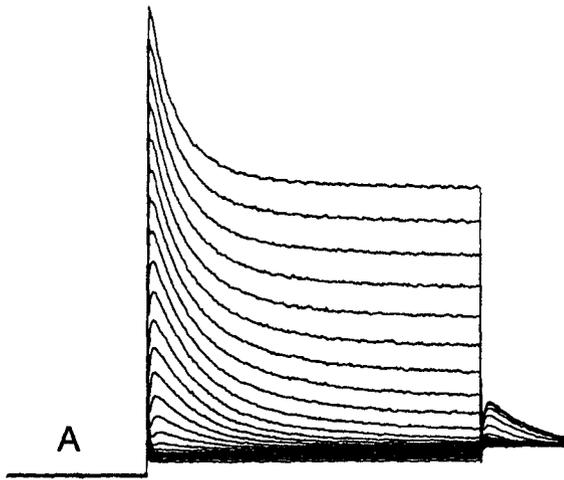


Figure 28. Activation du courant potassique transitoire dans un neurone de type II.

Le neurone est soumis à un double protocole de stimulation AB. **A.** Dans le premier protocole de stimulation, le pré-potentiel est fixé pendant 1s à -120mV pour permettre la dé-inactivation des canaux potassiques transitoires et il est suivi par l'application d'une série de sauts de potentiel dépolarisant entre -100 et 20mV. La réponse du neurone à la série de sauts provoque l'activation progressive du courant potassique transitoire associée au courant de fuite et au courant potassique de la rectification retardée I_K . **B.** Dans le second protocole de stimulation, le pré-potentiel toujours fixé à -120mV suivi d'un court saut dépolarisant à -50mV permet d'inactiver les canaux potassiques transitoires. La série de sauts appliquée ensuite est identique à celle qui est décrite dans le premier protocole. La réponse obtenue à cette seconde série de stimulation ne fait apparaître que le courant de fuite et I_K . **C.** L'enregistrement provient de la soustraction des réponses A et B. Cette soustraction permet d'isoler l'enregistrement de l'activation du courant potassique transitoire du neurone de type II en supprimant le courant de fuite et I_K . Les solutions utilisées dans cette expérience sont le milieu intrapipette I et la solution extracellulaire standard α .

neurone de type II



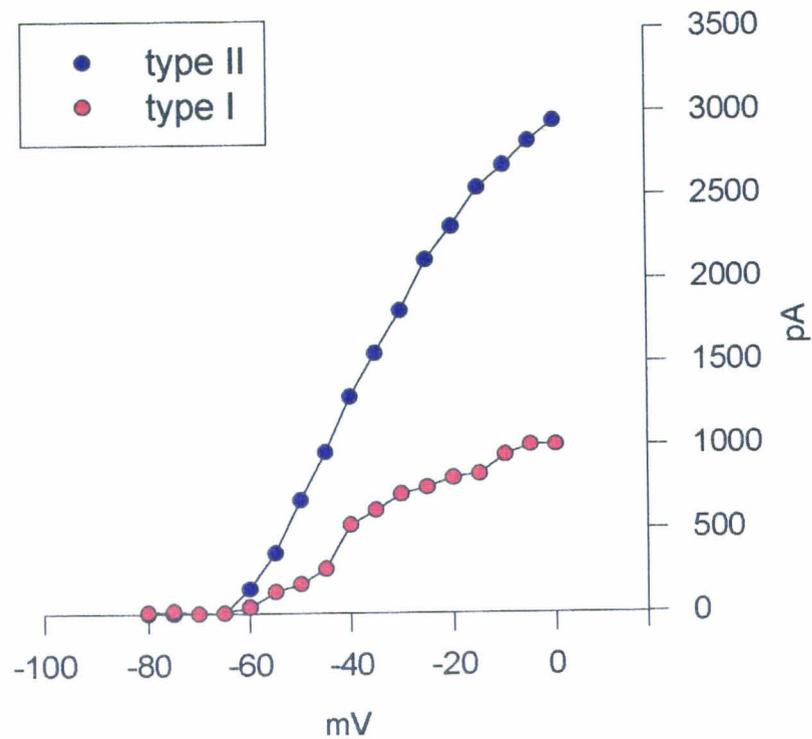


Figure 29. Courbes courant-potential des courants potassiques transitoires exprimés dans un neurone de type I et dans un neurone de type II.

Les mesures de l'intensité des courants potassiques transitoires ont été réalisées à partir des enregistrements illustrés dans la figure 27C pour le neurone de type I et dans la figure 28C pour le neurone de type II. Les courbes courant-potential indiquent que les seuils des courants potassiques transitoires exprimés dans les deux types de neurones sont tous deux situés à -65mV. L'amplitude du courant potassique transitoire est trois fois plus faible dans le neurone de type I que dans le neurone de type II.

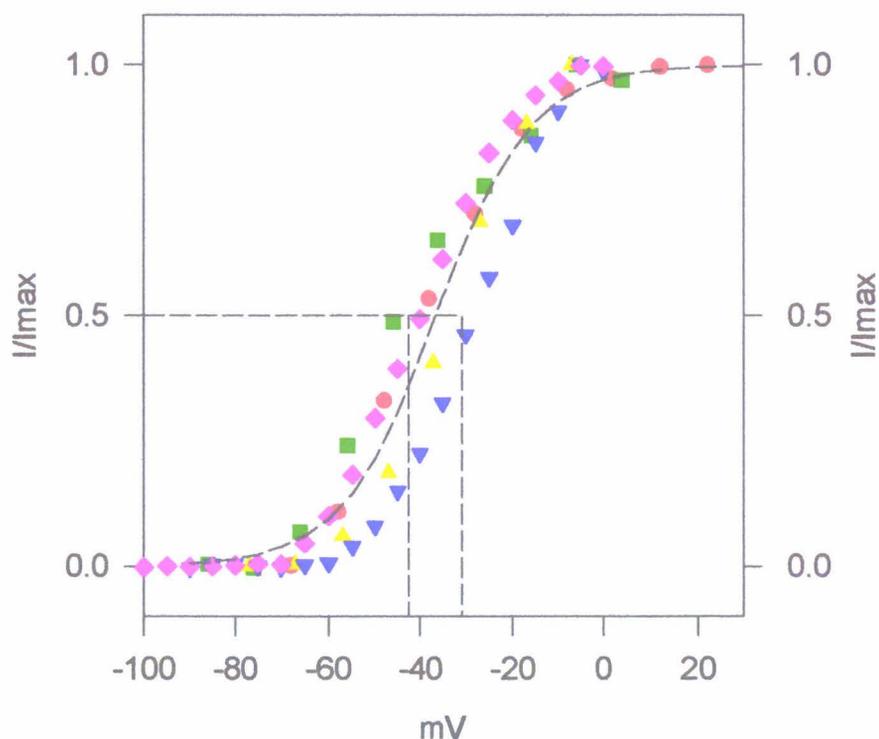


Figure 30. Courbe d'activation du courant potassique transitoire exprimé dans les neurones de type I et dans les neurones de type II.

Courbe d'activation moyenne du courant potassique transitoire exprimé dans 5 neurones des deux types I et II, et ajustée selon l'équation de Boltzmann. I/I_{max} représente l'intensité relative du courant potassique transitoire, I_{max} est mesuré à 0mV. Les paramètres de la courbe ajustée sont: $V_{1/2}$ à -36.5 ± 6.1 mV (moyenne \pm écart-type) et k à 10.45 ± 0.15 (moyenne \pm écart-type). Les symboles de couleur décrivent l'activation individuelle du courant potassique transitoire exprimé par chaque neurone.

c. Mise en évidence de la dépendance au potentiel du processus d'activation du courant potassique transitoire

Les neurones des deux types ne présentent pas de différence dans le processus d'activation dépendant du potentiel du courant potassique transitoire.

La figure 30 illustre la courbe d'activation moyenne de ce courant pour 5 neurones appartenant aux deux types. Cette courbe représente l'intensité relative du courant potassique transitoire exprimé en fonction des sauts de potentiel appliqués. L'ajustement non linéaire selon l'équation de Boltzmann indique les valeurs de $V_{1/2}$ à -36.5 ± 6.1 mV (moyenne \pm écart-type) et de la pente k à 10.45 ± 0.15 (moyenne \pm écart-type). Dans les deux types de neurones, le seuil d'activation moyen du courant potassique transitoire est situé vers -65 mV et le courant atteint une amplitude maximale vers 0 mV.

d. Evolution du temps de latence du pic de courant potassique transitoire en fonction du potentiel

Le temps de latence du pic (t_p) est mesuré sur les enregistrements du courant potassique transitoire obtenus par la soustraction des réponses aux deux protocoles A et B. t_p est mesuré dans les deux types de neurones à partir du courant capacitif jusqu'au point maximal (pic) du courant potassique transitoire.

Les valeurs moyennes mesurées de t_p en fonction des sauts de potentiel appliqués sur les deux types de neurones sont illustrées dans la figure 31A. Le t_p du courant potassique transitoire des neurones de type II ($n=5$) se distingue de celui des neurones de type I ($n=5$). Dans les neurones de type II, il varie de 29 à 9 ms, alors que dans les neurones de type I, il varie de 11 à 3 ms; ces variations sont observées pour des potentiels membranaires variant progressivement de -60 à 10 mV.

Ces résultats montrent que, quelque soit le type du neurone enregistré, le temps d'activation du courant potassique transitoire dépend du potentiel membranaire sur la gamme d'activation car il diminue lorsque la membrane est dépolarisée. D'autre part, ce courant s'active en moyenne plus rapidement dans les neurones de type I que dans les neurones de type II, avec un facteur multiplicatif de 3 environ.

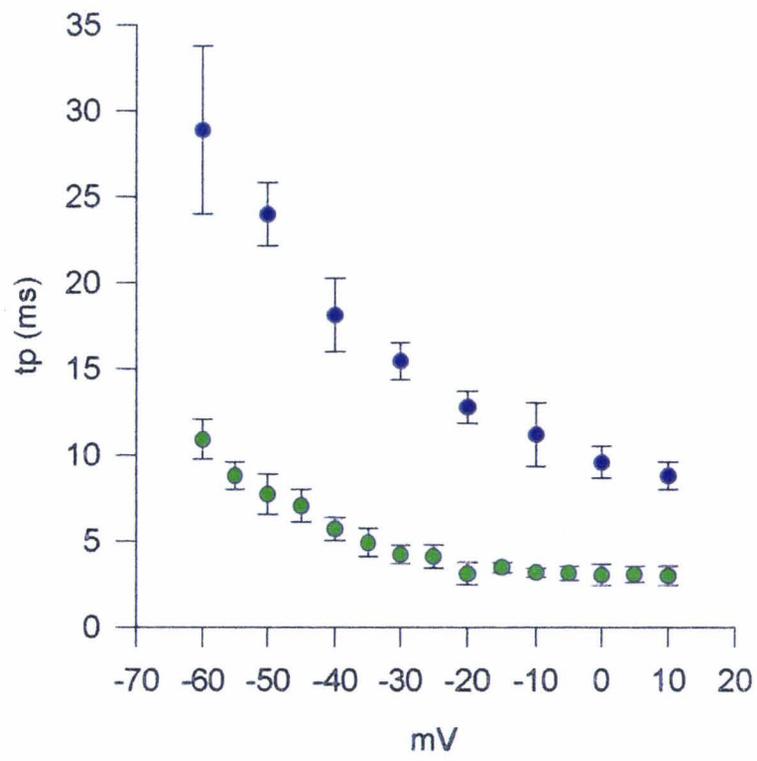
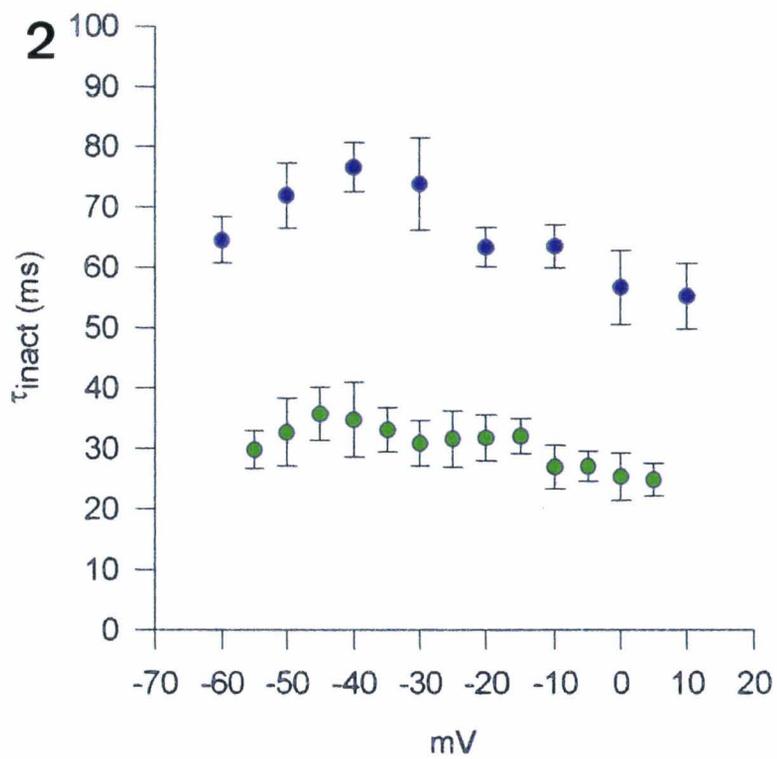
Figure 31. Evolutions du temps de latence du pic (t_p) et de la constante de temps de l'inactivation (τ_{inact}) du courant potassique transitoire en fonction du potentiel dans les neurones de types I et dans les neurones de type II.

A. Evolution du temps de latence du pic du courant potassique transitoire en fonction du potentiel dans les deux types de neurones. Le t_p du courant potassique transitoire activé est mesuré entre le début de la charge du courant capacitif et le pic du courant. Les valeurs moyennées des t_p des courants potassiques transitoires mesurées dans 5 neurones de type I (cercles verts) et dans 5 neurones de type II (cercles bleus) sont reportées dans deux courbes en fonction du potentiel membranaire. Entre -60 et 10mV, le temps de latence du pic du courant potassique transitoire diminue progressivement de 29 à 9 ms pour les neurones de type II et de 11 à 3 ms pour les neurones de type I.

B. Evolution de la constante de temps de l'inactivation du courant potassique transitoire en fonction du potentiel dans les deux types de neurones. (B1) La mesure de la constante de temps de l'inactivation est obtenue par l'ajustement monoexponentiel de la phase d'inactivation du courant potassique transitoire. Les enregistrements des courants potassiques transitoires sont ceux de la figure 27C pour le neurone de type I et ceux de la figure 28C pour le neurone de type II. (B2) Les valeurs moyennées de τ_{inact} des courants potassiques transitoires mesurées dans 5 neurones de type I (cercles verts) et dans 5 neurones de type II (cercles bleus) sont reportées dans deux courbes en fonction du potentiel membranaire. Entre -60 et 10mV, les constantes de temps de l'inactivation du courant potassique transitoire varient entre 77 et 55ms pour les neurones de type II et entre 36 et 25ms pour les neurones de type I. Il n'existe pas de nette dépendance au potentiel pour ce paramètre dans les deux types de neurones. Il faut noter un rapport de 2 entre les valeurs de τ_{inact} du courant potassique transitoire des deux types de neurones.

Chaque cercle en A et en B2 représente la moyenne, les barres d'erreur représentent l'écart type des mesures réalisées à partir des 5 cellules différentes.

Barres d'échelle pour B1: 1nA et 100ms.

A**B**

2. Processus d'inactivation du courant potassique transitoire

a. Protocole expérimental d'inactivation du courant potassique transitoire

Un double protocole différent du protocole AB est utilisé pour réaliser l'étude de l'inactivation du courant potassique transitoire dans les deux types de neurones tel qu'il est illustré dans les figures 32A et 32B.

Une série de pré-potentiels effectuée entre -120 et -30mV et appliquée pendant 1s, permet de faire varier la dé-inactivation des canaux potassiques transitoires en les mettant progressivement en état d'indisponibilité. A la suite de cette série, le potentiel membranaire est amené à un potentiel très dépolarisé situé vers 0mV, ce qui permet d'activer totalement le courant potassique transitoire selon les données précédentes. Cette étape constitue le premier protocole. Un deuxième protocole est ensuite appliqué: il consiste à inactiver le courant potassique transitoire par l'intermédiaire d'un court saut dépolarisant fixé à -50mV et précédant la dépolarisation à 0mV. Le courant potassique transitoire isolé de tout autre courant (courant I_K et courant de fuite) est alors obtenu par la soustraction des réponses aux deux protocoles (figures 32A et 32B).

Le courant potassique transitoire a une amplitude maximale lorsque les pré-potentiels sont hyperpolarisés en dessous de -100mV, et son amplitude diminue progressivement lorsque les pré-potentiels deviennent moins négatifs.

b. Mise en évidence de la dépendance au potentiel du processus d'inactivation du courant potassique transitoire

Le processus d'inactivation dépendant du potentiel du courant potassique transitoire est semblable dans les deux types de neurones.

La figure 32C illustre la courbe d'inactivation moyenne de ce courant pour 4 neurones appartenant aux deux types. La courbe tracée provient de l'ajustement non linéaire des points expérimentaux moyens, cette régression est réalisée selon l'équation de Boltzmann. La valeur moyenne obtenue de $V_{1/2}$ pour le courant potassique transitoire est de -81.2 ± 6.8 mV (moyenne \pm écart-type) et la pente moyenne k est de -8.48 ± 1.21 (moyenne \pm écart-type). L'inactivation complète du courant est obtenue à la valeur approximative de -50mV. L'absence d'inactivation

Figure 32. Inactivation des courants potassiques transitoires dans les neurones de types I et II.

A. Inactivation du courant potassique transitoire dans un neurone de type II, obtenue en réponse à l'application d'un simple protocole de stimulation constitué d'une série de pré-potentiels incrémentés par pas de 5mV à partir de -110mV jusqu'à -35mV et suivie d'un saut dépolarisant à -10mV.

B. Inactivation du courant potassique transitoire dans un neurone de type I, obtenue en réponse à l'application d'un simple protocole de stimulation constitué d'une série de pré-potentiels incrémentés par pas de 5mV à partir de -120mV jusqu'à -50mV et suivie d'un saut dépolarisant à -10mV.

C. Courbe d'inactivation moyenne du courant potassique transitoire exprimé dans 4 neurones des deux types. I/I_{max} représente l'intensité relative du courant potassique transitoire et I_{max} représente le maximum d'intensité du courant mesuré à -10mV. Les valeurs moyennées sont ajustées selon l'équation de Boltzmann. Les paramètres de la courbe ajustée sont: $V_{1/2}$ de -81.2 ± 6.8 mV (moyenne \pm écart-type) et k de -8.48 ± 1.21 (moyenne \pm écart-type).

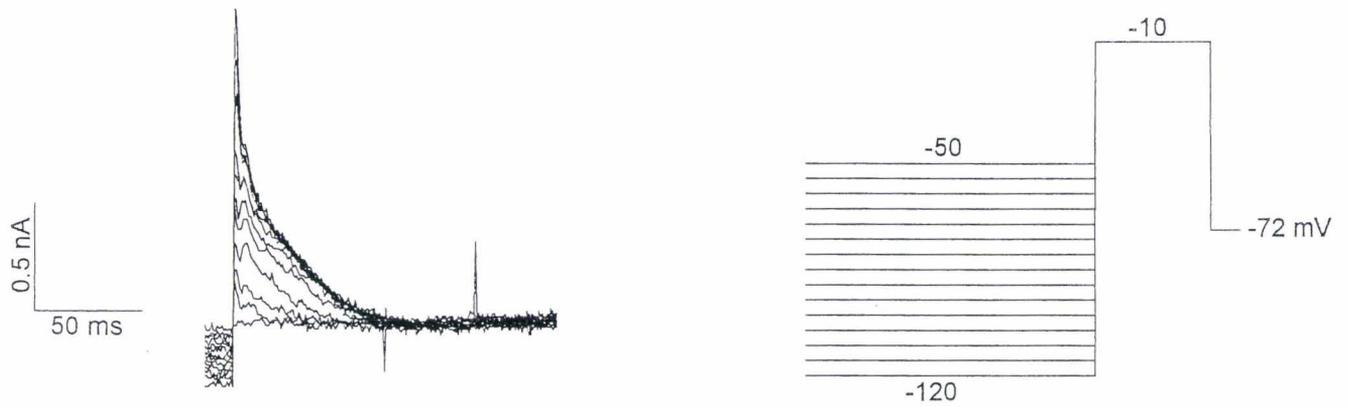
Les symboles de couleur décrivent l'activation individuelle du courant calcique bas-seuil exprimé par chaque neurone.

Pour les enregistrements du courant potassique transitoire des neurones de type I, la solution intrapipette I et la solution extracellulaire f ou α (sans Ca^{2+}) ont été utilisées. Pour les enregistrements du courant potassique transitoire des neurones de type II, la solution intrapipette I et la solution extracellulaire α ont été utilisées.

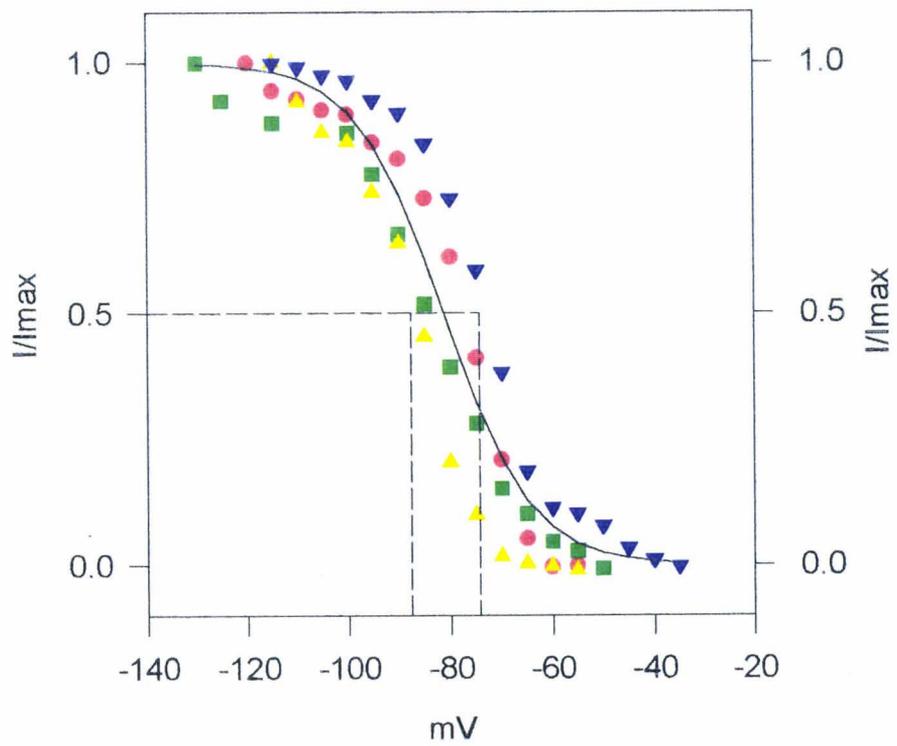
A neurone de type II



B neurone sBPA de type I



C



du courant potassique transitoire apparaît lorsque le potentiel membranaire est plus négatif que -120mV environ.

c. Analyse de la constante de temps de l'inactivation (τ_{inact}) du courant potassique transitoire en fonction du potentiel

Les enregistrements du courant potassique transitoire, qui ont été choisis pour l'analyse de la constante de temps de l'inactivation (τ_{inact}), sont ceux qui ont servis à réaliser l'étude du processus d'activation.

L'inactivation des canaux potassiques transitoires provoque une fermeture spontanée des canaux potassiques au cours du temps quand le potentiel membranaire est maintenu dépolarisé. Cette phase descendante suit un décours monoexponentiel dont la constante de temps est mesurée après un ajustement non linéaire de l'inactivation du courant selon l'équation :

$$I = a \exp^{(bt)} + c$$

Cette régression a été décrite précédemment et utilisée pour l'analyse de l'inactivation du courant calcique bas-seuil.

La figure 31B1 illustre des enregistrements du courant potassique transitoire évoqué dans les neurones de type I et de type II après soustraction des réponses aux deux protocoles utilisés pour mettre en évidence le processus d'activation du courant. Les inactivations de chacun des courants potassiques transitoires exprimés dans les deux types de neurones sont ajustées avec la régression non linéaire.

Les résultats moyennés de l'ajustement de type monoexponentiel en fonction du potentiel membranaire sont illustrés dans la figure 31B2 où les barres verticales représentent l'écart-type des valeurs moyennes de τ_{inact} obtenues pour 5 neurones de chaque type.

Ils confirment que le courant potassique transitoire des neurones de type II s'inactive plus lentement que celui des neurones de type I. Les valeurs liminaires maximales et minimales de τ_{inact} pour le courant potassique transitoire en fonction du potentiel sont respectivement de 77 et de 55ms pour les neurones de type II (n=4) et de 36 et 25ms pour les neurones de type I (n=5); ces résultats mettent en évidence un rapport multiplicatif de deux entre les processus d'inactivation dépendant du temps des neurones des types I et II.

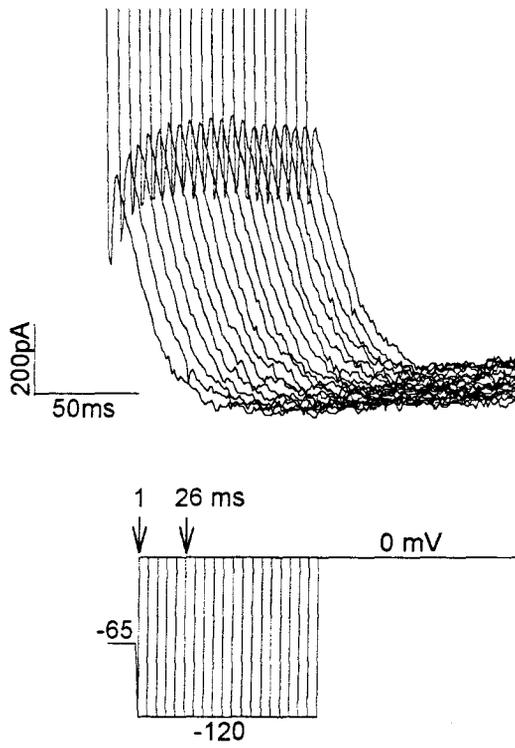
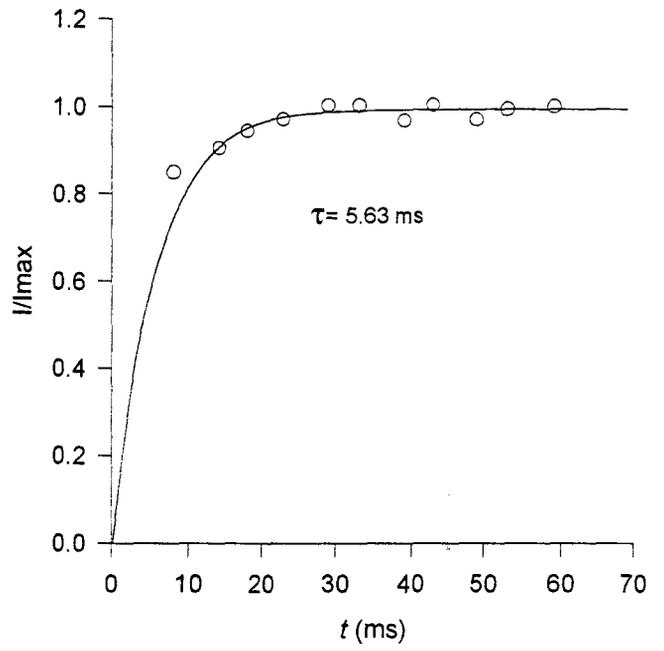
La fonction de τ_{inact} montre une faible sensibilité au potentiel membranaire et suit un décours relativement similaire dans les deux types de neurones. La valeur de τ_{inact} augmente

Figure 33. Cinétique de la restauration du courant potassique transitoire après inactivation des canaux dans un neurone de type I.

A. Le potentiel membranaire du neurone est maintenu constamment à -65mV . A partir de ce potentiel dépolarisé, des sauts hyperpolarisants à -120mV et de durées croissantes incrémentées par pas de 5ms sont appliqués et précèdent le retour vers un potentiel dépolarisé à 0mV . L'intensité du courant potassique transitoire augmente progressivement avec la durée du saut hyperpolarisant.

B. Les mesures de l'intensité du courant potassique transitoire pour ce neurone sont reportées dans une courbe en fonction de la durée du saut hyperpolarisant à -120mV . Les points suivent une courbe issue d'une fonction monoexponentielle dont la constante de temps est de 5.63ms .

Pour les enregistrements du courant potassique transitoire de ce neurone, la solution intrapipette I et la solution extracellulaire f ont été utilisées.

A**B**

légèrement de -60mV jusqu'à -40mV environ, puis elle diminue sensiblement lorsque le potentiel membranaire devient plus positif.

d. Cinétique de restauration du courant potassique transitoire après inactivation des canaux

La restauration progressive du courant potassique transitoire est étudiée en fonction du temps sur 5 neurones appartenant aux deux types qui ont donné des résultats identiques.

La figure 33A illustre les réponses d'un neurone de type I dont le potentiel est maintenu constamment à -65mV (valeur du PR) afin d'inactiver en permanence les canaux potassiques transitoires. A partir de ce potentiel, des sauts hyperpolarisants à -120mV et de durées croissantes incrémentées par pas de 5ms sont appliqués et précèdent un créneau final dépolarisant à 0mV, valeur du potentiel membranaire pour laquelle le maximum d'activation du courant potassique transitoire est observé selon les résultats décrits plus haut.

L'intensité du courant potassique transitoire activé lors de chaque réponse du neurone illustré dans la figure 33A est mesurée et reportée dans la courbe de la figure 33B. Cette courbe représente l'intensité relative du courant potassique restauré en fonction de la durée de l'hyperpolarisation. Elle décrit un parcours de type monoexponentiel avec une constante de temps comprise approximativement entre 5 et 10 ms dans les deux types de neurones.

II. Propriétés pharmacologiques du courant potassique transitoire

Toutes les expériences pharmacologiques ont été réalisées avec la solution intrapipette 1. Les différentes solutions extracellulaires utilisées seront signalées pour chaque expérience.

1. Effet de l'absence du Ca^{2+} dans la solution extracellulaire sur le courant potassique transitoire

Dans ces expériences, les enregistrements de contrôle du courant potassique transitoire sont d'abord effectués avec la solution extracellulaire α ; ils sont ensuite réalisés en présence de la solution α dans laquelle le MgCl_2 est substitué au CaCl_2 .

Les neurones sont soumis au double protocole de stimulation AB qui permet d'isoler le

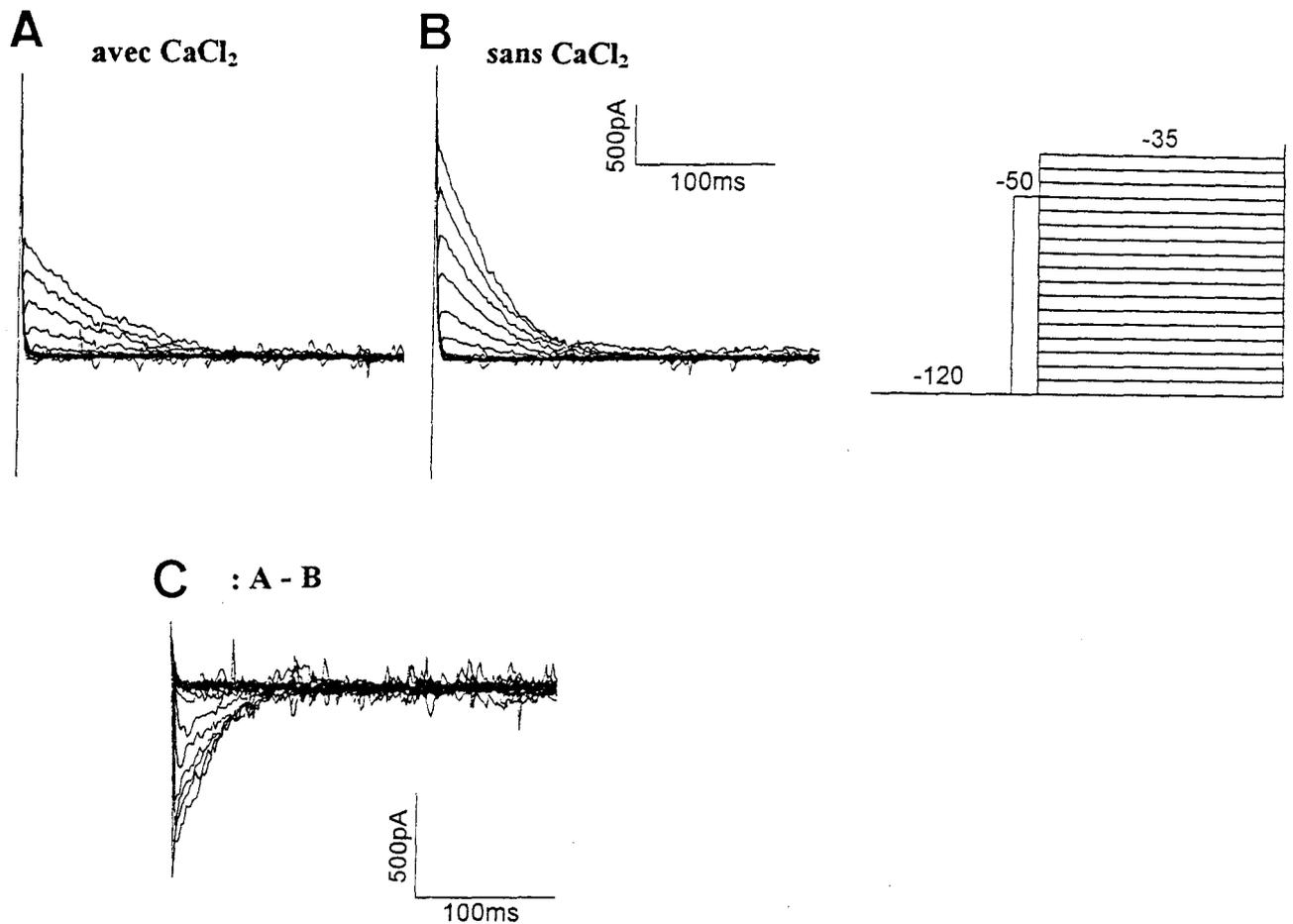


Figure 34. Effet de l'absence du Ca^{2+} sur le courant potassique transitoire d'un neurone sBPA de type I.

Un double protocole de stimulation AB, identique à celui décrit dans les figures 27 et 28, est appliqué à un neurone sBPA de type I. La série de sauts dépolarisants est comprise entre -120 et -35mV.

A. Les enregistrements issus de ce double protocole mettent en évidence l'activation d'un courant net transitoire sortant lorsque le neurone est placé dans la solution extracellulaire standard *a*. **B.** Lorsque la solution extracellulaire est remplacée par la solution *a* sans Ca^{2+} , on note une augmentation du courant net transitoire sortant. **C.** Ces enregistrements proviennent de la soustraction des réponses A et B. Les tracés issus de la soustraction démasquent un courant calcique bas-seuil et indiquent que le courant potassique transitoire n'est pas affecté par l'absence du Ca^{2+} .

La solution intrapipette utilisée pour ces enregistrements est la solution *I*.

courant potassique transitoire du courant I_K et du courant de fuite.

Le courant potassique transitoire exprimé par les neurones de type II (n=2) ne subit aucune modification en absence de Ca^{2+} extracellulaire (non illustré).

Lorsque les neurones de type I sont soumis au même traitement, l'intensité du courant sortant transitoire augmente alors que le courant entrant bas-seuil diminue dans les neurones aBPA (n=3) (figures 15A et 15B) et dans les neurones sBPA (n=2) (figures 34A et 34B). La soustraction des enregistrements réalisés en milieu normal α et en absence de Ca^{2+} démontrent que seul le courant entrant bas-seuil est affecté par l'élimination du Ca^{2+} du milieu extracellulaire (figures 15C et 34C).

Ces résultats prouvent que l'activation du courant potassique transitoire n'est pas dépendante du Ca^{2+} extracellulaire.

2. Effet des bloqueurs potassiques

a. Effet du TEA

Les neurones sont soumis à un simple protocole de stimulation correspondant à la première partie du double protocole de stimulation et qui a été précédemment nommé protocole A.

Les résultats montrent que le courant potassique transitoire est totalement insensible au TEA (10mM dans la solution extracellulaire α) pour les deux types de neurones (type I, n=3; type II, n=1).

La figure 35A illustre les courants globaux activés dans un neurone sBPA de type I suite à des sauts croissants de potentiel dépolarisant à partir d'un potentiel de maintien hyperpolarisé vers -130mV. Les courants globaux dont I_K , le courant potassique transitoire, le courant calcique bas-seuil et le courant de fuite sont activés. Lorsque le TEA est additionné au milieu extracellulaire α , il provoque la suppression de certains courants potassiques, dont I_K , sans modifier le courant potassique transitoire (figures 35B et 35C) (n=2).

Le courant potassique transitoire exprimé dans les neurones de type II manifeste la même insensibilité au TEA (non illustré).

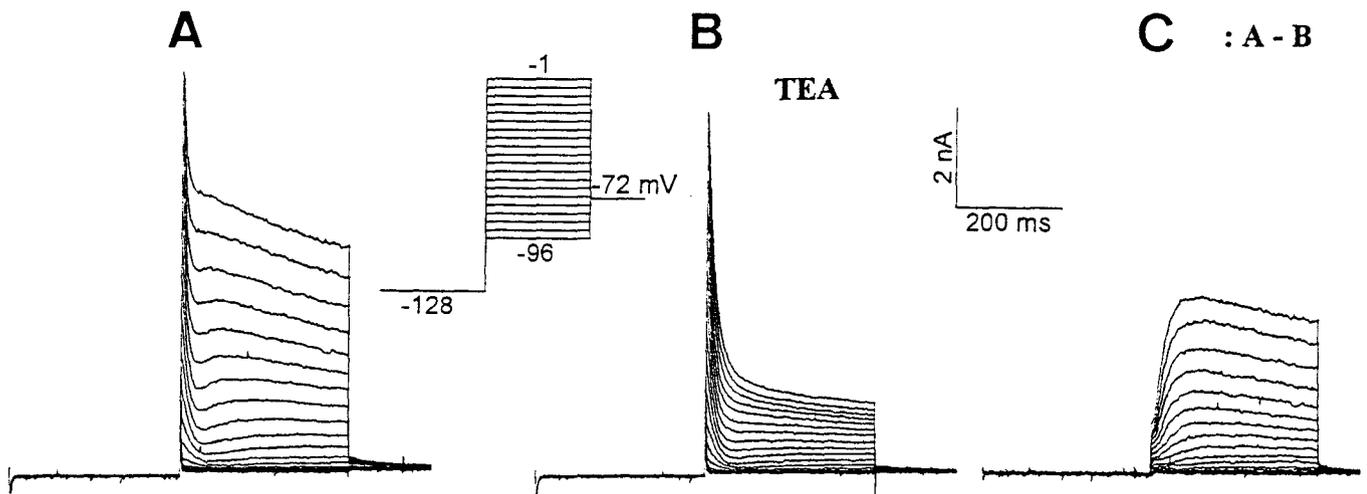


Figure 35. Effet du TEA sur les courants potassiques exprimés dans un neurone de type sBPA de type I.

Un simple protocole de stimulation est appliqué à un neurone sBPA de type I. A partir d'un pré-potentiel maintenu à -128mV pendant 1s , une série de sauts dépolarisants compris entre -96 et -1mV est appliquée.

A. En milieu extracellulaire α , les sauts dépolarisants activent à la fois un courant potassique transitoire, le courant I_K , le courant calcique bas-seuil et le courant de fuite. **B.** Lorsque le TEA (10mM) est ajouté à la solution extracellulaire α , on note une forte diminution du courant sortant global. **C.** Cet enregistrement provient de la soustraction des enregistrements A et B. Le résultat de cette soustraction indique que certains courants potassiques, dont I_K , ont été supprimés par le TEA et que le courant potassique transitoire y est insensible.

La solution intrapipette utilisée pour ces enregistrements est la solution 1.

b. Effet de la 4-AP

Dans une première série d'expériences, les enregistrements de contrôle du courant potassique transitoire sont d'abord effectués avec la solution extracellulaire α ; ils sont ensuite réalisés en présence de la solution c comprenant 2mM de 4-AP.

Les neurones sont soumis au protocole de stimulation A.

L'application de 2mM de 4-AP induit une diminution sensible du courant potassique transitoire dans les neurones de type II ($n=2$) (figure 36) et dans les neurones de type I (non illustré) ($n=3$). A cette concentration, la 4-AP ne supprime jamais complètement le courant potassique transitoire.

Dans une seconde série d'expériences, les enregistrements de contrôle du courant potassique transitoire ont d'abord été effectués avec la solution extracellulaire α ; ils ont ensuite été réalisés en présence de la solution c comprenant 5mM de 4-AP. Cette solution comprenait également 10mM de TEA mais étant donné l'absence d'effet de la substance sur le courant potassique transitoire, seul l'effet de la 4-AP a été observé sur ce courant.

Les neurones sont soumis au protocole de stimulation A.

Lorsque la 4-AP est appliquée à la concentration de 5mM, le courant potassique transitoire est totalement supprimé dans les neurones de type II (figure 37) ($n=2$) et dans les neurones de type I (non illustré) ($n=3$).

c. Effet de l' α -dendrotoxine

Les neurones sont soumis au double protocole de stimulation AB qui permet d'isoler le courant potassique transitoire du courant I_K et du courant de fuite.

Cette étude n'a été réalisée que sur les neurones de type I ($n=3$).

L'addition de l' α -dendrotoxine (100nM dans la solution extracellulaire α) ne provoque aucune modification du courant potassique transitoire dans ces neurones (figure 38).

d. Effet du catéchol

Les neurones sont soumis au protocole de stimulation A.

Cette étude n'a été réalisée que sur les neurones de type I ($n=2$).

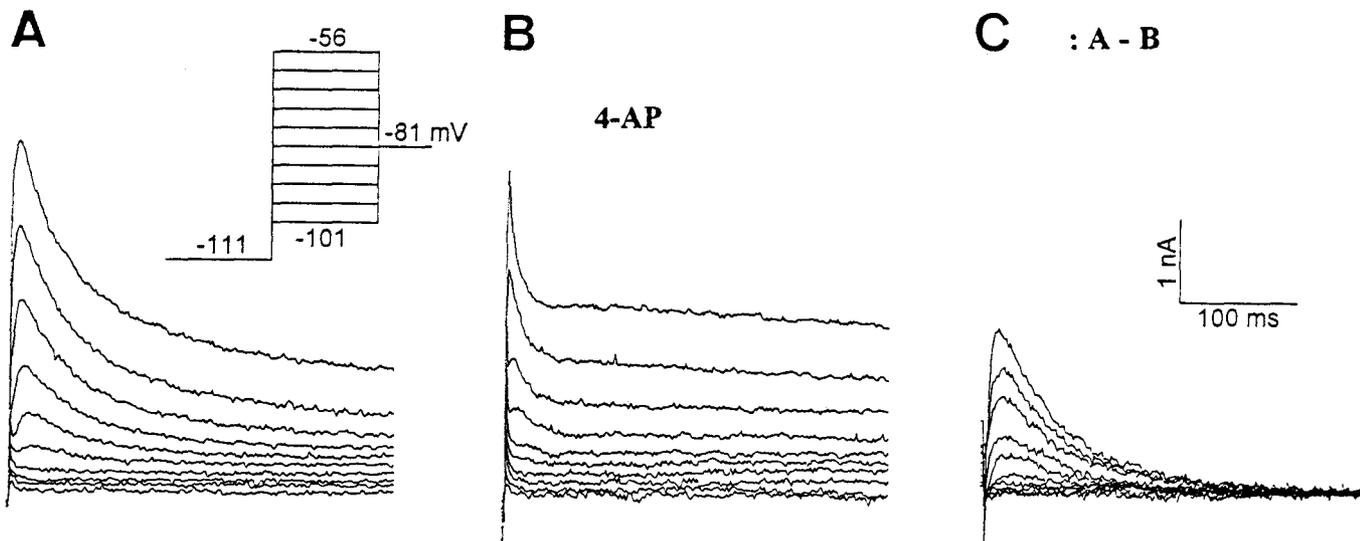


Figure 36. Effet de la 4-AP sur le courant potassique transitoire exprimé dans un neurone de type II.

Un simple protocole de stimulation est appliqué à un neurone de type II. A partir d'un pré-potentiel maintenu à -111mV pendant 1s , une série de sauts dépolarisants compris entre -101 et -56mV est appliquée.

A. En milieu extracellulaire *a*, les sauts dépolarisants activent à la fois un courant potassique transitoire, le courant I_K et le courant de fuite. **B.** Lorsque la 4-AP (2mM) est appliquée lors de la perfusion de la solution extracellulaire *c*, on note une diminution du courant potassique transitoire. **C.** Cet enregistrement provient de la soustraction des enregistrements A et B. Le résultat de cette soustraction indique que le courant potassique transitoire a été partiellement supprimé par l'application de 4-AP.

La solution intrapipette utilisée pour ces enregistrements est la solution 1.

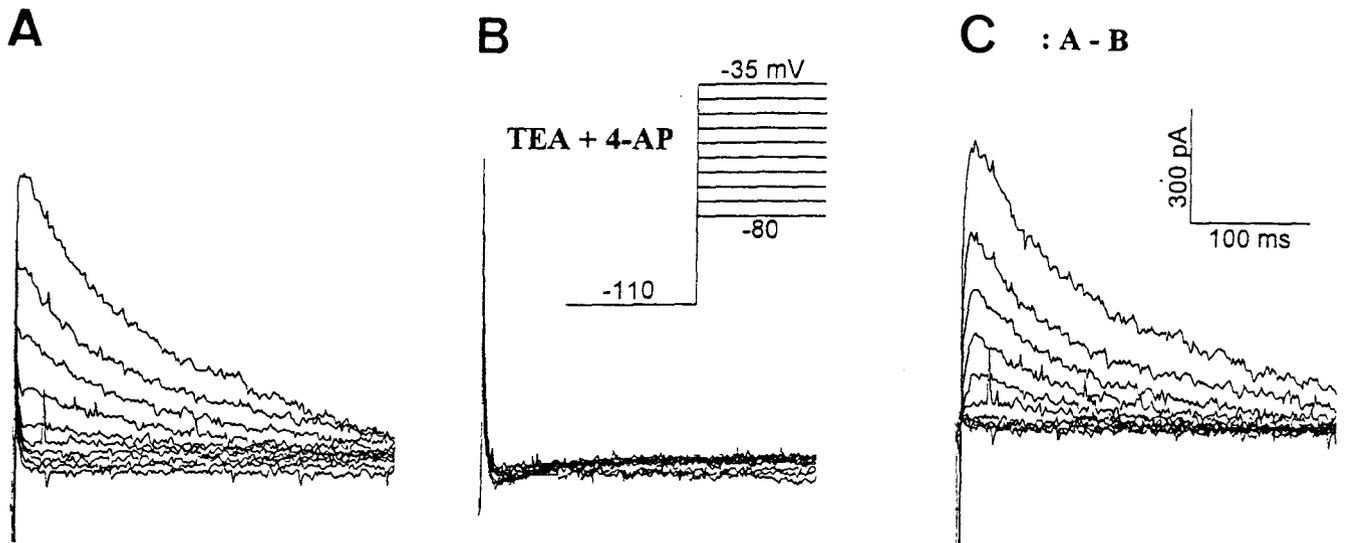


Figure 37. Effet du TEA et de la 4-AP sur les courants potassiques exprimés dans un neurone de type II.

Un simple protocole de stimulation est appliqué à un neurone de type II. A partir d'un pré-potentiel maintenu à -110mV pendant 1s, une série de sauts dépolarisants compris entre -80 et -35mV est appliquée.

A. En milieu extracellulaire α , les sauts dépolarisants activent à la fois un courant potassique transitoire, le courant I_K et le courant de fuite. **B.** Lorsque le TEA (10mM) et la 4-AP (5mM) sont appliqués lors de la perfusion de la solution extracellulaire c , on note une suppression de tous les courants sortants. **C.** Cet enregistrement provient de la soustraction des enregistrements A et B. Le résultat de cette soustraction indique que le courant I_K et le courant potassique transitoire ont été entièrement supprimés. Etant donné l'insensibilité du courant potassique transitoire au TEA illustrée dans la figure 35, c'est donc la 4-AP à la concentration de 5mM qui induit l'inhibition complète de ce courant.

La solution intrapipette utilisée pour ces enregistrements est la solution 1.

Figure 38. Effet de l' α -dendrotoxine sur le courant potassique transitoire exprimé dans un neurone sBPA de type I.

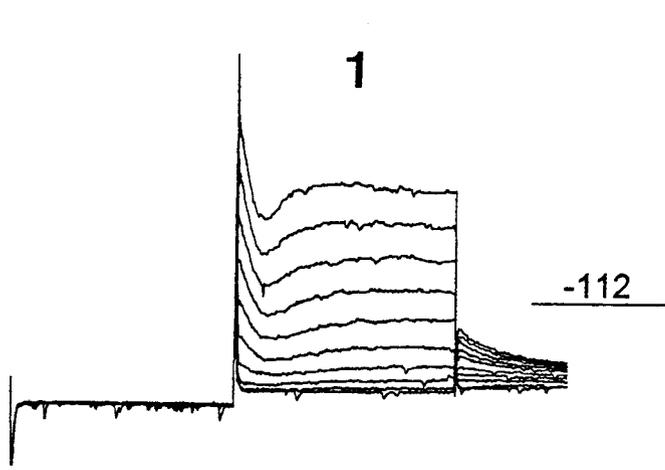
Le neurone est soumis à un double protocole de stimulation AB. **A.** Réponse du neurone au double protocole de stimulation réalisé avec le milieu extracellulaire normal α . (A1) Dans le premier protocole de stimulation, le pré-potentiel est fixé pendant 1s à -112mV et il est suivi par l'application d'une série de sauts de potentiel dépolarisant entre -65 et -20mV. La réponse du neurone à la série de sauts provoque l'activation progressive du courant potassique transitoire associée au courant calcique bas-seuil, au courant I_K et au courant de fuite. (A2) Dans le second protocole de stimulation, le pré-potentiel toujours fixé à -120mV suivi d'un court saut dépolarisant à -40mV permet d'inactiver les canaux potassiques transitoires et le courant calcique bas-seuil. La série de sauts appliquée ensuite est identique à celle qui est décrite dans le premier protocole. La réponse obtenue à cette seconde série de stimulation ne fait apparaître que le courant de fuite et I_K . (A3) L'enregistrement provient de la soustraction des réponses A1 et A2. Cette soustraction permet d'isoler l'enregistrement de l'activation du courant potassique transitoire et du courant calcique bas-seuil du neurone sBPA de type I en supprimant le courant de fuite et I_K .

B. (B1-B3) Réponse du neurone au double protocole de stimulation, réalisé cette fois avec le milieu extracellulaire α auquel est ajouté l' α -dendrotoxine (100nM).

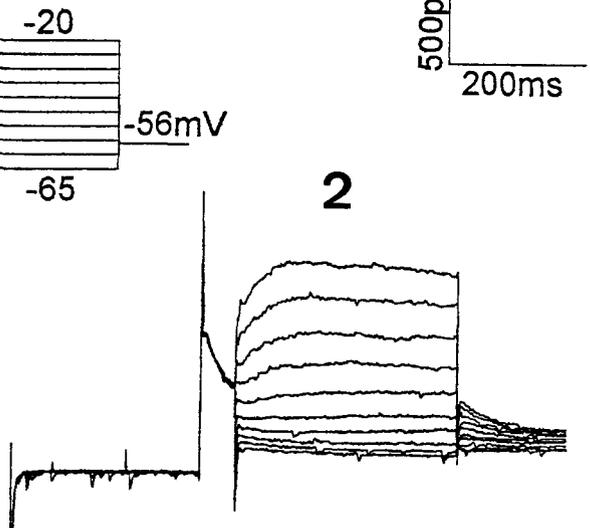
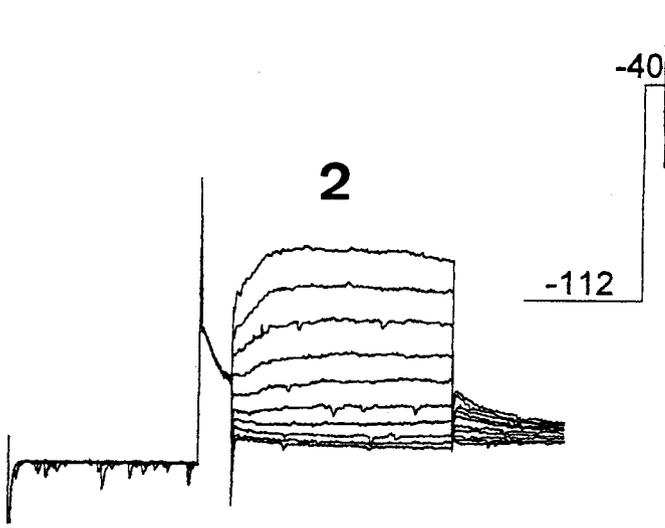
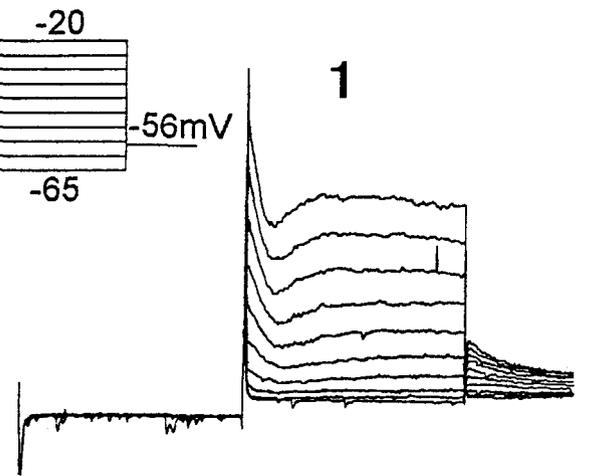
C. Ces enregistrements proviennent de la soustraction des réponses A3 et B3. Ils indiquent que l' α -dendrotoxine n'a produit aucun effet sur le courant potassique transitoire exprimé par ce neurone.

La solution intrapipette utilisée dans cette expérience est la solution 1.

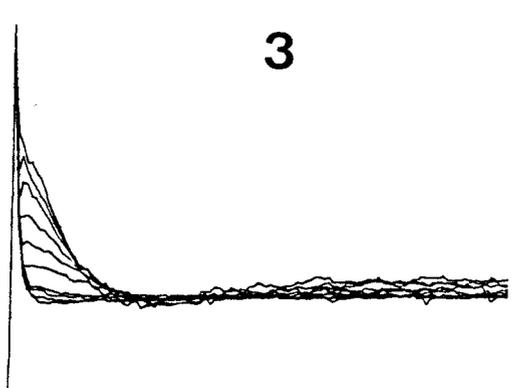
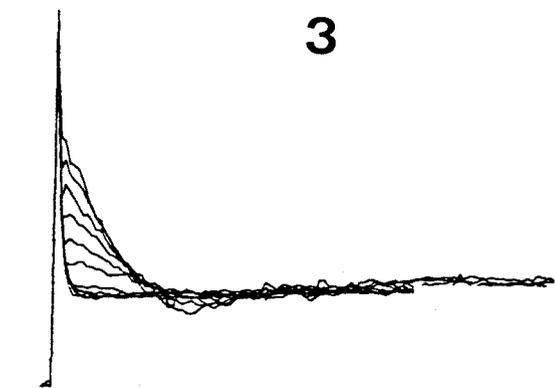
A milieu normal



B α -dendrotoxine



500pA
200ms



C

L'ajout de catéchol (5mM dans la solution extracellulaire *a*) supprime principalement le courant potassique transitoire et provoque une diminution sensible du courant I_K (non illustré).

Il faut noter que la présence de 5mM de catéchol dans le milieu de perfusion provoque rapidement la perte des neurones en configuration "cellule entière", ce qui est vraisemblablement dû à la forte dépolarisation membranaire consécutive à l'application de la drogue.

3. Effet de la substitution du Ba^{2+} au Ca^{2+} extracellulaire

Les enregistrements de contrôle du courant potassique transitoire sont d'abord effectués avec la solution extracellulaire *a*; ils sont ensuite réalisés en présence de la solution *d* comprenant du Ba^{2+} et dépourvue de Ca^{2+} .

Les neurones sont soumis au protocole de stimulation A.

Cette étude n'a été réalisée que sur les neurones de type I (n=5) et montre que le courant potassique transitoire est supprimé en présence de Ba^{2+} .

La figure 39A illustre le courant global exprimé par un neurone aBPA de type I en présence de la solution *a* qui permet de mettre en évidence l'activation du courant calcique bas-seuil et du courant potassique transitoire.

L'application du Ba^{2+} provoque une suppression du courant net transitoire sortant (figure 39B). La soustraction des enregistrements illustrés dans la figure 39A et de ceux de la figure 39B met en évidence le courant net supprimé en présence de Ba^{2+} . Le résultat de cette soustraction illustré dans la figure 39C montre que le Ba^{2+} provoque la perte du courant potassique transitoire et qu'il induit aussi une diminution du courant calcique bas-seuil. Il faut rappeler que la diminution du courant calcique bas-seuil en présence de Ba^{2+} a été démontrée précédemment.

4. Effet du Zn^{2+}

Les enregistrements de contrôle du courant potassique transitoire sont d'abord effectués avec la solution extracellulaire *f*; ils sont ensuite réalisés en présence de la solution *f* additionnée de $ZnCl_2$. La solution *f* comprend du Ni^{2+} pour supprimer le courant calcique bas-seuil et du Cs^+ pour supprimer les courants potassiques des rectifications anormales.

Les neurones sont soumis au double protocole de stimulation AB qui permet, lorsqu'il est en association avec les substances pharmacologiques contenues dans le milieu *f*, d'isoler complètement le courant potassique transitoire des neurones de type I.

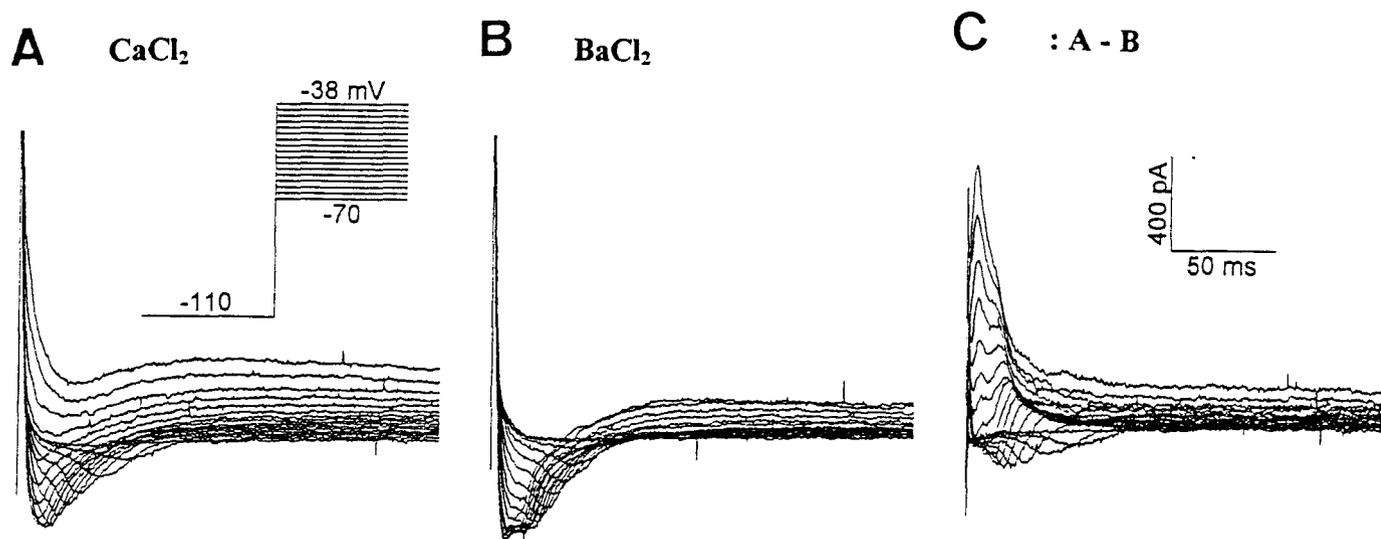


Figure 39. Effet du baryum sur le courant potassique transitoire exprimé dans un neurone aBPA de type I.

Un simple protocole de stimulation est appliqué à un neurone aBPA de type I. A partir d'un pré-potentiel maintenu à -110mV pendant 1s, une série de sauts dépolarisants compris entre -70 et -38mV est appliquée.

A. En milieu extracellulaire *a*, les sauts dépolarisants activent notamment un courant potassique transitoire et un courant calcique bas-seuil. **B.** Lorsque le Ba²⁺ est substitué au Ca²⁺ (solution *d*), on observe une suppression du courant potassique transitoire. **C.** Cet enregistrement provient de la soustraction des enregistrements A et B. Le résultat de cette soustraction indique que le courant potassique transitoire a été entièrement bloqué en présence du Ba²⁺. On note également une suppression partielle du courant calcique bas-seuil provoquée par le remplacement du Ca²⁺ par le Ba²⁺.

La solution intrapipette utilisée pour ces enregistrements est la solution *I*.

Cette étude n'a été réalisée que sur les neurones de type I (n=3).

L'addition de Zn^{2+} (75 à 100 μ M) induit une diminution sensible du courant potassique transitoire exprimé dans ces neurones (figure 40).

III. Interaction entre le courant calcique et le courant potassique transitoire

Afin d'examiner l'interaction entre les deux courants calcique bas-seuil et potassique transitoire qui sont présents dans les mêmes neurones de type I, le double protocole de stimulation employé pour l'étude du processus d'activation du courant calcique bas-seuil, a été appliqué. Ce double protocole est d'abord effectué en milieu extracellulaire standard α puis dans le même milieu après substitution du $MgCl_2$ au $CaCl_2$. Le milieu intrapipette utilisé est la solution 1.

Les figures 41Aa1 et 41Aa2 illustrent les réponses d'un neurone aBPA de type I au double protocole de stimulation. La soustraction des réponses obtenues met en évidence de manière globale les activations du courant calcique bas-seuil et du courant potassique transitoire (figure 41Aa3).

Le double protocole est ensuite appliqué sur le même neurone en présence du $MgCl_2$. Les enregistrements obtenus sont illustrés dans les figures 41Bb1 et 41Bb2. La soustraction des réponses obtenues met en évidence la seule activation du courant potassique transitoire, le courant calcique bas-seuil ayant été supprimé en absence de Ca^{2+} extracellulaire (figure 41Bb3).

Les enregistrements issus des deux soustractions, réalisées à partir des enregistrements avec ou sans Ca^{2+} , sont eux-mêmes soustraits de manière à isoler le courant calcique bas-seuil (figure 41a4).

A partir des deux courants calcique et potassique isolés, une courbe courant-potentiel est réalisée (figure 41C). Elle montre que les seuils d'activation des deux types de courant sont sensiblement décalés. Ainsi dans l'exemple illustré dans la figure 41C, le courant calcique bas-seuil s'active à -76mV tandis que le courant potassique transitoire s'active à -66mV. Jusqu'au maximum d'amplitude du courant calcique bas-seuil, situé vers -40mV, un courant net entrant prédomine, puis pour des potentiels plus dépolarisés, un courant net sortant devient prépondérant.

Cela permet d'expliquer la décharge des neurones enregistrés en courant-imposé, lorsque le neurone est soumis à un saut dépolarisant à partir d'un potentiel membranaire hyperpolarisé (figure 10B1). Le potentiel dépolarisant lent s'active rapidement car le courant calcique est

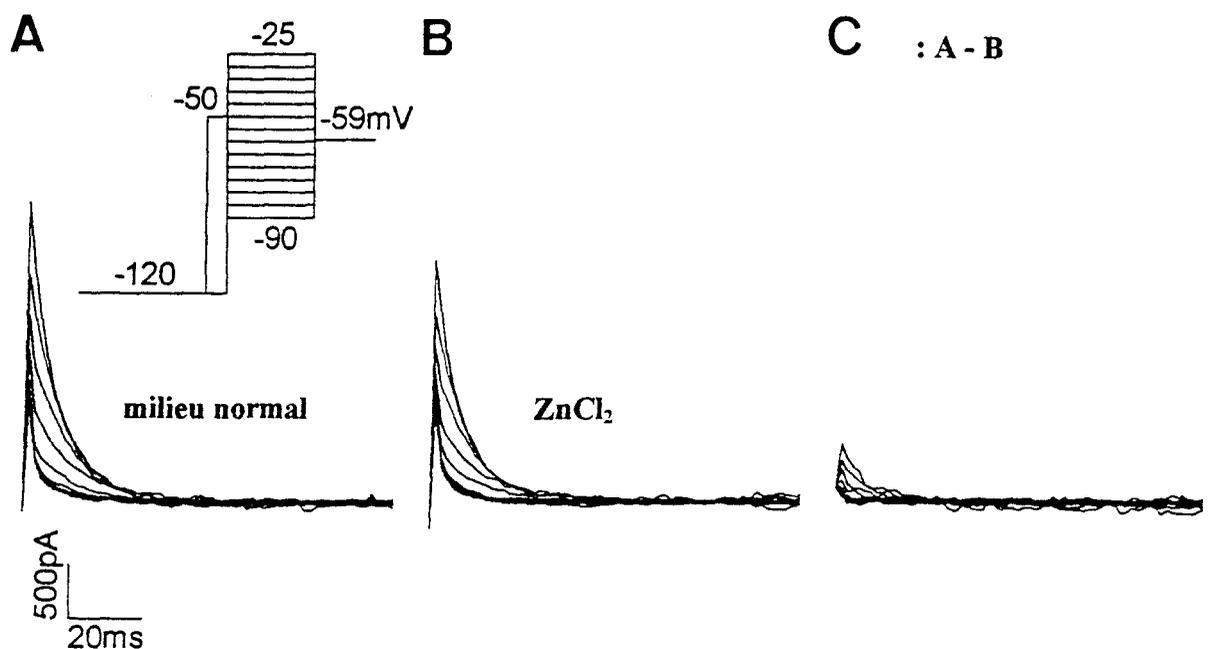


Figure 40. Effet du zinc sur le courant potassique transitoire exprimé dans un neurone sBPA de type I.

Un double protocole de stimulation AB, identique à celui décrit dans les figures 27 et 28, est appliqué à un neurone sBPA de type I. La série de sauts dépolarisants est comprise entre -90 et -25mV.

A. Les enregistrements issus de ce double protocole mettent en évidence l'activation d'un courant potassique transitoire en milieu extracellulaire *f* comprenant du Ni²⁺ et du Cs⁺. **B.** L'application de 100μM de Zn²⁺ dans la solution *f* provoque une légère réduction du courant potassique transitoire. **C.** Ces enregistrements proviennent de la soustraction des traces A et B. Le résultat de la soustraction représente la fraction du courant potassique transitoire qui a été bloquée par l'application de Zn²⁺.

La solution intrapipette utilisée est la solution 1.

majoritaire de -75 à -50mV, puis son ascension s'infléchit lorsque le courant potassique transitoire devient dominant. Le courant potassique transitoire restreint l'effet dépolarisant du courant calcique bas-seuil notamment pour les potentiels membranaires proches du PR.

Figure 41. Isolement du courant potassique transitoire et du courant calcique bas-seuil dans un neurone aBPA de type I.

Le neurone est soumis à un double protocole de stimulation. La série de sauts dépolarisants est comprise entre -81 et -36mV.

A. Le double protocole de stimulation est réalisé dans le milieu extracellulaire standard α . (a1) Le pré-potentiel est fixé à -115mV pendant 1s. La stimulation permet d'activer le courant calcique bas-seuil, le courant potassique transitoire, le courant I_K et le courant de fuite. (a2) Le pré-potentiel est fixé à -60mV pendant 1s, ce qui inactive les canaux calciques bas-seuil et les canaux potassiques transitoires. La stimulation ne permet d'activer que le courant I_K et le courant de fuite. (a3) Ces enregistrements proviennent de la soustraction des réponses a1 et a2. Ils mettent en évidence les activations isolées du courant calcique bas-seuil et du courant potassique transitoire.

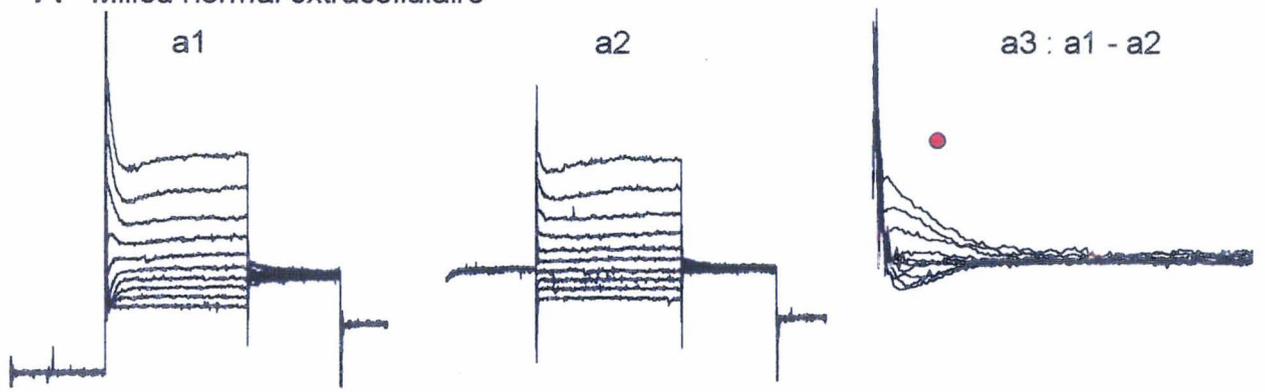
B. Le même double protocole de stimulation est réalisé dans la solution extracellulaire α dans laquelle le $CaCl_2$ a été remplacé par le $MgCl_2$, cette substitution supprime l'activation du courant calcique bas-seuil. (b1) La première série de stimulation permet d'activer le courant potassique transitoire, le courant I_K et le courant de fuite. (b2) La seconde série de stimulation ne permet d'activer que le courant I_K et le courant de fuite. (b3) Ces enregistrements proviennent de la soustraction des réponses b1 et b2. Ils mettent en évidence l'activation isolée du courant potassique transitoire. (a4) Ces enregistrements proviennent de la soustraction de a3 et b3. Ils mettent en évidence l'activation isolée du courant calcique bas-seuil.

C. Les courbes courant-potentiel sont réalisées à partir des enregistrements illustrés dans les figures a3, b3 et a4. La courbe courant-potentiel du courant calcique bas-seuil indique que le seuil d'activation est situé à -75mV. Celle du courant potassique transitoire indique que son seuil d'activation est situé à -65mV. Jusqu'à -40mV, le courant net est de sens entrant, ce qui indique que le courant calcique prédomine. Ensuite, pour des valeurs de potentiel plus positives que -40mV, le courant net est de sens sortant ce qui indique la prédominance du courant potassique transitoire. Il faut noter qu'entre -75 et -60mV, le courant net de sens entrant augmente avec la dépolarisation.

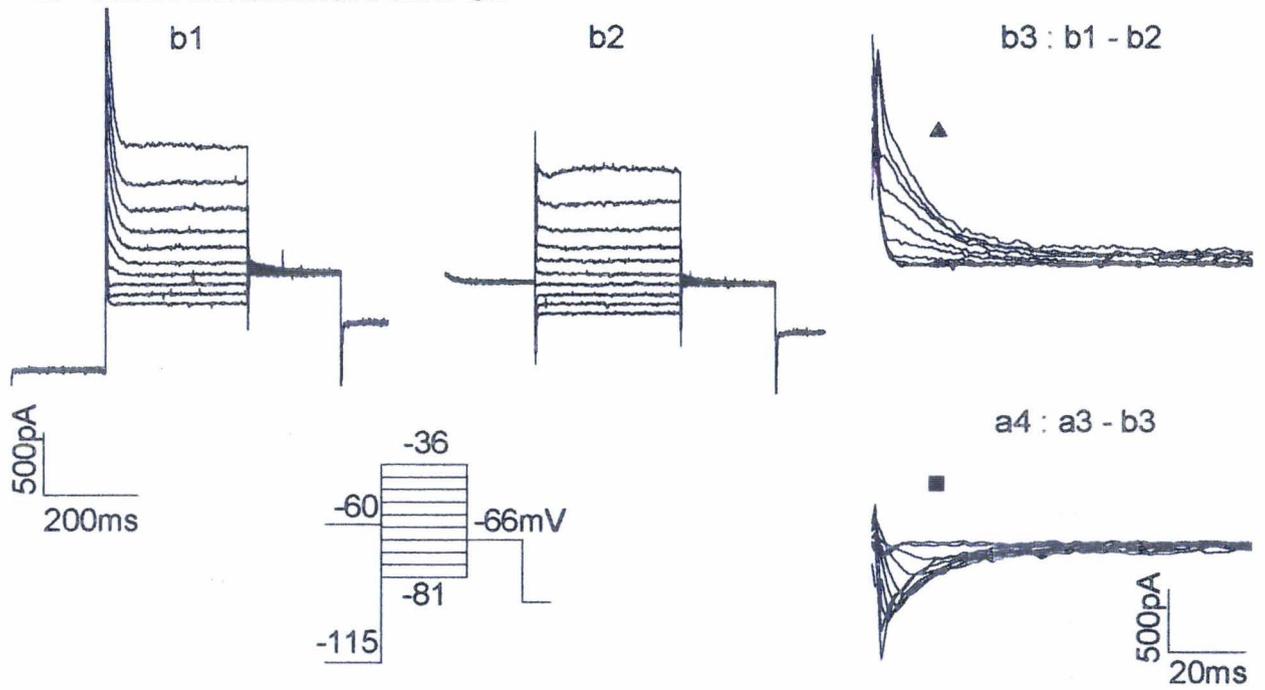
La décharge de ce neurone en courant-imposé est illustrée dans la figure 10B1.

La solution intrapipette utilisée est la solution I.

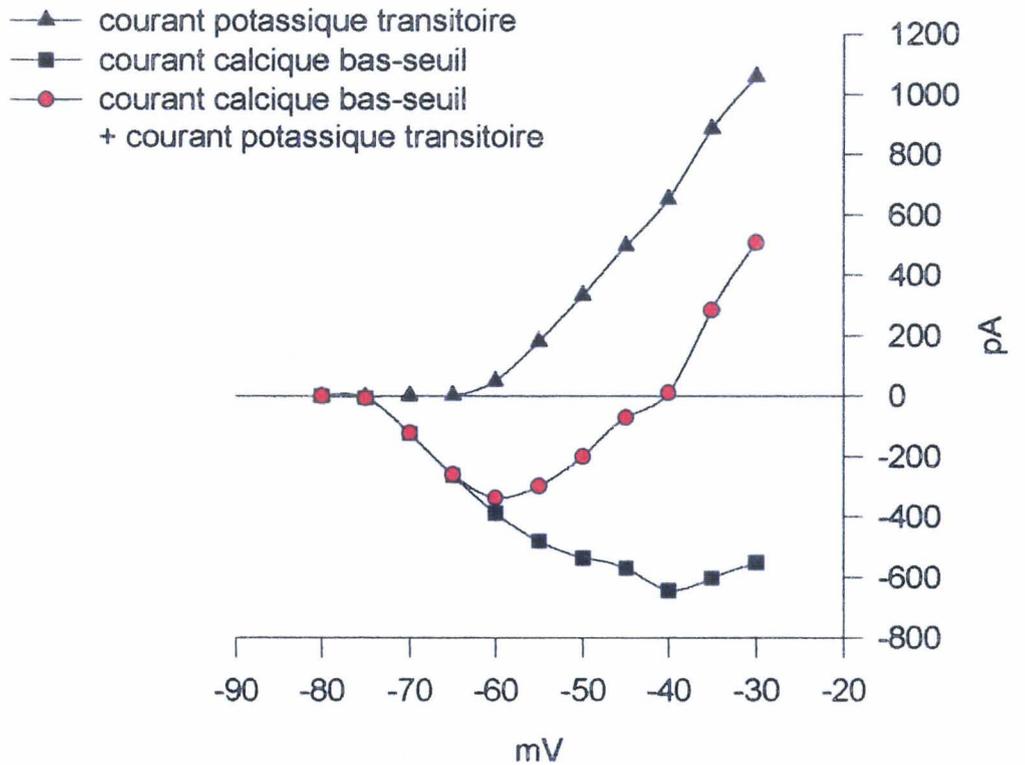
A Milieu normal extracellulaire



B Milieu extracellulaire sans Ca^{2+}



C



DISCUSSION

Dans cette étude, les caractéristiques biophysiques, cinétiques et pharmacologiques de deux types de courants, le courant calcique bas-seuil entrant de type T et le courant potassique transitoire sortant de type A, ont été étudiées dans les neurones de la région du NMD. Les enregistrements ont été réalisés en *patch-clamp*, configuration "cellule entière".

I. Considérations méthodologiques

Comme cela a été mentionné dans les Généralités, la technique du *patch-clamp* en configuration "cellule entière" appliquée à la tranche épaisse de cerveau offre de nombreux avantages pour les techniques d'enregistrement cellulaire. Cependant il faut préciser qu'elle ne permet pas la réalisation d'enregistrements en potentiel-imposé d'une qualité irréprochable, en raison de la complexité spatiale des neurones pourvus de dendrites étendues. L'importance de la surface dendritique pose en effet des problèmes de maintien de l'imposition du potentiel en tous points de la surface du neurone (*space-clamp* en anglais) (Armstrong et Gilly, 1992). Un mauvais *space-clamp* peut, d'une part, provoquer des erreurs par sous-estimation dans les mesures de **l'amplitude des courants** et, d'autre part, interdit la réalisation d'une analyse valable des **constantes de temps d'activation** de ces courants en fonction du potentiel.

Dans leur étude visant à étudier tout d'abord les propriétés membranaires des neurones cholinergiques du tronc cérébral, puis les courants calcique de type T et potassique de type A existant dans ces cellules sur tranches épaisses, Kamondi *et al* (1992) considèrent que les enregistrements obtenus en configuration "cellule entière" ne peuvent être interprétés que de manière qualitative.

Dans nos expériences, le problème concernant le maintien spatial du potentiel-imposé ne doit pas avoir porté atteinte aux **mesures d'amplitude des courants** car les neurones enregistrés ont été sélectionnés lorsque l'imposition du potentiel pouvait être faite de manière suffisamment fiable, c'est-à-dire que la valeur expérimentale du potentiel-imposé n'était jamais inférieure de

plus de 2mV par rapport à la valeur programmée. La déformation de la phase d'activation des courants dits rapides, qui se traduit par une inflexion plus ou moins marquée, est particulièrement nette lorsque le *space-clamp* n'est pas satisfaisant. Les neurones sélectionnés ne présentaient pas de déformation sur les enregistrements des courants transitoires. Il est important de signaler que cette sélection a réduit de manière importante le nombre d'enregistrements à analyser, en effet 24 neurones seulement ont été retenus sur 45 neurones enregistrés dans le but de la réalisation des études biophysique et cinétique des courants de type T et de type A.

L'analyse des **constantes d'activation du courant** s'effectue généralement par l'ajustement exponentiel de la phase d'activation du courant enregistré. Elle est employée pour analyser le processus d'activation du courant en fonction du temps et pour déterminer sa dépendance au potentiel. Comme cette opération nécessite tout d'abord l'obtention d'enregistrements dépourvus du courant capacitif, il aurait fallu utiliser un protocole de soustraction qui permette de le supprimer en même temps que le courant de fuite. Cependant, l'utilisation du protocole de soustraction produit un signal bruité, qui empêche l'ajustement exponentiel de l'activation rapide de ces deux courants. Dans ce cas, il s'avère nécessaire de multiplier les enregistrements du courant pour réaliser leur moyenne et ainsi obtenir des tracés sans bruit de fond. Comme la répétition des stimulations est néfaste à la survie du neurone, nous avons décidé de réaliser des mesures directes du temps de latence du pic des courants pour remplacer les mesures des constantes de temps d'activation irréalisables dans ces conditions. Bien entendu, ces mesures directes sans ajustement non linéaire ne permettent pas la détermination du caractère mono ou pluriexponentiel des processus mis en jeu.

II. Le courant calcique bas-seuil de type T

Les résultats obtenus lors de la présente étude montrent que certaines propriétés du courant calcique de type T existant dans les neurones de type I de la région du NMD sont analogues à celles qui ont précédemment été décrites dans d'autres neurones du système nerveux central et notamment dans les neurones hypothalamiques. Cependant, ces résultats montrent également qu'il existe plusieurs différences essentielles et intéressantes qui seront discutées.

1. Dépendance ionique du courant calcique de type T

Nos expériences en milieu sans Ca^{2+} démontrent la nature du courant entrant bas-seuil.

Lorsque le Ca^{2+} est remplacé par le Ba^{2+} , le courant activé est de plus faible amplitude, de la même manière que le courant dénommé I_{VB} dans les neurones relais du thalamus ventro-basal (Huguenard et Prince, 1992, Huguenard *et al*, 1993) et que dans les neurones hypothalamiques isolés de rat (Akaike *et al*, 1989). Le Ba^{2+} induit ici une réduction du courant d'un facteur de deux; cette diminution est du même ordre de grandeur que celle observée dans les neurones hypothalamiques isolés. A l'inverse, Erickson *et al* (1993) ont montré que dans les neurones vasopressinergiques du noyau supraoptique de l'hypothalamus de cobaye, l'amplitude du courant calcique de type T était augmenté en présence de Ba^{2+} . Dans l'hypothalamus, les courants calciques de type T peuvent donc présenter une dépendance ionique différente vis à vis du Ba^{2+} en fonction de la région observée.

2. Les propriétés biophysiques et cinétiques du courant calcique bas-seuil de type T

L'analyse des paramètres biophysiques et cinétiques du courant calcique de type T permet de confirmer que ce courant est bien à l'origine des potentiels dépolarisants lents qui sont décrits dans les deux sous-types de neurones de type I.

a. Intensité du courant calcique de type T dans les neurones de type I

Sans distinguer le sous-type des neurones de type I, l'analyse du courant calcique de type T montre que son seuil d'activation se situe sous la valeur du PR moyen, approximativement vers -80mV lorsque le potentiel membranaire est maintenu pendant une seconde en dessous de -100mV. L'amplitude maximale du courant est obtenue vers -50mV environ.

Les amplitudes des courants calciques de type T mesurées montrent des valeurs hétérogènes, qui fluctuent selon un facteur de dix, entre 200 et 2000pA environ. Ces différences peuvent être dues soit à la localisation aléatoire de la pipette sur le corps cellulaire du neurone ou sur le tronc dendritique, qui posséderaient une localisation hétérogène de canaux, soit plus vraisemblablement à un nombre différent de canaux sur les corps cellulaires d'un neurone à l'autre. Les mesures de l'intensité du courant calcique de type T montrent que la moitié des neurones enregistrés ont un courant calcique dont l'amplitude est comprise entre 200 et 1000pA,

l'autre moitié de l'échantillon présente un courant d'intensité supérieure à 1000pA. Ces résultats correspondent exactement aux pourcentages de neurones relevés dans les deux sous-types aBPA et sBPA à partir de l'étude en courant-imposé. Cet argument se montre en faveur de l'existence d'un seul type de courant calcique bas-seuil à l'origine des deux types de potentiel dépolarisant lent dans les neurones de type I de la région du NMD. L'hypothèse suggérée est que les neurones aBPA posséderaient davantage de canaux calciques de type T que les neurones sBPA. Des résultats récents introduisent une notion nouvelle qui tend à relier la surface membranaire et la taille du courant calcique (Holohean *et al*, 1996). Cet argument ne semble pas être applicable aux neurones du NMD qui présentent, malgré des profils divers, une bonne homogénéité dans leurs tailles (Doutrelant *et al*, 1992).

La valeur moyenne de l'amplitude du courant calcique de type T mesurée est d'environ 1000pA. Une telle intensité n'est jamais retrouvée dans les autres neurones hypothalamiques étudiés où le courant calcique de type T atteint un pic maximal de 500pA en moyenne (Akaike *et al*, 1989; Huang, 1993; Fisher et Bourque, 1995). Dans les autres régions du système nerveux central, des courants calciques de type T ayant une intensité de 1000pA ont été décrits dans les neurones du ganglion dorsal (Leybaert et Hemptinne, 1993), dans les neurones cholinergiques du télencéphale (Allen *et al*, 1993), les neurones neocorticaux (Sutor et Ziegelgansberger, 1987), les neurones du noyau genouillé (Crunelli *et al*, 1989) et les neurones sensoriels (Bossu et Feltz, 1986).

b. Processus d'activation et d'inactivation du courant calcique de type T

La courbe d'activation montre que **l'activation du courant calcique bas-seuil est fortement dépendante du potentiel** pour des valeurs situées entre -80 (seuil d'activation) et -50mV (maximum d'activation); la pente de cette courbe (k) varie approximativement entre 2 et 5 et la valeur moyenne de $V_{1/2}$ est -70.1mV. Ce processus d'activation du courant de type T est relativement identique à celui qui est observé dans les neurones dopaminergiques de la substance noire (Kang et Kitai, 1993b), dans les neurones thalamo-corticaux (Guyon *et al*, 1993) et les neurones du noyau genouillé latéral (Crunelli *et al*, 1989).

Le temps de latence du pic de courant est également sensible au potentiel. Il diminue lorsque le potentiel membranaire est dépolarisé. Cette caractéristique est retrouvée dans tous les courants calciques de type T décrits dans les neurones du système nerveux central.

Le processus d'inactivation du courant calcique de type T est également dépendant du potentiel membranaire. L'inactivation complète du courant s'effectue lorsque le potentiel est plus positif que -60mV. Cela signifie que les canaux calciques bas-seuil commencent à se désactiver lorsque le potentiel membranaire est juste en dessous du PR. Les canaux deviennent à nouveau tous disponibles, c'est-à-dire tous désactivés, lorsque le potentiel membranaire arrive à la valeur de -100mV. Un processus semblable d'inactivation dépendant du potentiel a été fréquemment observé pour les courants calciques de type T des neurones du système nerveux central. Cependant, on remarquera que la valeur du $V_{1/2}$ du processus d'inactivation du courant calcique de type T mesurée dans les neurones hypothalamiques du noyau suprachiasmatique (Huang, 1993) et de la région du noyau ventromédian (Akaike *et al*, 1989) est un peu plus négative (\sim -90mV) que celle décrite dans cette étude (\sim -80mV).

Les résultats montrent également que **l'inactivation du courant calcique de type T suit un décaissement monoexponentiel**, ce qui traduit l'existence d'une composante unique et confirme l'absence de contamination du courant calcique bas-seuil par d'autres types de courants calciques (Fraser et MacVicar, 1991).

La constante de temps de l'inactivation du courant calcique de type T est peu sensible au potentiel. Les résultats montrent une dépendance des canaux de type T vis-à-vis du potentiel qui se situe entre -70 et -80mV, c'est-à-dire près de la valeur limite du processus d'activation du courant. L'inactivation du courant calcique de type T est rapide car les valeurs des constantes de temps sont situées entre 30ms et 10ms. Ces mesures diffèrent de celles qui sont observées dans les études réalisées dans la plupart des régions du système nerveux central et aussi de celles de Akaike (1991) dans l'hypothalamus, où la constante de temps d'inactivation du courant calcique de type T dépend fortement du potentiel en diminuant de 90ms à -60mV jusqu'à 40ms à 20mV. Néanmoins, des constantes de temps d'inactivation de valeurs semblables à celles trouvées ici sont retrouvées dans des interneurons hippocampiques (Fraser et MacVicar, 1991) et dans les neurones du noyau suprachiasmatique (Huang, 1993).

Le temps de restauration du courant calcique de type T est de l'ordre de 100ms, ce qui signifie qu'à partir du PR, la membrane du neurone nécessite une hyperpolarisation d'au

moins 100ms pour pouvoir générer, après une stimulation dépolarisante ou un retour au PR, un potentiel dépolarisant lent de pleine amplitude.

Les propriétés biophysiques et cinétiques qui émanent de cette analyse montrent que le courant calcique de type T des neurones de type I possède certaines caractéristiques identiques à celles du courant calcique de type T qui a été décrit dans une variété de neurones du système nerveux central. Elles semblent tout particulièrement se rapprocher de celles du courant calcique de type T étudiées dans les neurones du noyau genouillé latéral chez le rat (Crunelli *et al*, 1989), les neurones du télencéphale chez le cobaye (Griffith *et al*, 1994), les neurones thalamocorticaux (Guyon *et al*, 1993), les neurones cholinergiques du tronc cérébral (Kamondi *et al*, 1992), les neurones hypothalamiques isolés chez le rat (Akaike *et al*, 1989) et les neurones du noyau suprachiasmatique chez le rat (Huang, 1993).

Rappelons que les neurones dopaminergiques de la pars compacta de la substance noire chez le rat (Kang et Kitai, 1993a) présentent un potentiel dépolarisant lent semblable à celui observé dans les neurones sBPA de type I. L'étude du courant calcique bas-seuil dans ces neurones (Kang et Kitai, 1993b) montre qu'il présente des caractéristiques biophysiques très proches de celles reportées dans cette étude.

3. Propriétés pharmacologiques du courant calcique de type T

De manière attendue, une faible concentration de Ni^{2+} supprime complètement le courant calcique de type T dans les neurones aBPA et sBPA de type I de la même façon qu'il a supprimé les potentiels dépolarisants lents. Le Co^{2+} induit le même effet que le Ni^{2+} lorsqu'il est utilisé en forte concentration. Ces résultats confirment, d'une part, la nature calcique du courant étudié et coïncident, d'autre part, avec la caractéristique d'inhibition sélective du courant de type T par des doses faibles de Ni^{2+} selon la classification pharmacologique établie pour les courants calciques dépendants du potentiel (Fox *et al*, 1987a).

A partir de cette dernière confirmation voulant que le **courant calcique bas-seuil** observé dans les neurones de type I soit effectivement un **courant de type T**, une étude pharmacologique approfondie s'imposait. A l'heure actuelle, la liste des substances pharmacologiques pouvant bloquer les différents canaux calciques dépendants du potentiel est vaste (voir paragraphes III, 2, b et III, 3, b des Généralités). Aussi, un choix s'est imposé qui a été particulièrement orienté par

les travaux d'Akaike (1991). Réalisés sur des neurones isolés à partir de trois régions différentes du cerveau (le CA1 dans l'hippocampe, l'amygdale et l'hypothalamus) de rat pris à des stades de vie différents (animaux nouveau-nés, adultes et âgés), ces travaux avaient permis l'étude du canal calcique de type T dans les neurones de ces trois régions du cerveau. L'auteur y a comparé l'action des diverses substances qui bloquaient le courant de type T. Parmi elles, l'**amiloride** (substance diurétique) et l'**octanol** (alcool de haut poids moléculaire) semblaient intéressantes car, elles n'avaient jamais été utilisées avant dans l'étude des neurones hypothalamiques.

Il a été montré que l'**amiloride bloque le courant calcique de type T** dans les neurones du système nerveux central et de manière plus fréquente dans les neurones périphériques (Tang *et al*, 1988; Bean, 1989; revue dans Scott *et al*, 1991, Umemiya et Berger, 1994). Il n'induit aucun effet supprimeur sur le courant de type T dans certains neurones tels que ceux du CA3 de l'hippocampe de cobaye (Mogul et Fox, 1991) et les neurones thalamiques dissociés (Suzuki et Rogawski, 1989).

Utilisé à la concentration de 1mM dans cette étude, l'amiloride a provoqué la suppression de 45% du courant calcique de type T dans les deux sous-types aBPA et sBPA des neurones de type I du NMD. Cette suppression est associée à une faible réduction du potentiel dépolarisant lent. Ces observations sont identiques à celles de Viana *et al* (1993) qui ont montré que jusqu'à 1.5mM l'amiloride ne provoquait pas de réduction du rebond dépolarisant dans les motoneurones de l'hypoglosse mais qu'à 1mM, il supprimait partiellement (31%) le courant de type T. Ces résultats montrent d'une part que l'amiloride peut être considéré comme un bloqueur du courant calcique de type T dans la région du NMD hypothalamique et que d'autre part, une forte réduction du courant de type T signifiant une diminution de l'influx calcique ne conduit pas à une réduction dans les mêmes proportions de l'amplitude du potentiel dépolarisant lent. En plus, comme il supprime partiellement le courant calcique de type T lorsqu'il est appliqué à la concentration de 1mM, dose pour laquelle il n'induit pas encore d'effet inhibiteur sur les transporteurs $\text{Na}^+\text{-H}^+$ et $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ (Aronson, 1985; Schellenberg *et al*, 1983), cette modulation semble spécifique. D'autant plus que cette drogue semble n'avoir que peu, voire aucun effet sur les courants calciques haut-seuil de type L dans les neurones du ganglion dorsal de poulet (Tang *et al*, 1988), dans les neurones thalamiques GABAergiques (Huguenard *et al*, 1993) et dans les neurones isolés de rat (Akaike, 1991).

L'autre substance testée sur le courant calcique de type T, l'**octanol à 1mM, produit une forte réduction, de l'ordre de 70%**. Contrairement à l'amiloride, l'octanol provoque une nette

diminution de l'amplitude des potentiels dépolarisants lents dans les deux sous-types aBPA et sBPA des neurones de type I.

Il est intéressant de constater avec ces deux substances (amiloride et octanol) que la diminution de l'amplitude du courant calcique de type T n'est pas systématiquement en relation avec la diminution de l'amplitude du potentiel dépolarisant lent. Sans que ce phénomène puisse être expliquée à la lueur de nos expériences, il est vraisemblablement dû à une action différente de chacune des substances sur les propriétés des canaux.

Il a été montré que l'octanol bloque spécifiquement le courant de type T dans les neurones du tronc cérébral (Llinás et Yarom, 1986a) et non spécifiquement les canaux L, N et T dans les cellules pyramidales (Akaike, 1991). Dans la substance noire de la pars compacta, un potentiel dépolarisant lent oscillant de nature calcique (SOP) n'est pas bloqué par l'octanol (Nedergaard *et al*, 1993). Il faut noter que le SOP présente les mêmes caractéristiques que le potentiel dépolarisant lent des neurones sBPA car il est de faible amplitude et ne permet le déclenchement que d'un seul potentiel d'action. Toutefois, le SOP n'est pas bloqué par les antagonistes classiques du courant calcique de type T (Ni^{2+} en faible concentration et amiloride) et les canaux de type T ne contribueraient que minoritairement à sa production.

Aux concentrations respectives de 10^{-4}M et de 10^{-6}M , **la nifédipine et la flunarizine ne provoquent aucune modification du courant calcique de type T** dans les neurones de la région du NMD. Quoique ce résultat soit sans réelle surprise, puisque les courants calciques de type T sont en général insensibles aux DHP, il diffère totalement de celui qui a été obtenu dans l'étude de Akaike *et al* (1989) réalisée sur les neurones hypothalamiques isolés du noyau ventromédian où le courant calcique de type T est réduit de façon dose-dépendante par la nifédipine ($K_d=5.10^{-6}\text{M}$) et surtout par la flunarizine ($K_d=7.10^{-7}\text{M}$). La flunarizine est selon ces auteurs le bloqueur le plus puissant du courant calcique de type T dans les neurones hypothalamiques.

Un effet de la flunarizine semblable à celui qui est décrit par l'équipe de Akaike a également été découvert sur les cellules de Purkinje isolées du cervelet (Kaneda *et al*, 1990) et dans les neurones isolés de l'amygdale de rat (Kaneda et Akaike, 1989). Par contre, utilisée à la même concentration que dans la présente étude, la flunarizine ne module pas le courant calcique de type T dans les neurones du CA1 de l'hippocampe de cobaye (Higashi *et al*, 1990). Dans les neurones isolés du ganglion dorsal de rat, la substance peut provoquer, lorsqu'elle appliquée à 10^{-6}M

⁶M, soit des augmentations, soit des réductions de l'amplitude du courant de type T (Leybaert et Hemptinne, 1993).

Par conséquent, les résultats observés dans cette étude sont en contradiction avec la caractéristique importante du courant calcique de type T hypothalamique, à savoir sa sensibilité aux DHP et notamment à la flunarizine. Les canaux calciques de type T existant dans les neurones hypothalamiques de la région du NMD possèdent des caractéristiques pharmacologiques qui se rapprochent plus de celles qui sont décrites dans les canaux calciques de type T des neurones appartenant aux autres régions du système nerveux central et périphérique.

La dernière drogue testée sur le courant calcique de type T est représentée par le **mibefradil** (Ro 40-5967, Hoffmann-La Roche). Cette substance a été décrite comme un nouvel antagoniste calcique, plus sélectif du courant calcique de type T que du courant calcique de type L, dans le muscle lisse vasculaire (Mishra et Hermsmeyer, 1994), dans les cellules cancéreuses en culture (cellules h-MTC), dans les cellules ovariennes de hamster en culture (cellules CHO) (Mehrke *et al*, 1994), dans les cellules en prolifération de la neointima après une lésion vasculaire chez le rat (Schmitt *et al*, 1995). Appliquée à des doses pharmaceutiques, cette substance produit *in vitro* des effets antiprolifératifs sur le muscle lisse vasculaire et *in vivo* possède une action antihypertensive. Le Ro 40-5967 a d'ailleurs été testé précliniquement dans des traitements de l'hypertension et de l'angine de poitrine (Hermsmeyer, 1991).

Le mibefradil n'ayant jamais été testé sur les cellules nerveuses, il était intéressant de connaître son effet sur le courant calcique de type T existant dans les neurones hypothalamiques étudiés ici. Le résultat obtenu montre que le mibefradil n'induit qu'une très faible réduction du courant calcique de type T au bout de 30min et lorsque la substance est appliquée à la concentration de 10 μ M sur les neurones sBPA et aBPA de type I. Cette observation est intéressante car elle suggère que le mibefradil qui bloque de manière sélective, à une concentration de 1 μ M, les canaux calciques de type T de cellules non neuronales, ne produirait qu'un effet très faible après une action prolongée sur les cellules nerveuses.

4. Conclusion

1. D'après les résultats obtenus sur les caractéristiques biophysiques, cinétiques et pharmacologiques du courant calcique bas-seuil, il apparaît qu'un canal calcique apparenté au canal de type T dans le système nerveux central, selon la classification de Nowicky *et al* (1985),

soit à l'origine des potentiels dépolarisants lents observés dans les neurones de type I.

2. Le courant calcique bas-seuil montre des processus d'activation et d'inactivation très sensibles au potentiel pour les deux sous-types de neurones de type I (aBPA et sBPA). Une distinction entre les deux sous-types de neurone est seulement signalée par la différence de l'intensité moyenne du courant. L'étude pharmacologique donne des résultats identiques pour les deux sous-types de neurone.

3. Contrairement aux caractéristiques des canaux de type T décrits dans l'hypothalamus (Akaike, 1991), le courant est résistant à la nifédipine et à la flunarizine.

III. Le courant potassique transitoire de type A

Lors des résultats obtenus en courant-imposé, l'existence d'une rectification membranaire de sens sortant a été mise en évidence dans les neurones des types I et II de la région du NMD. Il a été suggéré que cette rectification jouait un rôle dans l'excitabilité des neurones de type I, elle-même déterminée par la présence des potentiels dépolarisants lents. Les caractéristiques de la rectification transitoire ont permis d'asseoir l'hypothèse selon laquelle elle était due à l'intervention d'un courant appartenant à la catégorie des courants de type A. L'étude du courant potassique transitoire de type A en potentiel-imposé a été réalisée pour confirmer cette hypothèse d'une part et pour définir ses caractéristiques biophysiques, cinétiques et pharmacologiques d'autre part.

1. Rappel des caractéristiques principales des courants potassiques de type A

Le premier courant potassique de type A a été initialement décrit par Hagiwara *et al* (1961) dans les neurones de mollusque puis plus tard ce courant fut mieux caractérisé par Connor et Stevens (1971) et Neher (1971). Par la suite, des courants de type A ont été décrits comme **extrêmement divers** et présents dans un grand nombre de cellules différentes de vertébrés et d'invertébrés (revues dans Rogawski, 1985; Rudy, 1988).

D'après Rudy (1988), les courants potassiques de type A sont caractérisés par une activation rapide et une inactivation rapide suite à des sauts dépolarisants appliqués à partir d'un

pré-potentiel hyperpolarisé, un seuil d'activation plus négatif que celui des autres conductances potassiques, une inactivation totale lorsque le potentiel membranaire est proche du PR, une sensibilité à la 4-AP ($K_d \sim 2\text{mM}$) et une résistance au TEA extracellulaire.

2. Dépendance ionique du courant potassique transitoire et effets du Ba^{2+} sur ce courant

Dans nos expériences, le potentiel d'inversion du courant transitoire apparaît proche de la pile d'équilibre aux ions K^+ . Ce résultat confirme la nature potassique du courant transitoire et la sélectivité des canaux pour cet ion. Les résultats obtenus en courant-imposé ne résolvaient pas totalement la question de savoir si la rectification transitoire de sens sortant n'était pas sensible aux concentrations de Ca^{2+} . Dans les expériences en potentiel-imposé, lorsque le Ca^{2+} est retiré du milieu extracellulaire, le courant potassique de type A n'est en aucune façon modifié. Ces résultats démontrent que l'activation du courant transitoire de sens sortant n'est pas dépendante du Ca^{2+} extracellulaire. Il faut rappeler que dans l'hypothalamus, un courant potassique de type A dépendant du Ca^{2+} a été décrit par Bourque (1988) dans des neurones magnocellulaires.

Cependant, dans nos expériences, la substitution du Ba^{2+} au Ca^{2+} a provoqué une suppression notable du courant potassique de type A dans les neurones de type I. L'effet de cette substitution sur le courant de type A des neurones de type II n'a pas été testé. A notre connaissance, l'effet supprimeur du Ba^{2+} sur le courant potassique de type A se manifeste rarement. C'est le cas dans une étude de Harris (1992) sur les neurones de la substance noire, où le courant transitoire de sens sortant est résistant à 5mM de 4-AP et dans une étude de McCormick (1991) sur les neurones dorso-latéraux genouillés, où le courant potassique est sensible à des concentrations faibles de 4-AP ($\sim 100\mu\text{M}$). Ces deux derniers courants transitoires, qui manifestent une sensibilité au Ba^{2+} , diffèrent cependant de ceux qui ont été mis en évidence dans les neurones du NMD par leur sensibilité à la 4-AP.

3. Les propriétés biophysiques et cinétiques du courant potassique transitoire de type A

a. Intensité du courant potassique transitoire de type A dans les deux types de neurones

Lorsqu'ils sont stimulés à partir d'un potentiel hyperpolarisé en dessous de -100mV en milieu normal, les neurones des types I et II évoquent d'intenses courants transitoires de sens sortant qui sont activés de manière simultanée avec le courant calcique de type T dans les sous-types aBPA et sBPA des neurones de type I.

Le double protocole de stimulation utilisé (appelé ici AB) pour enregistrer l'activation isolée du courant potassique transitoire de type A a été repris d'après ceux de Chen et Wong (1992) et de Eder et Heinemann (1994).

L'intensité du courant mesuré dans les neurones de type I est plus faible que celle des neurones de type II. Il faut cependant remarquer que les intensités des courants potassiques de type A mesurées dans les neurones d'une même classe sont elles-mêmes hétérogènes. Concernant ces différences d'amplitudes, des hypothèses identiques à celles qui sont données pour les courants de type T (paragraphe II, 2, a de la Discussion) peuvent être suggérées. Il faut toutefois remarquer que les courants potassiques de type A montrant des amplitudes largement supérieures à celles du courant calcique de type T sont davantage soumis aux problèmes de *space-clamp* (Surmeier *et al*, 1994). L'amplitude des courants de type A varie en effet de 1 à 4nA en moyenne alors que celle du courant de type T fluctue entre 0.2 et 2.5nA.

b. Processus d'activation et d'inactivation du courant potassique de type A

Les courbes d'activation du courant potassique de type A dans les neurones des types I et II ne présentent pas de différences notables. L'activation est dépendante du potentiel entre -65mV (seuil d'activation du courant) et 0mV (maximum d'activation du courant). Les caractéristiques de cette courbe ($V_{1/2} \sim -35\text{mV}$ et $k \sim 10.5$) sont similaires à celles qui sont décrites dans les neurones magnocellulaires du noyau supraoptique (Bourque, 1988; Nagatomo *et al*, 1995) et du noyau paraventriculaire (Li et Ferguson, 1996). Il faut cependant rappeler que le courant de type A décrit par Bourque est dépendant du Ca^{2+} , ce qui n'est pas le cas pour les neurones du NMD.

Le courant potassique de type A des neurones de type I (tp moyen=7ms) s'active environ trois fois plus rapidement que celui des neurones de type II (tp moyen=19ms). L'inactivation de ce courant est également plus rapide dans les neurones de type I (τ_{inact} moyen=30.5ms) que dans les neurones de type II mais avec un facteur approximatif de 2 (τ_{inact} moyen=66.0ms). La mesure de τ_{inact} ayant été réalisée par un ajustement monoexponentiel, on peut considérer qu'une seule composante est responsable de l'inactivation des canaux de type A dans les deux types de neurones. Le caractère monoexponentiel de τ_{inact} indique de plus que le courant enregistré est correctement isolé.

Dans les deux types de neurones, les constantes de temps d'inactivation sont dépendantes du potentiel car elles diminuent lorsque le potentiel est dépolarisé; par contre les temps de latence du pic (tp) du courant potassique de type A ne le sont que faiblement.

A la vue de l'ensemble des résultats obtenus pour tp et τ_{inact} , il semble que les neurones de type I et de type II possèdent des canaux potassiques de type A qui diffèrent par leur cinétique d'activation et d'inactivation. De telles différences ont déjà été observées dans les neurones histaminergiques hypothalamiques (Greene *et al*, 1990), où deux courants de type A sont exprimés dans les mêmes cellules. Les auteurs ont enregistré un courant global de type A comprenant deux composantes, suggérées par l'inactivation du courant qui s'avérait être de type biexponentiel. Ce résultat a conduit les auteurs à distinguer deux types de courant de type A, $I_{A,f}$ inactivé rapidement et $I_{A,s}$ inactivé lentement. Les constantes de temps d'inactivation de ces deux courants sont cependant de valeurs plus élevées (~100 et ~570ms) que celles mesurées ici. L'existence de plusieurs sous-types de courants de type A avait déjà été suggérée par Rudy (1988) et par Surmeier *et al*, (1989). Une observation identique à celle de Greene *et al* (1990) est retrouvée dans l'étude de McFarlane et Cooper (1992, 1993), qui ont identifié deux types de courants I_A , également nommés $I_{A,f}$ et $I_{A,s}$, dans les neurones sympathiques de rat au stade néonatal. Ces auteurs ont démontré que lorsque l'amplitude du courant potassique I_K augmentait pendant certaines périodes de la vie des neurones mis en culture, cette variation coïncidait avec une diminution des courants de type A. La situation inverse pouvait également se produire. Ils ont donc suggéré que les neurones du ganglion cervical supérieur utilisaient des mécanismes intrinsèques pour réguler l'expression des différents courants potassiques.

Le processus d'inactivation du courant potassique de type A est fortement dépendant du potentiel dans les deux types de neurones. Il n'a pas été possible de distinguer deux processus différents relatifs à chaque courant de type A activé dans les deux types neuronaux I et II. Ses caractéristiques ($V_{1/2} \sim -81\text{mV}$ et $k \sim 8.5$) sont identiques à la plupart de celles qui ont été décrites dans la littérature se rapportant aux courants de type A dans les neurones du système nerveux central. On peut surtout les rapprocher de celles de certains neurones hypothalamiques (Bourque, 1988; Greene *et al*, 1990; Nagatomo *et al*, 1995; Li et Ferguson, 1996).

Le temps de restauration du courant de type A est de l'ordre de 10ms ce qui signifie qu'à partir du PR, la membrane du neurone ne nécessite qu'une hyperpolarisation de 10ms pour pouvoir réactiver les canaux potassiques de type A. Aucune différence n'a été établie entre les cinétiques de restauration des courants de type A des neurones de type I et celles des neurones de type II. Une telle vitesse de restauration du courant de type A n'est pas fréquente dans les neurones hypothalamiques, où des constantes de temps de restauration de valeurs supérieures à 100ms sont le plus souvent observées (Greene *et al*, 1990; Nagatomo *et al*, 1995). Néanmoins, dans le système nerveux central, la valeur de ce paramètre tend à se rapprocher de 10ms dans les courants de type A des motoneurones trigéminaux (Hsiao et Chandler, 1995), des neurones du néocortex (Andreasen et Hablitz, 1992), des neurones cholinergiques du tronc cérébral (Kamondi *et al*, 1992), des neurones du CA1 hippocampique (Spiegelman *et al*, 1992) et dans le courant I_{tof} (courant potassique transitoire rapide) des neurones embryonnaires de poulet (Sheppard *et al*, 1992).

4. Propriétés pharmacologiques du courant potassique de type A

Le courant potassique de type A est résistant au TEA extracellulaire dans les deux types de neurones. Cette donnée indique qu'il est différent d'un autre courant potassique dénommé I_{CT} , qui est un courant transitoire sensible au TEA à 1mM, souvent confondu avec le courant I_{A} (Storm, 1990).

Dans les deux types de neurones, **2mM de 4-AP n'induisent qu'une très légère diminution du courant de type A** en accord avec les résultats obtenus en courant-imposé. Au contraire, lorsque la concentration en 4-AP est augmentée à **5mM, ce courant est entièrement**

aboli. Ces observations caractérisent une fois de plus le courant de type A dont le blocage par la 4-AP est spécifique (Gustafsson *et al*, 1982), mais le plus souvent à des doses inférieures à 2mM.

Les résultats des expériences menées en présence de **catéchol** (5mM) montrent la **forte sensibilité** du courant potassique de type A à cet alcool sur les neurones de type I. Ce sont Erdlyi et Such (1988) qui ont initialement montré que le courant de type A des neurones d'escargot était bloqué par le catéchol. Il a été montré que le catéchol inhibe le courant de type A dans les motoneurones vagues (Sah et McLachlan, 1992) et dans des neurones ganglionnaires sensoriels (Ducreux et Puizillout, 1995).

Une autre catégorie de courants potassiques dépendants du potentiel est représentée par les canaux de type D (Stansfeld *et al*, 1986; Storm, 1990), laissant passer un courant I_D ou $I_{K(D)}$ similaire à I_A mais s'inactivant plus lentement.

Les courants de type D présentent un seuil d'activation à -70mV environ, ils s'activent en 20ms et s'inactivent en plusieurs secondes, ce qui les différencie cinétiquement des courants de type A. Les courants de type D sont très sensibles à des concentrations faibles de 4-AP (100 μ M). Ils sont spécifiquement bloqués par la dendrotoxine (extraite du venin de mamba vert *Dendroaspis angusticeps*, Harvey et Karlsson, 1980) alors que le courant de type A y est en général insensible (revue dans Storm, 1990), sauf exceptionnellement, comme pour les neurones magnocellulaires du noyau supraoptique (Bourque, 1988) par exemple.

Dans nos expériences, une application de 100nM d' **α -dendrotoxine** n'induit aucune modulation du courant de type A dans les neurones de type I. Ces expériences n'ont pas été réalisées dans les neurones de type II. Cependant, à la vue de la rapidité de l'inactivation du courant transitoire, il est invraisemblable que le courant potassique transitoire des neurones de type II soit du type D, d'autant plus qu'il n'est sensible qu'à des concentrations de 4-AP supérieures à 1mM.

Les expériences menées en présence du **Zn^{2+}** (~100 μ M) sur les neurones de type I ont provoqué une légère réduction du courant de type A. Il a en effet été démontré que le Zn^{2+} parmi d'autres cations métalliques divalents et trivalents tels que le Cu^{2+} , le Pb^{2+} , le Fe^{3+} , le La^{3+} et le Gd^{3+} , pouvaient moduler les processus dépendants du potentiel des canaux potassiques de type A en induisant des déplacements des courbes d'activation et d'inactivation dans le sens dépolarisant (Talukder et Harrison, 1995). Pour les sauts dépolarisants de même valeur effectués avec et sans

Zn^{2+} sur les neurones de type I, le courant de type A semble être d'amplitude réduite après l'addition de Zn^{2+} , alors qu'il s'agit probablement d'une modulation des processus dépendants du potentiel des canaux de type A. Les études des effets du Zn^{2+} sur les courants de type A ont montré que le cation agissait par des mécanismes qui ne s'expliquaient pas par la théorie des effets de charges (Kiss et Osipenko, 1994). Bardoni et Belluzzi (1994) suggèrent que le Zn^{2+} pourrait modifier le fonctionnement du canal en se liant à un domaine spécifique de la protéine du canal. Des effets du Zn^{2+} sur le courant potassique de type A ont également été observés dans les neurones du noyau suprachiasmatique (Huang *et al*, 1993) et dans les neurones hippocampiques (Harrison *et al*, 1993; Talukder et Harrison, 1995) et les mêmes hypothèses ont été suggérées.

5. Conclusion

1. Les neurones de la région du NMD présentent des courants potassiques transitoires qui possèdent des propriétés biophysiques, cinétiques et pharmacologiques globalement semblables à celles décrites dans le système nerveux central pour le courant I_A (Rudy, 1988), exception faite de leur sensibilité au baryum.

2. Les processus d'activation et d'inactivation du courant I_A ont la même sensibilité au potentiel dans les neurones des types I et II mais ils diffèrent par leur cinétique. En effet, le courant des neurones de type I s'active et s'inactive plus rapidement que celui des neurones de type II. Les résultats de l'étude pharmacologique avec la 4-AP et le TEA sont identiques pour les deux types de neurones.

IV. Interaction entre le courant calcique de type T et le courant potassique de type A dans les neurones de type I

1. Rôle du courant de type T dans la genèse des potentiels dépolarisants lents pour les neurones du NMD

Les caractéristiques du courant de type T qui ont été démontrées pour les neurones de la région du NMD permettent d'expliquer les étapes de la production du potentiel dépolarisant lent. Lorsque la membrane est hyperpolarisée en dessous de $-65mV$, le courant de type T commence à

se dé-inactiver; un retour vers le PR ($\sim -55\text{mV}$) conduira à son activation et provoquera l'émission d'un potentiel dépolarisant lent. L'inactivation du courant étant dépendante du potentiel, l'amplitude du potentiel dépolarisant lent sera d'autant plus forte que l'hyperpolarisation se rapprochera de -100mV , valeur de potentiel pour laquelle tous les canaux de type T sont dé-inactivés et sont donc tous disponibles pour l'activation. Comme l'activation et le temps de latence du pic du courant sont dépendants du potentiel, la phase ascendante du potentiel dépolarisant lent va devenir de plus en plus abrupte jusqu'à ce qu'il atteigne une amplitude maximale, qui dépendra de l'intensité du courant activé. Tout comme le potentiel d'action sodique, le potentiel dépolarisant lent est régénératif. En effet, l'entrée de Ca^{2+} due à l'activation des canaux de type T va entraîner la dépolarisation de la membrane, qui elle-même déclenchera l'ouverture d'un plus grand nombre de canaux de type T jusqu'au moment où tous les canaux seront activés. Ensuite, les canaux commenceront à s'inactiver rapidement. Cela conduit à la repolarisation du potentiel dépolarisant lent. Ainsi, un mécanisme de repolarisation autre que l'inactivation des canaux n'est pas nécessaire. La repolarisation peut toutefois être accélérée si l'amplitude du potentiel dépolarisant lent a atteint le seuil d'activation de la conductance potassique I_K . Nos expériences montrent que l'application de TEA extracellulaire augmente la durée de la repolarisation. Enfin, le temps de restauration du courant de type T est bref et sa réactivation sera possible au bout de 100ms seulement.

2. Interaction entre les courants de type T et de type A

L'analyse comparative des propriétés biophysiques et cinétiques des courants de type T et A dans les neurones de type I met en relief leurs interactions, qui déterminent la décharge des neurones. Elle permet notamment de comparer le comportement de la balance qui s'établit entre les deux conductances de sens opposé et d'extrapoler sa signification sur l'activité électrique des neurones de type I.

a. Analyse comparative

Dans les neurones de type I, l'inactivation des canaux de type T est totale à partir de -65mV tandis que celle des canaux de type A l'est à partir de -50mV . Il existe donc un intervalle de 15mV pendant lequel le courant de type T sera complètement inactivé tandis que le courant de type A sera partiellement dé-inactivé. Cela signifie que si le neurone est dépolarisé à partir d'un

potentiel membranaire situé entre -65 et -50mV, le courant de type A sera activé de manière isolée sans l'intervention du courant de type T qui lui serait opposée. Dans cette situation précise, il n'existe aucune interaction entre les deux conductances, car seul le courant de type A peut s'exprimer.

La zone des potentiels que recouvre l'inactivation du courant de type A (de -120 à -50mV) inclut celle du courant de type T (de -110 à -65mV). Cependant, le seuil d'activation du courant de type T (à -80mV) est plus négatif de 15mV que celui du courant de type A (à -65mV). Enfin, la sensibilité au potentiel de l'activation du courant de type T est plus forte que celle du courant de type A ($k=3.58$ et $k=10.45$ respectivement). Ces trois facteurs vont promouvoir un déplacement de la balance en faveur du courant de type T pour les potentiels allant de -80mV (seuil d'activation) à -50mV (maximum d'amplitude du courant). Ainsi, lorsque de petites dépolarisations seront réalisées à partir d'un potentiel membranaire hyperpolarisé, le courant net induit sera de sens entrant, plus proche du courant de type T que du courant de type A. En conséquence, la dépolarisation de la membrane du neurone sera favorisée. Le courant de type A contribuera, à partir de -65mV (seuil d'activation), à modifier la forme et l'amplitude du potentiel dépolarisant lent.

Une nette différence entre les courants de type T et de type A apparaît dans le temps de restauration des deux courants après inactivation des canaux. En effet, la cinétique de restauration du courant de type A ($\tau \sim 10\text{ms}$) est 10 fois plus rapide que celle du courant de type T ($\tau \sim 100\text{ms}$) en réponse à une hyperpolarisation membranaire de courte durée. Cette caractéristique va promouvoir la dé-inactivation sélective du courant de type A et déclencher la réactivation du courant de type A avant celle du courant de type T.

b. Rôle de l'interaction

Lorsque les deux courants calcique de type T et potassique de type A coexistent, en sachant que ces deux courants ont des sensibilités au potentiel qui présentent des similitudes, ils seront mis en jeu de manière quasi simultanée. L'amplitude relative des courants entrant et sortant déterminera la **forme** et l'**amplitude** du potentiel dépolarisant lent. Ce dernier sera plus rapide et plus ample si le courant de type T prédomine. Il sera au contraire moins rapide et plus petit si c'est le courant de type A qui prédomine. Si la mise en jeu du courant de type A ralentit trop la

repolarisation suite à une hyperpolarisation membranaire, cela entraînera l'inactivation des canaux de type T déjà dé-inactivés. Par conséquent, le potentiel dépolarisant lent sera de plus faible amplitude, voire même inexistant, comme dans les interneurons du thalamus où il a été montré que le courant de type A prévenait totalement la production du potentiel dépolarisant lent (Pape *et al*, 1994). Dans ce cas, le rôle du courant calcique de type T serait davantage lié à la régulation des fonctions métaboliques (par l'augmentation de la concentration cytosolique en Ca^{2+}) qu'il ne le serait à l'excitabilité membranaire (McCobb et Beam, 1991). Cela n'est pas le cas des neurones de type I, qui expriment toujours un potentiel dépolarisant lent et où l'intervention du courant de type A servira à moduler le temps de montée et l'amplitude de celui-ci.

La coexistence des courants calcique de type T et potassique de type A, démontrée lors de cette étude dans les neurones de type I de la région du NMD, existe également dans les neurones appartenant à d'autres régions du cerveau, où leur interaction a été étudiée et discutée. C'est le cas des neurones sensoriels crâniens (Bossu *et al*, 1985), des neurones sérotoninergiques du raphé dorsal (Burhli et Aghajanian, 1987), des neurones de l'habénula latérale (Wilcox *et al*, 1988), des neurones corticaux (Kapoor *et al*, 1988), des neurones de la formation réticulée du tronc cérébral (Gerber *et al*, 1989), des neurones dopaminergiques (Grace et Onn, 1989), des neurones de la substance noire (Harris *et al*, 1989b), des neurones du tronc cérébral (Kang et Kitai, 1990), des neurones cholinergiques du tronc cérébral (Kamondi *et al*, 1992), des neurones thalamiques (McCormick et Huguenard, 1992; Pape *et al*, 1994) et des neurones du tractus solitaire (Tell et Bradley, 1994).

3. Interaction entre le courant de type T et les autres conductances

Des conductances autres que le courant de type A sont reconnues pour interagir avec le courant de type T afin de déterminer la forme et l'amplitude du potentiel dépolarisant lent (Huguenard, 1996). Ces conductances n'ont pas été examinées dans cette étude.

Le potentiel dépolarisant lent peut entraîner l'activation et l'inactivation d'autres conductances dépendant du potentiel ou de l'influx de Ca^{2+} . Parmi ces conductances, la conductance I_H dans les cellules relais thalamiques (McCormick et Pape, 1990; Soltesz *et al*, 1991; McCormick et Huguenard, 1992), une conductance cationique non spécifique dépendant du Ca^{2+} (Bal et McCormick, 1993) et une conductance potassique dépendant du Ca^{2+} (Avanzini *et al*, 1989; Bal et McCormick, 1993) dans les cellules réticulaires thalamiques, permettront de soutenir une activité répétitive de potentiels dépolarisants lents qui confèrera à ces neurones des propriétés

d'oscillateurs. Une activité oscillatoire n'a pas été observée dans les neurones du NMD sauf dans de très rares cas. Au plus, certains neurones aBPA émettent en rebond deux à quatre potentiels dépolarisants lents successifs dont l'amplitude s'atténue progressivement. Une étude complémentaire des autres conductances ioniques présentes dans ces neurones permettrait d'expliquer ce mode de décharge.

4. Conclusion

Les caractéristiques biophysiques et cinétiques comparées des courants de type T et de type A expliquent pourquoi leur interaction est importante pour définir la forme et l'amplitude du potentiel dépolarisant lent observé dans les neurones de type I.

DISCUSSION GÉNÉRALE

Le premier objectif de ce travail était de connaître les propriétés membranaires et le mode de décharge des neurones enképhalinerigiques du NMD. Etant donné l'importance potentielle de l'influence inhibitrice transmise par la voie enképhalinerigique hypothalamo-septale à l'axe hippocampo-hypothalamique, le mode de décharge des neurones du NMD pourra avoir des conséquences fonctionnelles importantes. Si l'on considère que les neurones du NMD constituent eux-mêmes un relais pour des influences provenant de différentes parties du cerveau, représentées par des afférences GABAergiques, catécholaminergiques et somatostatinerigiques identifiées à leur contact (Mitchell *et al*, 1988, Beauvillain *et al*, 1991, Pillez *et al*, 1994), leur mode de décharge régira le transfert de ces influences vers le SLml.

Variabilité des propriétés de décharge des neurones du NMD

Les résultats obtenus en courant-imposé avec la méthode d'enregistrement intracellulaire conventionnelle sur tranche de cerveau ont montré que deux types cellulaires distincts par leur mode de décharge (type I et type II) coexistaient dans le NMD lui-même, mais aussi dans les régions adjacentes au noyau. Cette donnée semble importante lorsqu'il s'agit de relier un profil électrophysiologique à un type de neurone identifié sur des bases neuroanatomiques ou fonctionnelles. Elle indique de toute évidence que les neurones enképhalinerigiques à l'origine de la voie hypothalamo-septale, malgré leur spécialisation neurochimique et leur projection spécifique, n'arborent pas un profil électrophysiologique qui permette de les différencier des neurones (non identifiés) de la région du NMD prise dans son ensemble.

Variabilité des propriétés de décharge des neurones de type I

Les neurones de type I (79.6% de la population enregistrée), présentent des potentiels dépolarisants lents, ce qui les rapproche des neurones à LTS identifiés par d'autres dans différentes préparations de neurones hypothalamiques chez le rat et le cobaye. Il est notable que ces potentiels dépolarisants lents ont une grande diversité de forme et d'amplitude. Ils ont été classés en deux catégories égales selon qu'ils entraînent une décharge en bouffées de potentiels d'action : aBPA ou un potentiel d'action unique : sBPA (Niespodziany et Poulain, 1995).

En première approximation, il pouvait être supposé que les différences observées dans les réponses des neurones de type I étaient dues à des conductances possédant des caractéristiques différentes. Préciser la nature de ces conductances en appliquant la méthode d'enregistrement en

patch-clamp dans la configuration "cellule entière" à la même préparation de tranche épaisse constituait le second objectif du travail.

Il a été montré que les potentiels dépolarisants lents étaient déclenchés par l'activation d'un courant calcique transitoire bas-seuil dont il est suggéré qu'il présente des caractéristiques semblables pour tous les neurones de type I. Seule une différence d'amplitude dans les courants, qui pourrait être reliée aux différences d'amplitude observées dans les potentiels dépolarisants lents des deux catégories de neurones de type I, a été notée. Cette différence d'amplitude est vraisemblablement un des facteurs qui peut expliquer le mode de décharge différent des deux catégories des neurones de type I.

Les enregistrements en courant-imposé avaient permis de déceler un mécanisme d'interaction entre deux conductances de sens opposé, l'une à l'origine du potentiel dépolarisant lent, l'autre à l'origine d'une rectification membranaire qui tendait à moduler la forme et l'amplitude du potentiel dépolarisant. L'étude en potentiel-imposé des conductances I_T et I_A , responsables respectivement de ces deux événements, a mis l'accent sur cette interaction et a suggéré qu'elle pouvait déterminer, d'un neurone à l'autre, les caractéristiques particulières du potentiel dépolarisant lent. La localisation spatiale de ces deux conductances et leurs amplitudes respectives sont des facteurs importants qui retentiront sur l'excitabilité du neurone. L'hypothèse pourrait être émise que la distinction entre les deux catégories de neurones de type I puisse reposer sur l'importance relative de leurs conductances I_T et I_A . Il ne semble pas que la balance entre les deux courants soit suffisante pour expliquer à elle seule les modes de décharge que présentent ces deux catégories de neurones.

Un troisième facteur essentiel pour déterminer le mode de décharge est l'amplitude de la post-hyperpolarisation, qui diffère significativement dans les deux catégories de neurones et qui est capable, dans l'une de ces catégories, de repolariser abruptement le potentiel dépolarisant lent après l'émission d'un seul potentiel d'action. L'étude en potentiel-imposé des conductances à l'origine de la post-hyperpolarisation pourrait amener des conclusions définitives sur les différences de mode de décharge que présentent les neurones de type I.

Caractéristiques de la conductance I_T

L'étude comparée des propriétés de la conductance I_T dans le système nerveux central a fait très récemment l'objet d'une revue (Huguenard, 1996). Toutefois, il s'avère que cette revue ne prend pas en compte les neurones hypothalamiques, dont les données concernant la conductance I_T restaient très fragmentaires. Pourtant l'importance de cette conductance dans les

différents noyaux de l'hypothalamus est reconnue et se traduit par l'abondance des neurones à LTS qui y sont enregistrés. L'examen approfondi en potentiel-imposé de la conductance I_T dans les neurones du NMD fournit donc un éclairage sur les propriétés du courant calcique bas seuil dans les neurones hypothalamiques. Les résultats montrent que la préparation utilisée peut conduire à une analyse précise de ces propriétés. Ils montrent une bonne corrélation avec ceux obtenus sur neurones isolés (Akaike, 1991), qui constituaient l'essentiel des données que nous possédions sur les courants calciques de type T dans l'hypothalamus. Cela n'exclut pas qu'une étude complémentaire sur neurones dissociés du NMD puisse être envisagée pour parfaire l'analyse biophysique et cinétique. L'étude pharmacologique du courant I_T a révélé une homogénéité dans les propriétés des neurones. Le courant est sensible à l'amiloride et à l'octanol. Il n'est que très peu sensible au Mibefradil, nouvel antagoniste puissant des conductances I_T dans des préparations non neuronales. Il est résistant à la flunarizine et à la nifédipine, ce qui réfute la généralisation d'une sensibilité particulière des neurones hypothalamiques à ces deux substances (Akaike, 1991).

Caractéristiques de la conductance I_A

Tous les neurones de la région du NMD présentent une conductance potassique transitoire dont nos expériences démontrent qu'elle s'apparente au courant I_A , d'après les résultats de l'examen biophysique, cinétique et pharmacologique. Il vient d'être évoqué les conséquences de la mise en jeu de cette conductance pour les potentiels dépolarisants lents exprimés par les neurones de type I.

La conductance I_A caractérise les neurones de type II, qui représentent 20.4% de la population enregistrée.

Notre étude démontre que les neurones de type I et de type II possèdent des formes différentes de conductance I_A , se traduisant par des différences dans la cinétique d'activation et d'inactivation du courant. L'examen comparatif des propriétés pharmacologiques de la conductance I_A reste incomplet étant donné le nombre réduit de neurones de type II. Dans les neurones de type I, la conductance présente une sensibilité au baryum extracellulaire qui n'a jamais été décrite pour des courants ayant des caractéristiques semblables à celles des neurones du NMD.

Signification des conductances I_T et I_A pour le transfert de l'information

De la configuration de décharge du neurone dépend le degré de fidélité avec lequel

l'information provenant de différentes parties du cerveau et intégrée au niveau du NMD parviendra au SLml. Nos résultats suggèrent que cette information sera transmise de manière différente selon les propriétés intrinsèques des neurones.

Conductance I_T

Les propriétés intrinsèques seront particulièrement déterminantes pour la configuration de décharge des **neurones de type I**, pour laquelle deux situations qui dépendent de l'activation de la conductance I_T ont été mises en lumière : une décharge tonique au PR et une décharge déclenchée par les potentiels dépolarisants lents lorsque la membrane est hyperpolarisée. A un mode de transfert "linéaire", assurant un relais fidèle de l'information lorsque la membrane est au PR, s'opposera pour ces neurones un mode de transfert beaucoup plus complexe en condition hyperpolarisée, car il utilisera un codage qui sera déterminé, premièrement, par la fréquence d'apparition des potentiels dépolarisants lents, avec un facteur limitant qui est le temps nécessaire pour la dé-inactivation de la conductance I_T (~100ms) et, deuxièmement, par le type de décharge déclenché par le potentiel dépolarisant lent : bouffée de potentiels d'action ou potentiel d'action unique. A l'exemple des mécanismes qui déterminent la libération des neurohormones dans plusieurs systèmes neuroendocrines, cette libération étant facilitée par un mode de décharge phasique (Dutton et Dyball, 1979), il serait tentant de considérer que la décharge en bouffées de potentiels d'action aurait une influence positive sur la libération des enképhalines dans le SLml. Rien ne permet d'étayer cette hypothèse pour le moment.

A coté de son rôle dans le codage de l'information en sortie du neurone, le potentiel dépolarisant lent, par l'influx de Ca^{2+} qu'il entraîne au travers des canaux de type T, pourrait également intervenir sur l'efficacité de l'information parvenant au neurone. En effet, l'augmentation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} peut avoir des conséquences sur le métabolisme du neurone, qui se traduira par une modulation des récepteurs et des canaux ioniques membranaires et en conséquence par une modification de l'efficacité synaptique en entrée du neurone.

Conductance I_A

Pour les **neurones de type II**, en considérant ses caractéristiques biophysiques et cinétiques, la conductance I_A servira à ralentir le début de la décharge lors d'une dépolarisation de la membrane, à augmenter l'intervalle entre les potentiels d'action au cours d'une décharge répétitive et à prolonger les post-hyperpolarisations (Storm, 1990). En plus de son rôle dans le

codage de l'information en sortie du neurone, la conductance I_A , en modifiant les potentiels post-synaptiques excitateurs (Cassel et McLachlan, 1986; Hsiao et Chandler, 1995), influencera les possibilités d'intégration du neurone quant aux informations excitatrices qui lui parviennent.

Pour les **neurones de type I**, la conductance I_A remplira les mêmes rôles lorsque la membrane est au PR. Lorsque la membrane est hyperpolarisée, la conductance I_A pourra intervenir dans le transfert de l'information en réduisant l'amplitude du potentiel dépolarisant lent, ce qui pourra se traduire par le déclenchement d'un nombre plus limité de potentiels d'action à leur sommet.

Intégration synaptique

En raison de la dépendance au potentiel de la conductance I_T , l'ajustement de la valeur du potentiel membranaire par les afférences que reçoit le neurone sera l'élément décisif du contrôle de la configuration de décharge du neurone de type I.

D'après les observations réalisées au laboratoire, les innervations GABAergique, catécholaminergique et somatostatinerigique semblent constituer l'essentiel des afférences que reçoit le neurone du NMD. L'action post-synaptique des neuromédiateurs, en contrôlant le niveau du potentiel membranaire s'exprimera sur les propriétés de dé-inactivation, d'inactivation et d'activation de la conductance I_T .

D'après nos mesures, le PR moyen des neurones du NMD étant de -55mV, une hyperpolarisation d'au moins 10mV est nécessaire pour la *dé-inactivation* de la conductance. Le neuromédiateur inhibiteur capable de provoquer ce processus devra agir suffisamment longtemps pour atteindre les 100ms nécessaires à la dé-inactivation. Des trains de potentiels post-synaptiques inhibiteurs GABAergiques pourront efficacement remplir ce rôle (Stéride et Deschênes, 1985), de même que la somatostatine, dont l'effet post-synaptique le plus fréquemment rapporté consiste en une hyperpolarisation membranaire de longue durée (revue dans Schweitzer *et al*, 1993). En ce qui concerne la possibilité d'une dé-inactivation de I_T par le GABA, il faut signaler que les récepteurs présents sur les neurones du NMD sont exclusivement de type A (Carette *et al*, 1990). De ce fait, la membrane ne pourra pas être hyperpolarisée en dessous du potentiel d'équilibre des ions Cl^- c'est-à-dire -60 à -75 mV. Cela semble néanmoins compatible avec la valeur moyenne de -65 mV nécessaire à la dé-inactivation de la conductance.

A l'exemple de la situation observée pour les neurones thalamiques (McCormick et Prince, 1988), un influx tonique excitateur provoqué par une synapse noradrénergique agissant par des récepteurs α_1 pourrait maintenir un niveau dépolarisé amenant l'*inactivation* de la

conductance I_T . Des expériences préliminaires ont montré que l'application d'artérol et de L-phényléphrine produisant une dépolarisation des neurones du NMD incompatible avec la production de potentiels dépolarisants lents. Ces exemples montrent que l'ajustement du potentiel de membrane duquel dépendra la configuration de décharge du neurone doit répondre à une interaction extrêmement complexe des influences excitatrices et inhibitrices reçues par le neurone. A ce sujet, il faut noter qu'une interaction de la synapse GABAergique et de la synapse somatostatinerigique est hautement probable car le peptide a le pouvoir de modifier la transmission GABAergique en agissant au niveau pré-synaptique (Sharfman et Schwartzkroin, 1989) ou post-synaptique (Twery et Gallagher, 1990).

L'*activation* de la conductance I_T enfin pourra être assurée efficacement par des potentiels post-synaptiques excitateurs (Jahnsen et Llinás, 1984b), comme ceux produits par la mise en jeu des récepteurs noradrénergiques α_1 . L'activation pourra également survenir en rebond après un potentiel post-synaptique inhibiteur GABAergique (Thomson, 1988).

Si le contrôle synaptique réalisé par les afférences au neurone s'adresse directement à la conductance I_T , les potentiels dépolarisants lents peuvent être contrôlés *indépendamment* de la valeur du potentiel de membrane. Peu de données sont disponibles concernant l'action des neuromédiateurs sur la conductance I_T . Toutefois, une action de la noradrénaline a été signalée (Crépel *et al*, 1987). De plus, la somatostatine, dont l'action s'adresse plus particulièrement aux conductances calciques haut-seuil dans les cellules hypophysaires (Chen *et al*, 1990) et dans les cellules nerveuses (revue dans Meriney *et al*, 1994), s'avère exercer également un puissant effet sur le seuil de déclenchement du LTS dans le thalamus (Raï et Llinás, 1994).

Pour les neurones de type II, l'hyperpolarisation produite par le GABA et la somatostatine peut servir à dé-inactiver davantage la conductance I_A , déjà faiblement dé-inactivée au PR, et en conséquence à produire un délai dans la réponse à un influx excitateur, comme celui provoqué par les afférences noradrénergiques.

Contrairement aux canaux calciques de type T, les canaux potassiques sont connus pour être la cible de l'action de nombreux neuromédiateurs (Rudy, 1988). Dans le cas du NMD, la noradrénaline pourrait modifier les propriétés de la conductance I_A , à l'exemple des observations d'Aghajanian (1985) dans les neurones du tronc cérébral et d'Akopian et Witkovsky (1994) dans les cellules horizontales de la rétine. Ce contrôle synaptique de la conductance I_A prend toute son importance pour les neurones de type I car il constitue un élément supplémentaire de régulation de la balance entre les conductances I_A et I_T , qui détermine la forme et l'amplitude du potentiel dépolarisant lent.

Enfin, le contrôle synaptique peut également s'appliquer à l'amplitude de la post-hyperpolarisation qui suit le potentiel d'action. Celle-ci peut être prolongée par la somatostatine (Olpe *et al*, 1987) et réduite par la noradrénaline (McCormick et Prince, 1988). Dans les neurones de type I, l'action de ces neuromédiateurs pourrait être importante pour déterminer le type de réponse (aBPA ou sBPA) déclenché par le potentiel dépolarisant lent.

Conclusion

La mise en évidence des propriétés membranaires des neurones du NMD est une étape importante avant d'envisager une étude approfondie du contrôle exercé par les neuromédiateurs sur le relais hypothalamo-septal assuré par les neurones enképhalinergiques du NMD. La technique de *patch-clamp* en configuration "cellule entière" est un outil approprié pour de telles études. Elle permettra de juger de l'action des neuromédiateurs sur les différents paramètres des conductances isolées par des protocoles appropriés, qu'il s'agisse des conductances analysées dans cette étude ou d'autres conductances dont l'étude pourra être envisagée. La technique permettra également d'étudier les différentes étapes de la transcription du signal synaptique, en utilisant les possibilités de dialyse intracellulaire de molécules pouvant intervenir dans les différentes étapes de cette transcription. Parallèlement à une étude du contrôle de la voie enképhalinergique hypothalamo-septale, la préparation choisie et la méthode d'enregistrement développée dans cette étude pourront être utilisées pour des recherches complémentaires sur la conductance I_T . L'importance de cette conductance dans les processus d'électrogénèse et de rythmogénèse et dans les processus métaboliques liés aux flux entrants de Ca^{2+} , ces derniers pouvant entraîner des phénomènes cytotoxiques, permettent d'envisager des recherches pharmacologiques sur des molécules qui présentent un intérêt thérapeutique.

BIBLIOGRAPHIE

- Adrian R. H.** (1969) Rectification in muscle membrane. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 19 : 340-369.
- Aghajanian G. K.** (1985) Modulation of a transient outward current in serotonergic neurons by α 1-adrenoreceptors. *Nature* 315 : 501-503.
- Ahlijanian M. K., Westernbroek R. E., Catterall W. A.** (1990) Subunit structure and localization of dihydropyridine-sensitive calcium channels in mammalian brain, spinal cord, and retina. *Neuron* 4 : 819-832.
- Aitken P. G., Breese G. R., Dudek F. F., Edwards F., Espanol M. T., Larkman P. M., Lipton P., Newman G. C., Nowak T. S. Jr., Panizzon K. L., Raley-Susman K. M., Reid M. E., Rice M. E., Sarvey J. M., Schoepp D. D., Segal M., Taylor C. P., Teyler T. J., Voulalas P. J.** (1995) Preparative methods for brain slices: a discussion. *J. Neurosci. Met.* 59 : 139-149.
- Akaike N.** (1991) T-type calcium channel in mammalian CNS neurons. *Comp. Biochem. Physiol.* 98C : 31-40.
- Akaike N., Ishibashi H., Hara H., Oyama Y., Ueha T.** (1993) Effect of KB-2796, a new diphenylpiperazine Ca^{2+} antagonist, on voltage-dependent Ca^{2+} currents and oxidative metabolism in dissociated mammalian CNS neurons. *Brain Res.* 619 : 263-270.
- Akaike N., Kostyuk P. G., Osipchuk Y. V.** (1989) Dihydropyridine-sensitive low-threshold calcium channels in isolated rat hypothalamic neurones. *J. Physiol. (London)* 412 : 181-195.
- Akaike N., Takahashi K.** (1992) Tetrodotoxin-sensitive calcium-conducting channels in the rat hippocampal CA1 region. *J. Physiol. (London)* 450 : 529-546.
- Akasu T., Shoji S., Hasuo H.** (1993) Inward rectifier and low-threshold calcium currents contribute to the spontaneous firing mechanism in neurones of the rat suprachiasmatic nucleus. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 425 : 109-116.
- Allen T. G. J., Sim J. A., Brown D. A.** (1993) The whole-cell calcium current in acutely dissociated magnocellular basal forebrain neurones of the rat. *J. Physiol. (London)* 460 : 91-116.
- Alonso A., Llinás R. R.** (1992) Electrophysiology of the mammillary complex *in vitro*. II. Medial mammillary neurons. *J. Neurophysiol.* 68 : 1321-1331.
- Alreja M., Aghajanian G. K.** (1995) Use of the whole-cell patch-clamp method in studies on the role of cAMP in regulating the spontaneous firing of locus coeruleus neurons. *J. Neurosci. Met.* 59 : 67-75.
- Alvarez de Toledo G., López-Barneo J.** (1988) Ionic basis of the differential neuronal activity of guinea-pig septal nucleus studied *in vitro*. *J. Physiol. (London)* 396 : 399-415.
- Andersen P., Eccles J. C., Sears T. A.** (1964) The ventro-basal complex of the thalamus: types of cells, their responses and their functional organization. *J. Physiol. (London)* 174 : 370-399.
- Andreasen M., Hablitz J. J.** (1992) Kinetic properties of a transient outward current in rat neocortical neurons. *J. Neurophysiol.* 68 : 1133-1142.
- Armstrong D., Eckert R.** (1985) Phosphorylating agents prevent washout of unitary calcium currents in excised membrane patches. *J. Gen. Physiol.* 86 : 25a.
- Armstrong D., Eckert R.** (1987) Voltage-activated calcium channels that must be phosphorylated to respond to membrane depolarization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84 : 2518-2522.
- Armstrong C. M., Gilly W. F.** (1992) Access resistance and space clamp problems associated with whole-cell patch clamping. *Methods in Enzymology* 207 : 100-122.
- Aronson P. S.** (1985) Kinetic properties of the plasma membrane Na^+ - H^+ exchanger. *Annu. Rev. Physiol.* 47 : 545-560.

- Astarloa R., Gila L., Gobernado J. M.** (1989) Cluster headache and intercalated seizures in young man: therapeutic effectiveness of flunarizine. *Headache* 29 : 377-378.
- Avanzini G., De Curtis M., Panzica F., Spreafico R.** (1989) Intrinsic properties of nucleus reticularis thalami neurones of the rat studied *in vitro*. *J. Physiol. (London)* 416 : 111-122.
- Bal T., McCormick D. A.** (1993) Mechanisms of oscillatory activity in guinea-pig nucleus reticularis thalami *in vitro*: a mammalian pacemaker. *J. Physiol. (London)* 468 : 669-691.
- Bardoni R., Belluzi O.** (1994) Modifications of A-current kinetics in mammalian central neurones induced by extracellular zinc. *J. Physiol. (London)* 479 : 389-400.
- Barry P. H.** (1994) JPCalc, a software package for calculating liquid junction potential corrections in patch-clamp, intracellular, epithelial and bilayer measurements and for correcting junction potential measurements. *J. Neurosci. Met.* 5 : 107-116.
- Barry P. H., Lynch J. W.** (1991) Topical Review. Liquid junction potentials and small cell effects in patch-clamp analysis. *J. Memb. Biol.* 121 : 101-117.
- Bean B. P.** (1989) Neurotransmitter inhibition of neuronal calcium currents by changes in channel voltage dependence. *Nature* 340 : 153-156.
- Beauvillain J.-C., Mitchell V., Tramu G., Mazzuca M.** (1991) GABA and enkephalin in the lateral septum of the guinea pig: light and microscopic evidence for interrelation. *J. Comp. Neurol.* 308 : 103-114.
- Beauvillain J.-C., Poulain P., Tramu G.** (1983) Immunocytochemical localization of enkephalin in the lateral septum of the guinea pig brain. A light- and electron microscopic study. *Cell Tissue Res.* 228 : 265-276.
- Beauvillain J.-C., Tramu G., Poulain P.** (1982) Enkephalin-immunoreactive neurons in the guinea pig hypothalamus. An ultrastructural study. *Cell Tissue Res.* 224 : 1-13.
- Berger A. J., Takahashi T.** (1990) Serotonin enhances a low-voltage-activated calcium current in rat spinal motoneurons. *J. Neurosci.* 10 : 1922-1928.
- Bertolino M., Llinàs R. R.** (1992) The central role of voltage-activated and receptor-operated calcium channels in neuronal cells. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32 : 399-421.
- Bertollini L., Biella G., Wanke E., Avanzini G., de Curtis M.** (1994) Fluoride reversibly blocks HVA calcium current in mammalian thalamic neurones. *Neuroreport* 5 : 553-556.
- Birnbaumer L., Campbell K. P., Catterall W. A., Harpold M. M., Hofmann F., Horne W. A., Mori Y., Schwartz A., Snutch T. P., Tanabe T., Tsien R. W.** (1994) The naming of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 13 : 505-506.
- Blanton M. G., Lo Turco J. J., Kriegstein A. R.** (1989) Whole cell recording from neurons in slices of reptilian and mammalian cerebral cortex. *J. Neurosci. Met.* 30 : 203-210.
- Bleier R.** (1983) *The Hypothalamus of the Guinea Pig. A Cytoarchitectonic Atlas*. University of Wisconsin Press, Madison, WI.
- Boll W., Lux H. D.** (1985) Action of organic antagonists on neuronal calcium currents. *Neurosci. Lett.* 56 : 335-339.
- Bossu J.-L., Dupont J.-L., Feltz A.** (1985) IA current compared to low threshold calcium current in cranial sensory neurones. *Neurosci. Lett.* 62 : 249-254.
- Bossu J.-L., Feltz A.** (1986) Inactivation of the low-threshold transient calcium current in rat sensory neurones: evidence for a dual process. *J. Physiol. (London)* 376 : 341-357.

- Bourque C. W.** (1988) Transient calcium-dependent potassium current in magnocellular neurosecretory cells of the rat supraoptic nucleus. *J. Physiol. (London)* 397 : 331-347.
- Brooks P. A., Glaum S. R., Miller R. J., Spyer K. M.** (1992) The action of baclofen on neurones and synaptic transmission in the nucleus tractus solitarii of the rat *in vitro*. *J. Physiol. (London)* 457 : 115-129.
- Brown K. T., Flaming D. G.** (1986) Advanced micropipette techniques for cell physiology. In IBRO Handbook series : *Methods in the neurosciences*. vol.9.
- Burlhis T. M., Aghajanian G. K.** (1987) Pacemaker potentials of serotonergic dorsal raphe neurons: contribution of a low-threshold Ca^{2+} conductance. *Synapse* 1 : 582-588.
- Büsselberg D., Michael D., Evans M. L., Carpenter D. O., Haas H. L.** (1992) Zinc (Zn^{2+}) blocks voltage gated calcium channels in cultured rat dorsal root ganglion cells. *Brain Res.* 593 : 77-81.
- Büsselberg D., Platt B., Michael D., Carpenter D. O., Haas H. L.** (1994) Mammalian voltage-activated calcium channel currents are blocked by Pb^{2+} , Zn^{2+} , and Al^{3+} . *J. Neurophysiol.* 71 : 1491-1497.
- Busto R., Dietrich W. D., Globus M. Y., Ginsberg M. D.** (1989) The importance of brain temperature in cerebral ischemic injury. *Stroke* 20 : 1113-1114.
- Carbone E., Lux H. D.** (1984a) A low voltage-activated calcium conductance in embryonic chick sensory neurons. *Biophys. J.* 46 : 413-418.
- Carbone E., Lux H. D.** (1984b) A low voltage-activated, fully inactivating Ca channel in vertebrate sensory neurones. *Nature* 310 : 501-502.
- Carbone E., Lux H. D.** (1987a) Kinetics and selectivity of a low-voltage-activated calcium current in chick and rat sensory neurones. *J. Physiol. (London)* 386 : 547-570.
- Carbone E., Lux H. D.** (1987b) Single low-voltage-activated calcium channels in chick and rat sensory neurones. *J. Physiol. (London)* 386 : 571-601.
- Carette B., Poulain P.** (1982) Postsynaptic inhibitory effects of Met- and Leu-enkephalin on endocrine and adjacent neurons in the preoptic-septal region of guinea pig. *Reg. Peptides* 3 : 125-133.
- Carette B., Poulain P., Doutrelant O.** (1990) Le GABA agit par des récepteurs GABA_A sur les neurones du noyau magnocellulaire dorsal hypothalamique du cobaye : étude intracellulaire *in vitro*. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* 310 : 645-650.
- Cassel J. F., McLachlan E. M.** (1986) The effect of a transient outward current (I_A) on synaptic potentials in sympathetic ganglion cells of the guinea pig. *J. Physiol. (London)* 374 : 273-288.
- Castellano A., López-Barneo J.** (1991) Sodium and calcium currents in dispersed mammalian septal neurons. *J. Gen. Physiol.* 97 : 303-320.
- Catterall W. A.** (1993) Structure and function of voltage-gated ion channels. *Trends Neurosci.* 16 : 500-506.
- Catterall W. A., Seagar M. J., Takahashi M.** (1988) Molecular properties of dihydropyridine-sensitive calcium channels in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 263 : 3533-3538.
- Chen C., Zhang J., Vincent J.-D., Israel J.-M.** (1990) Two types of voltage-dependent calcium current in rat somatotrophs are reduced by somatostatin. *J. Physiol. (London)* 425 : 29-42.
- Chen Q. X., Wong R. K. S.** (1992) Different effects of intracellular and extracellular TEA on voltage-dependent K^+ currents of acutely isolated hippocampal CA1 neurons. *Brain Res.* 582 : 232-236.
- Collingridge G. L.** (1995) The brain slice preparation: a tribute to the pioneer Henry McIlwain. *J. Neurosci. Met.* 59 : 5-9.

- Connor J. A., Stevens C. F.** (1971) Voltage clamp studies of a transient outward membrane current in gastropod neural somata. *J. Physiol. (London)* 213 : 21-30.
- Connors B. W., Gutnick M. J.** (1990) Intrinsic firing patterns of diverse neocortical neurons. *Trends Neurosci.* 13 : 99-104.
- Coulter D. A., Huguenard J. R., Prince D.A.** (1989) Calcium currents in rat hypothalamocortical relay neurones: kinetic properties of the transient, low-threshold current. *J. Physiol. (London)* 414 : 587-604.
- Crepel F., Debono N. W., Flores R.** (1987) Alpha-adrenergic inhibition of rat cerebellar Purkinje cells *in vitro*: a voltage-clamp study. *J. Physiol. (London)* 383 : 487-498.
- Crepel F., Penit-Soria J.** (1986) Inward rectification and low-threshold calcium conductance in rat cerebellar purkinje cells. An *in vitro* study. *J. Physiol. (London)* 372 : 1-23.
- Crunelli V., Lightowler S., Pollard C. E.** (1989) A T-type Ca^{2+} current underlies low-threshold Ca^{2+} potentials in cells of the cat and rat lateral geniculate nucleus. *J. Physiol. (London)* 413 : 543-561.
- Desarménien M. G., Devic E., Rage F., Dayanithi G., Tapia-Arancibia L., Richard P.** (1994) Synchronous development of spontaneous and evoked calcium-dependent properties in hypothalamic neurons. *Dev. Brain Res.* 79 : 85-92.
- Dillon G. H., Waldrop T. G.** (1992) *In vitro* responses of caudal hypothalamic neurons to hypoxia and hypercapnia. *Neuroscience* 51 : 941-950.
- Doutrelant O., Martin-Bouyer L., Poulain P.** (1992) Morphological analysis of the neurons in the area of the hypothalamic magnocellular dorsal nucleus of the guinea pig. *Cell Tissue Res.* 269 : 107-117.
- Ducieux C., Puizillout J. J.** (1995) A-current modifies the spike of C-type neurones in the rabbit nodose ganglion. *J. Physiol. (London)* 486 : 439-451.
- Dutton A., Dyball R. E. J.** (1979) Phasic firing enhances vasopressin release from the rat neurohypophysis. *J. Physiol. (London)* 290 : 433-440.
- Eder C., Heinemann U.** (1994) Current density analysis of outward currents in acutely isolated rat entorhinal cortex cells. *Neurosci. Lett.* 174 : 58-60.
- Edwards F. A.** (1995) Patch-clamping in brain slices: synaptic transmission from ATP to long-term potentiation. *J. Neurosci. Met.* 59 : 59-95.
- Edwards F. A., Konnerth A., Sakmann B., Takahashi T.** (1989) A thin slice preparation for patch clamp recordings from neurones in the mammalian central nervous system. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 414 : 600-612.
- Endo Y., Jinna K., Kimura F.** (1990) The roles of endogenous opioids in the inhibitory action of the hippocampus on preovulatory secretion of luteinizing hormone in rats. *Endocrinol. Japan* 37 : 535-543.
- Epelbaum J., Dournaud P., Fodor M., Viollet C.** (1994) The neurobiology of somatostatin. *Crit. Rev. Neurobiol.* 8 : 25-44.
- Erdryi L., Such G.Y.** (1988) The A-type potassium current: catechol-induced blockage in snail neurons. *Neurosci. Lett.* 92 : 46-51.
- Erickson K. R., Ronnekleiv O. K., Kelly M. J.** (1993) Role of a T-type calcium current in supporting a depolarizing potential, damped oscillations, and phasic firing in vasopressinergic guinea pig supraoptic neurons. *Neuroendocrinol.* 57 : 789-800.
- Fedulova S. A., Kostyuk P. G., Veselovsky N. S.** (1985) Two types of calcium channels in the somatic membrane of newborn rat dorsal root ganglion neurones. *J. Physiol. (London)* 359 : 431-446.

- Feltz A.** (1986) Multiplicité des perméabilités calciques. *J. Physiol. (Paris)* 81 : 162-167.
- Finkel A. S., Redman S.** (1984) Theory and operation of a single microelectrode voltage clamp. *J. Neurosci. Met.* 11 : 101-127.
- Finley J. C. W., Maderdrut J. L., Petrusz P.** (1981) The immunocytochemical localization of enkephalin in the central nervous system of the rat. *J. Comp. Neurol.* 198 : 541-565.
- Fisher T. E., Bourque C. W.** (1995) Voltage-gated calcium currents in the magnocellular neurosecretory cells of the rat supraoptic nucleus. *J. Physiol. (London)* 486 : 571-580.
- Formenti A., Arrigoni E., Mancina M.** (1993) Low-voltage activated calcium channels are differently affected by nimodipine. *NeuroReport* 5 : 145-147.
- Forscher P., Oxford G. S.** (1985) Modulation of calcium channels by norepinephrine in internally dialyzed avian sensory neurons. *J. Gen. Physiol.* 85 : 743-763.
- Forti L., Tottene A., Moretti A., Pietrobon D.** (1994) Three novel types of voltage-dependent calcium channels in rat cerebellar neurons. *J. Neurosci.* 14 : 5243-5256.
- Fox A. P., Nowycky M. C., Tsien R. W.** (1987a) Kinetic and pharmacological properties distinguishing three types of calcium currents in chick sensory neurones. *J. Physiol. (London)* 394 : 149-172.
- Fox A. P., Nowycky M. C., Tsien R. W.** (1987b) Single-channel recordings of three types of calcium channels in chick sensory neurons. *J. Physiol. (London)* 394 : 173-200.
- Fraser D. D., MacVicar B. A.** (1991) Low-threshold transient calcium current in rat hippocampal lacunosum-moleculare interneurons: kinetics and modulation by neurotransmitters. *J. Neurosci.* 11 : 2812-2820.
- Gähwiler B. H.** (1981) Organotypic monolayer cultures of nervous tissue. *J. Neurosci. Met.* 4 : 329-342.
- Gerber U., Greene R. W., McCarley R. W.** (1989) Repetitive firing properties of medial pontine reticular formation neurones of the rat recorded *in vitro*. *J. Physiol. (London)* 410 : 533-560.
- Gerhard L.** (1966) *Atlas des Mittel- und Zwischenhirns des Kaninchens*. Springer Ed. Berlin, Göttingen, Heidelberg.
- Gola M., Niel J. P.** (1993) Electrical and integrative properties of rabbit sympathetic neurones re-evaluated by patch clamping non-dissociated cells. *J. Physiol. (London)* 460 : 327-349.
- Grace A. A., Onn S.-P.** (1989) Morphological and electrophysiological properties of immunocytochemically identified rat dopamine neurons recorded *in vitro*. *J. Neurosci.* 9 : 3463-3481.
- Greene R. W., Haas H. L., Reiner P. B.** (1990) Two transient outward currents in histamine neurones of the rat hypothalamus *in vitro*. *J. Physiol. (London)* 420 : 149-163.
- Griffith W. H., Taylor L., Davis M. J.** (1994) Whole-cell and single-channel calcium currents in guinea-pig basal forebrain neurons. *J. Neurophysiol.* 71 : 2359-2376.
- Gustafsson B., Galvan M., Grafe P., Wigström H.** (1982) A transient outward current in a mammalian central neurone blocked by 4-aminopyridine. *Nature* 299 : 252-254.
- Gutnick M. J., Yarom Y.** (1989) Low threshold calcium spikes, intrinsic neuronal oscillation and rhythm generation in the CNS. *J. Neurosci. Met.* 28 : 93-99.
- Guyon A., Vergnes M., Leresche N.** (1993) Thalamic low threshold calcium current in a genetic model of absence epilepsy. *NeuroReport* 4 : 1231-1234.
- Haas H. H., Reiner P. B.** (1988) Membrane properties of histaminergic tuberomammillary neurones of the rat hypothalamus *in vitro*. *J. Physiol. (London)* 399 : 633-646.

- Hagiwara S., Kusano K., Saito N.** (1961) Membrane changes in *Onchidium* nerve cell in potassium-rich media. *J. Physiol. (London)* 155 : 470-489.
- Halliwell J. V., Adams P. R.** (1982) Voltage clamp analysis of muscarinic excitation in hippocampal neurons. *Brain Res.* 250 : 71-92.
- Hamill O. P., Marty A., Neher E., Sakmann B., Sigworth F.** (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resistance recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* 391 : 85-100.
- Hammond C., Tritsch D.** (1990) *Neurobiologie cellulaire* Doin (eds) pp 321-327 et 618-619.
- Harris N. C.** (1992) Sensitivity of transient outward rectification to ion channel blocking agents in guinea-pig substantia nigra pars compacta neurones *in vitro*. *Brain Res.* 596 : 325-329.
- Harris N. C., Ramsay S., Kelion A., Greenfield S. A.** (1989a) Electrophysiological evidence for a dendritic localization of a calcium conductance in guinea pig substantia nigra neurons *in vitro*. *Exp. Brain Res.* 74 : 411-416.
- Harris N. C., Webb C., Greenfield S. A.** (1989b) A possible pacemaker mechanism in pars compacta neurons of the guinea-pig substantia nigra revealed by various ion channel blocking agents. *Neuroscience* 31 : 355-362.
- Harrison N. L., Radke H. K., Talukder G., Ffrench-Mullen J. M. H.** (1993) Zinc modulates transient outward current current gating in hippocampal neurons. *Receptors and Channels* 1 : 153-163.
- Harvey A. L., Karlsson E.** (1980) Dendrotoxin from venom of green mamba *Dendroaspis angusticeps*. A neurotoxin that enhances acetylcholine release at neuromuscular junctions. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 312 : 1-6.
- Henderson D., Dryer S. E.** (1992) Voltage- and Ca^{2+} -activated ionic currents in acutely dissociated cells of the chick pineal gland. *Brain Res.* 572 : 182-189.
- Hermesmeyer K.** (1991) Differences of calcium channels in vascular muscle in hypertension. *Am. J. Hypertens.* 4 : 412S-415S.
- Herrington J., Lingle C.J.** (1992) Kinetic and pharmacological properties of low voltage-activated Ca^{2+} current in rat clonal (GH3) pituitary cells. *J. Neurophysiol.* 68 : 213-232.
- Higashi H., Sugita S., Matsunari S., Nishi S.** (1990) Calcium-dependent potentials with different sensitivities to calcium agonists and antagonists in guinea-pig hippocampal neurons. *Neuroscience* 34 : 35-47.
- Higashima M., Kinoshita H., Yamaguchi N., Koshino Y.** (1996) Activation of GABAergic function necessary for afterdischarge generation in rat hippocampal slices. *Neurosci. Lett.* 207 : 101-104.
- Hillman D., Chen S., Aung T. T., Cherskey B., Sugimori M., Llinás R.** (1991) Localization of P-type Ca^{2+} channels in the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88 : 7076-7080.
- Hirning L. D., Fox A. P., McCleskey E. W., Olivera B. M., Thayer S. A., et al** (1988) Dominant role of N-type Ca^{2+} channels in evoked release of norepinephrine from sympathetic neurons. *Science* 239 : 57-61.
- Hodgkin A. L., Huxley A. F.** (1952a) The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol. (London)* 116 : 473-496.
- Hodgkin A. L., Huxley A. F.** (1952b) A quantitative description of membrane currents and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol. (London)* 117 : 500-544.
- Hoffman N. W., Kim Y. I., Gorski R. A., Dudek F. E.** (1994) Homogeneity of intracellular electrophysiological properties in different neuronal subtypes in medial preoptic slices containing the sexually dimorphic nucleus of the rat. *J. Comp. Neurol.* 345 : 396-408.

- Hofmann F., Biel M., Flockerzi V.** (1994) Molecular basis for Ca²⁺ channel diversity. *Annu. Rev. Neurosci.* 17 : 399-418.
- Hökfelt T., Elde R., Johansson O., Terenius L., Stein L.** (1977) The distribution of enkephalin-immunoreactive cell bodies in the rat central nervous system. *Neurosci. Lett.* 5 : 25-31.
- Holohean A. M., Rodriguez C. A., Hackman J. C., Davidoff R. A.** (1996) Voltage-gated calcium currents in whole-cell patch-clamped bullfrog dorsal root ganglion cells: effects of cell size and intracellular solutions. *Brain Res.* 711 : 138-145.
- Horikawa K., Armstrong W. E.** (1988) A versatile mean of intracellular labeling: injection of biocytin and its detection with avidin conjugates. *J. Neurosci. Met.* 25 : 1-11.
- Horn R., Marty A.** (1988) Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method. *J. Gen. Physiol.* 92 : 145-159.
- Houngaard J., Nedergaard S., Greenfield S. A.** (1992) Electrophysiological localization of distinct calcium potentials at selective somatodendritic sites in the substantia nigra. *Neuroscience* 50 : 513-518.
- Hsiao C., Chandler S. H.** (1995) Characteristics of a fast transient outward current in guinea pig trigeminal motoneurons. *Brain Res.* 695 : 217-226.
- Huang L.-Y. M.** (1989) Calcium channels in isolated rat dorsal horn neurones, including labelled spinothalamic and trigeminothalamic cells. *J. Physiol. (London)* 411 : 161-177.
- Huang R.-C.** (1993) Sodium and calcium currents in acutely dissociated neurons from rat suprachiasmatic nucleus. *J. Neurophysiol.* 70 : 1692-1703.
- Huang R.-C., Peng Y.-W., Yau K.-W.** (1993) Zinc modulation of a transient potassium current and histochemical localization of the metal in neurons of the suprachiasmatic nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90 : 11806-11810.
- Huguenard J. R.** (1996) Low-threshold calcium currents in central nervous system neurons. *Annu. Rev. Physiol.* 58 : 329-348.
- Huguenard J. R., Gutnick M. J., Prince D. A.** (1993) Transient Ca²⁺ currents in neurons isolated from rat lateral habenula. *J. Neurophysiol.* 70 : 158-166.
- Huguenard J. R., McCormick D. A.** (1992) Stimulation of the currents involved in rhythmic oscillations in thalamic relay neurons. *J. Neurophysiol.* 68 : 1373-1383.
- Huguenard J. R., Prince D. A.** (1992) A novel T-type current underlies prolonged Ca²⁺-dependent burst firing in GABAergic neurons of rat thalamic reticular nucleus. *J. Neurosci.* 12 : 3804-3817.
- Huston E. R., Scott R. H., Dolphin A. C.** (1990) A comparison of the effect of calcium channel ligands and GABA_B antagonists on transmitter release and somatic calcium channel currents in cultured neurones. *Neuroscience* 38 : 721-729.
- Jahnsen H., Llinás R.** (1984) Electrophysiological properties of guinea pig thalamic neurones: an *in vitro* study. *J. Physiol. (London)* 349 : 205-226.
- Jakab R. L., Leranath C.** (1990a) Somatospiny neurons in the lateral septal area are synaptic targets of hippocamoseptal fibers: a combined EM/Golgi and degeneration study. *Synapse* 6 : 10-22.
- Jakab R. L., Leranath C.** (1990b) Catecholaminergic, GABAergic, and hippocamoseptal innervation of GABAergic 'somatospiny' neurons in the rat lateral septal area. *J. Comp. Neurol.* 302 : 305-321.
- Jakab R. L., Leranath C.** (1991) Synaptology and origin of somatostatin fibers in the rat lateral septal area: convergent somatostatinergic and hippocampal inputs on somatospiny neurons. *Brain Res.* 565 : 123-134.

- Jakab R. L., Leranath C.** (1993) Presence of somatostatin or neurotensin in lateral septal dopaminergic axon terminals of distinct hypothalamic and midbrain origins: convergence on the somatospiny neurons. *Exp. Brain Res.* 92 : 420-430.
- Jakab R. L., Leranath C.** (1995) Septum. In *The rat nervous system*, 2^d edition PAXINOS, eds, Academic Press, San Diego, NY, pp 405-442.
- Jakab R. L., Naftolin F., Leranath C.** (1991) Convergent vasopressinergic and hippocampal input onto somatospiny neurons of the rat lateral septal area. *Neuroscience* 40 : 413-431.
- Jahnsen H., Llinás R. R.** (1984a) Electrophysiology properties of guinea-pig thalamic neurones: an *in vitro* study. *J. Physiol. (London)* 349 : 205-226.
- Jahnsen H., Llinás R. R.** (1984b) Ionic basis for the electroresponsiveness and oscillatory properties of guinea-pig thalamic neurones *in vitro*. *J. Physiol. (London)* 349 : 227-247.
- Jan L. Y., Jan Y. N.** (1990) How might the diversity of potassium channels be generated? *Trends Neurosci.* 13 : 415-420.
- Jarolimek W., Misgeld U.** (1993) 4-Aminopyridine-induced synaptic GABA_B currents in granule cells of the guinea pig hippocampus. *Pflügers Arch.* 425 : 491-498.
- Kamiya H., Sawada S., Yamamoto C.** (1988) Synthetic ω -conotoxin blocks synaptic transmission in the hippocampus *in vitro*. *Neurosci. Lett.* 91 : 84-88.
- Kamondi A., Williams J. A., Hutcheon B., Reiner P. R.** (1992) Membrane mesopontine cholinergic neurons studied with the whole-cell patch-clamp technique: implications for behavioral state control. *J. Neurophysiol.* 68 : 1359-1372.
- Kaneda M., Akaike N.** (1989) The low-threshold Ca current in isolated amygdaloid neurons in the rat. *Brain Res.* 497 : 187-190.
- Kaneda M., Wakamori M., Akaike N.** (1989) GABA-induced chloride current in rat isolated Purkinje cells. *Am. J. Physiol.* 256 : C1153-C1159.
- Kaneda M., Wakamori M., Akaike N.** (1990) Low-threshold calcium current in isolated Purkinje cell bodies of rat cerebellum. *J. Neurophysiol.* 63 : 1046-1051.
- Kang Y., Kitai S. T.** (1990) Electrophysiological properties of pediculopontine neurons and their postsynaptic responses following stimulation of substantia nigra reticulata. *Brain Res.* 535 : 79-95.
- Kang Y., Kitai S. T.** (1993a) Calcium spike underlying rhythmic firing in dopaminergic neurons of the rat substantia nigra. *Neurosci. Res.* 18 : 195-207.
- Kang Y., Kitai S. T.** (1993b) A whole cell patch-clamp study on the pacemaker potential in dopaminergic neurons of rat substantia nigra compacta. *Neurosci. Res.* 18 : 209-221.
- Kapoor R., Jaeger C. B., Llinás R.** (1988) Electrophysiology of the mammalian cerebellar cortex in organ culture. *Neuroscience* 26 : 493-507.
- Karst H., Joëls M., Wadman W. J.** (1993) Low-threshold calcium current in dendrites of the adult rat hippocampus. *Neurosci. Lett.* 164 : 154-158.
- Kay A. R.** (1992) An intracellular medium formulary. *J. Neurosci. Met.* 44 : 91-100.
- Kay A. R., Miles R., Wong R. K. S.** (1986) Intracellular fluoride alters the kinetics properties of calcium currents facilitating the investigation of synaptic events in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 6 : 2915-2920.
- Kim Y. I., Dudek F. E.** (1993) Membrane properties of rat suprachiasmatic nucleus neurons receiving optic nerve inputs. *J. Physiol. (London)* 664 : 229-243.

- Kiss T., Osipenko O. N.** (1994) Toxic effects of heavy metals on ionic channels. *Pharmacol. Rev.* 46 : 245-267.
- Koch P., Wilffert B., Peters T.** (1990) R56865: A new anti-ischemic principle. *Cardiovasc. Drug Rev.* 8 : 238-254.
- Koike H., Saito H., Matsuki N.** (1994) 5-HT_{1A} receptor-mediated inhibition of N-type calcium current in acutely isolated ventromedial hypothalamic neuronal cells. *Neurosci. Res.* 19 : 161-166.
- Komatsu Y., Iwakiri M.** (1992) Low-threshold Ca²⁺ channels mediate induction of long-term potentiation in kitten visual cortex. *J. Neurophysiol.* 87 : 401.
- Konnerth A.** (1990) Patch-clamping in slices of mammalian CNS. *Trends Neurosci.* 13 : 321-323.
- Kostyuk P. G.** (1989) Diversity of calcium ion channels in cellular membranes. *Neuroscience* 28 : 253-261.
- Kostyuk P. G., Akaike N., Osipchuk Y., Sarchencko A., Shuba Y.** (1989a) Gating and permeation of different types of Ca channels. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 560 : 63-79.
- Kostyuk P. G., Fedulova S. A., Veselovsky N. S.** (1986) Changes in ionic mechanisms of electrical excitability of the somatic membrane of rat dorsal root ganglion neurons during ontogenesis. Distribution of ionic channels of inward current. *Neurophysiol. (Kiev)* 18 : 813-820.
- Kostyuk P. G., Molokanova E. A., Pronchuk N. F., Savchenko A. N., Verkhratsky A. N.** (1992) Different action of ethosuximide on low- and high-threshold calcium currents in rat sensory neurons. *Neuroscience* 51 : 755-758.
- Kostyuk P. G., Shuba Y. M., Savchenko A. N.** (1988) Three types of calcium channels in the membrane of mouse sensory neurons. *Pflügers Arch.* 411 : 661-669.
- Kostyuk P. G., Shuba Y. M., Teslenko V. I.** (1989b) Activation kinetics of single high-threshold calcium channels in the membrane of sensory neurons from mouse embryos. *J. Membr. Biol.* 110 : 29-38.
- Kostyuk P. G., Tepikin A. V.** (1991) Calcium signals in nerve cells. *News Physiol. Sci.* 6 : 6-10.
- von Krosigk M., Bal T., McCormick D. A.** (1993) Cellular mechanisms of a synchronized oscillation in the thalamus. *Science* 261 : 361-364.
- Krukoff T. L., Calaresu F. R.** (1984) A group of neurons highly reactive for enkephalins in the rat hypothalamus. *Peptides* 5 : 931-936.
- Legendre P., Poulain D. A.** (1992) Intrinsic mechanisms involved in the electrophysiological properties of the vasopressin-releasing neurons of the hypothalamus. *Prog. Neurobiol.* 38 : 1-17.
- Lemos J. R., Nowycky M. C.** (1989) Two types of calcium channels co-exist in peptide-releasing vertebrate nerve terminals. *Neuron* 2 : 1419-1426.
- Leranth C., Frotscher M.** (1989) Organization of the septal region in the rat brain: cholinergic-GABAergic interconnections and the termination of hippocampo-septal fibers. *J. Comp. Neurol.* 289 : 304-314.
- Levitan E. S., Kramer, R. H.** (1990) Neuropeptide modulation of single calcium and potassium channels detected with a new patch clamp configuration. *Nature* 348 : 545-547.
- Leybaert L., Hemptinne A.** (1993) A voltage-clamp study of calcium currents in neurons freshly isolated from the dorsal root ganglion of adult rats. *Arch. Internat. Physiol. Bioch. Bioph.* 101 : 315-323.
- Li Z., Ferguson A. V.** (1996) Electrophysiological properties of paraventricular magnocellular neurons in rat brain slices: modulation of I_A by angiotensin II. *Neuroscience* 71 : 133-145.

- Liu Y., Lasater E. M.** (1994) Calcium currents in turtle retinal ganglion cells. I. The properties of T- and L-type currents. *J. Neurophysiol.* 71 : 733-742.
- Llinás R. R.** (1988) The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: insights into central nervous system function. *Science* 242 : 1654-1664.
- Llinás R. R., Alonso A.** (1992) Electrophysiology of the mammillary complex *in vitro*. I. Tuberosomammillary and lateral mammillary neurons. *J. Neurophysiol.* 68 : 1307-1320.
- Llinás R. R., Jahnsen H.** (1982) Electrophysiology of mammalian thalamic neurones *in vitro*. *Nature* 297 : 406-408.
- Llinás R. R., Mühlethaler M.** (1988) An electrophysiological study of the *in vitro*, perfused brain stem-cerebellum of adult guinea-pig. *J. Physiol. (London)* 404 : 215-240.
- Llinás R. R., Sugimori M.** (1980) Electrophysiological properties of *in vitro* cells dendrites in mammalian cerebellar slices. *J. Physiol. (London)* 305 : 197-217.
- Llinás R. R., Sugimori M.** (1987) *Soc. Neurosci. Abstr.* 13 : 228.
- Llinás R. R., Sugimori M., Hillman D. E., Cherksey B.** (1992) Distribution and functional significance of the P-type, voltage-dependent Ca²⁺ channels in the mammalian central nervous system. *Trends Neurosci.* 15 : 351-355.
- Llinás R. R., Sugimori M., Lin J.-W., Cherksey B.** (1989) Blocking and isolation of a calcium channel from neurons in mammals and cephalopods utilising a toxin fraction (FTX) from funnel-web spider poison. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86 : 1689-1693.
- Llinás R. R., Yarom Y.** (1981a) Electrophysiology of mammalian inferior olivary neurones *in vitro*: different types of voltage-dependent ionic conductances. *J. Physiol. (London)* 315 : 549-567.
- Llinás R. R., Yarom Y.** (1981b) Properties and distribution of ionic conductances generating electroresponsiveness of mammalian inferior olivary neurones *in vitro*. *J. Physiol. (London)* 315 : 569-584.
- Llinás R. R., Yarom Y.** (1986a) Specific blockade of the low threshold calcium channel by high molecular weight alcohols. *Soc. Neurosci. Abstr.* 174.
- Llinás R. R., Yarom Y.** (1986b) Oscillatory properties of guinea-pig olivary neurons and their pharmacological modulation: an *in vitro* study. *J. Physiol. (London)* 376 : 163-182.
- Loose M. D., Ronnekleiv O. K., Kelly M. J.** (1990) Membrane properties and responses to opioids of identified dopamine neurons in the guinea-pig hypothalamus. *J. Neurosci.* 10 : 3627-3634.
- MacMillan S. J. A., Bourque C. W.** (1993) Intracellular recordings from neurons of the arcuate nucleus in superfused explants of rat hypothalamus. *Neuroendocrinol.* 57 : 159-166.
- Markram H., Sakmann B.** (1994) Calcium transients in dendrites of neocortical neurons evoked by single subthreshold excitatory postsynaptic potentials via low-voltage-activated calcium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91 : 5207-5211.
- Mattson M. P.** (1992) Calcium as sculptor and destroyer of neuronal circuitry. *Exp. Gerontol.* 27 : 29-49.
- Mayer M. L., Sugiyama K.** (1988) A modulatory action of divalent cations on transient outward current in cultured rat sensory neurons. *J. Physiol. (London)* 396 : 417-433.
- McCobb D. P., Beam K. G.** (1991) Action potential waveform voltage-clamp commands reveal striking differences in calcium entry via low and high voltage-activated calcium channels. *Neuron* 7 : 119-127.
- McCormick D. A.** (1991) Functional properties of a slowly inactivating potassium current in guinea pig dorsal lateral geniculate relay neurons. *J. Neurophysiol.* 66 : 1176-1189.

- McCormick D. A., Huguenard J. R.** (1992) A model of the electrophysiological properties of thalamocortical relay neurons. *J. Neurophysiol.* 68 : 1384-1400.
- McCormick D. A., Pape H.-C.** (1990) Properties of a hyperpolarization-activated cation current and its role in rhythmic oscillation in thalamic relay neurons. *J. Physiol. (London)* 431 : 291-318.
- McCormick D. A., Prince D. A.** (1988) Noradrenergic modulation of firing pattern in guinea pig and cat thalamic neurons, *in vitro*. *J. Neurophysiol.* 59 : 978-996.
- McFarlane S., Cooper E.** (1992) Postnatal development of voltage-gated K currents on rat sympathetic neurons. *J. Neurophysiol.* 67 : 1291-1300.
- McFarlane S., Cooper E.** (1993) Extrinsic factors influence the expression of voltage-gated K currents on neonatal rat sympathetic neurons. *J. Neurosci.* 13 : 2591-2600.
- Mehrke G., Zong X. G., Flockerzi V., Hofmann F.** (1994) The Ca⁺⁺-channel blocker Ro 40-5967 blocks differently T-type and L-type Ca⁺⁺ channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 271 : 1483-1488.
- Merchenthaler L.** (1991) Co-localization of enkephalin and TRH in perifornical neurons of the rat hypothalamus that project to the lateral septum. *Brain Res.* 544 : 177-180.
- Merchenthaler L., Maderdrut J. L., Altschuler R. A., Petrusz P.** (1986) Immunocytochemical localization of proenkephalin-derived peptides in the central nervous system. *Neuroscience* 17 : 325-348.
- Meriney S. D., Gray D. B., Pilar G. R.** (1994) Somatostatin-induced inhibition of neuronal Ca²⁺ current modulated by cGMP-dependent protein kinase. *Nature* 369 : 336-339.
- Miller R. J.** (1987) Multiple calcium channels and neuronal function. *Science* 235 : 46-52.
- Minami T., Oomura Y., Sugimori M.** (1986a) Electrophysiological properties and glucose responsiveness of guinea-pig ventromedial hypothalamic neurones *in vitro*. *J. Physiol. (London)* 380 : 127-143.
- Minami T., Oomura Y., Sugimori M.** (1986b) Ionic basis for the electroresponsiveness of guinea-pig ventromedial hypothalamic neurones *in vitro*. *J. Physiol. (London)* 380 : 145-156.
- Mintz I. M., Venema V. J., Swiderek K. M. et al** (1992) P-type calcium channels blocked by the spider toxin ω -Aga-IVA. *Nature* 355 : 827-830.
- Mishra S. K., Hermsmeyer K.** (1994) Selective inhibition of T-type Ca²⁺ channels by Ro 40-5967. *Circ. Res.* 75 : 144-148.
- Mitchell V., Beauvillain J.-C., Mazzuca M.** (1992) Combination of immunocytochemistry and *in situ* hybridization in the same semi-thin sections : detection of met-enkephalin and pro-enkephalin mRNA in the hypothalamic magnocellular dorsal nucleus of the guinea-pig. *J. Histochem. Cytochem.* 40 : 581-592.
- Mitchell V., Beauvillain J.-C., Poulain P., Mazzuca M.** (1988) Catecholamine innervation of enkephalinergic neurons in the guinea pig hypothalamus : demonstration by an *in vitro* autoradiographic technique combined with a post-embedding immunogold method. *J. Histochem. Cytochem.* 36 : 533-542.
- Miyake N., Wakamori M., Akaike N.** (1992) A new type of Ca²⁺ channel blocker, NC-1100, inhibits the low- and high-threshold Ca²⁺ currents in the rat CNS neurons. *Brain Res.* 598 : 215-220.
- Mogul D. J., Fox A. P.** (1991) Evidence for multiple types of Ca²⁺ channels in acutely isolated hippocampal CA3 neurones of the guinea-pig. *J. Physiol. (London)* 433 : 259-281.
- Morf W. E.** (1981) *The principles of ion-selective electrodes and of membrane transport*. Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam.
- Mulle C., Madariaga A., Deschênes M.** (1986) Morphology and electrophysiological properties of reticularis thalami neurons in cat: *in vivo* study of a thalamic pacemaker. *J. Neurosci.* 6 : 2134-2145.

- Müller T. H., Misgeld U., Swandulla D.** (1992) Ionic currents in cultured rat hypothalamic neurones. *J. Physiol. (London)* 450 : 341-362.
- Nagatomo T., Inenaga K., Yamashita H.** (1995) Transient outward current in adult rat supraoptic neurones with slice patch-clamp technique: inhibition by angiotensin II. *J. Physiol. (London)* 485 : 87-96.
- Naharashi T., Tsunoo A., Yoshii M.** (1987) Characterization of two types of calcium channels in mouse neuroblastoma cells. *J. Physiol. (London)* 383 : 231-249.
- Nance D. M.** (1983) Psychoneuroendocrine effects of neurotoxic lesions in the septum and striatum of rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 18 : 605-609.
- Nargeot J., Charnet P.** (1994) Diversité moléculaire des canaux calciques : du gène à la fonction. *Med. Sci.* 12 : 1293-1307.*
- Nedergaard S., Flatman J. A., Engberg I.** (1993) Nifedipine- and ω -conotoxin-sensitive Ca^{2+} conductances in guinea-pig substantia nigra pars compacta neurones. *J. Physiol. (London)* 466 : 727-747.
- Nedergaard S., Greenfield S. A.** (1992) Sub-populations of pars compacta neurons in the substantia nigra: the significance of qualitatively and quantitatively distinct conductances. *Neuroscience* 48 : 423-437.
- Neher E.** (1971) Two fast transient components during voltage clamp on snail neurons. *J. Gen. Physiol.* 58 : 36-53.
- Neher E.** (1992) Correction for liquid junction potentials in patch clamp experiments. In Rudy B. and Iverson L. E. (eds), *Methods in Enzymology*, vol. 207: Ion channels. Academic Press, San Diego, pp: 123-131.
- Neumann I., Russel J. A., Wolff B., Landgraf R.** (1991) Naloxone increases the release of oxytocin, but not vasopressin, within limbic brain areas of conscious parturient rats: a push-pull perfusion study. *Neuroendocrinol.* 54 : 545-551.
- Niespodziany L., Poulain P.** (1995) Electrophysiology of the neurons in the area of the enkephalinergic magnocellular dorsal nucleus of the guinea-pig hypothalamus, studied by intracellular and whole-cell recordings. *Eur. J. Neurosci.* 7 : 1134-1145.
- Nowycky M. C., Fox A. P., Tsien R. W.** (1985) Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* 316 : 440-443.
- Olesen J.** (1988) Calcium entry blockers in the treatment of vertigo. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 522 : 690-697.
- Olivera B. M., McIntosh J. M., Cruz L. J., Luque F. A., Gray W. R.** (1984) Purification and sequence of a presynaptic peptide toxin from *Conus geographus* venom. *Biochemistry* 23 : 5087.
- Olpe H. R., Steinmann M. W., Pozza M. F., Haas H. L.** (1987) Comparative investigations on the actions of ACTH_{1-24}}, somatostatin, neurotensin, substance P and vasopressin on locus coeruleus neuronal activity in vitro. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 336 : 434-437.
- Olson G. A., Olson R. D., Kastin A. J.** (1986) Endogenous opiates. *Peptides* 8 : 1135-1164.
- Omura T., Kobayashi T., Nishioka K., Miyake N., Akaike N.** (1996) Ca^{2+} -Antagonistic action of bevantolol on hypothalamic neurons in vitro: its comparison with those of other β -adrenoreceptor antagonists, a local anesthetic and a Ca^{2+} -antagonist. *Brain Res.* 706 : 289-292.
- Onn S.-P., Berger T. W., Grace A. A.** (1994) Identification et characterization of striatal cell subtypes using *in vivo* intracellular recording and dye-labeling in rats: III. Morphological correlates and compartmental localization. *Synapse* 16 : 231-254.
- Onn S.-P., Pucak M. L., Grace A. A.** (1993) Lucifer yellow dye labelling of living nerve cells and subsequent immunoperoxidase staining with Lucifer yellow antiserum. *Neurosci. Protocols* 93-050-17 : 1-14.

- Onténiente B., Menétrey D., Arai R., Calas A.** (1989) Origin of the met-enkephalinergic innervation of the lateral septum in the rat. *Cell Tissue Res.* 256 : 585-592.
- Ozawa S., Tsuzuki K., Iino M., Ogura A., Kudo Y.** (1989) Three types of voltage-dependent calcium current in cultured rat hippocampal neurons. *Brain Res.* 495 : 329-336.
- Panchenko V. A., Krishtal O. A., Tegtmeier F., Tsyndrenko A. A.** (1993) R56865 as Ca²⁺-channel blocker in Purkinje neurons of rat: comparison with flunarizine and nimodipine. *Neuroscience* 54 : 587-594.
- Pape H. C., Budde T., Mager R., Kisvarday Z. F.** (1994) Prevention of Ca²⁺-mediated action potentials in GABAergic local circuit neurones of rat thalamus by a transient K⁺ current. *J. Physiol. (London)* 478 : 403-422.
- Pauwels P. J., Leysen J. E., Janssen P. A. J.** (1991) Minireview Ca⁺⁺ and Na⁺ channels involved in neuronal death. Protection by flunarizine. *Life Sci.* 48 : 1881-1893.
- Perney T. M., Hirning L. D., Leeman S. E., Miller R. J.** (1986) Multiple calcium channels mediate neurotransmitter release from peripheral neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83 : 6656-6659.
- Pfriefer F.W., Veselovsky N. S., Gottmann K., Lux H.D.** (1992) Pharmacological characterization of calcium currents and synaptic transmission between thalamic neurons *in vitro*. *J. Neurosci.* 12 : 4347-4357.
- Pillez A., Slama A., Ciofi P., Tramu G., Epelbaum J., Beauvillain J. C.** (1994) Immunocytochemical and *in vitro* autoradiographic evidence for a direct somatostatinergic modulation of the enkephalinergic tract of the guinea-pig. *Neuroscience* 58 : 207-215.
- Platt J. L., Michael A. F.** (1983) Retardation of fading and enhancement of intensity of immunofluorescence by p-phenylenediamine. *J. Histochem. Cytochem.* 31 : 840-842.
- Poulain P.** (1974) *L'hypothalamus et le septum du cobaye de 400 grammes en coordonnées stéréotaxiques.* Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp. 63 : 37-50.
- Poulain P.** (1983) Hypothalamic projection to the lateral septum in the guinea pig. An HRP study. *Brain Res. Bull.* 10 : 309-313.
- Poulain P.** (1986) Properties of antidromically identified neurons in the enkephalinergic magnocellular dorsal nucleus of the guinea pig hypothalamus. *Brain Res.* 362 : 74-82.
- Poulain P., Carette B.** (1987) Low-threshold calcium spikes in hypothalamic neurons recorded near the paraventricular nucleus *in vitro*. *Brain Res. Bull.* 19 : 453-460.
- Poulain P., Martin-Bouyer L., Beauvillain J.-C., Tramu G.** (1984) Study of the efferent connections of the enkephalinergic magnocellular dorsal nucleus in the guinea pig hypothalamus using lesions, retrograde tracing and immunochemistry: evidence for a projection to the lateral septum. *Neuroscience* 11 : 331-343.
- Raï R., Llinás R.** (1994) Somatostatin effect on guinea-pig dorsal thalamic neurons *in vitro*. *Abst. Soc. Neurosci.* 20 : 1348.
- Randall A. D., Wendland B., Schweizer F., Miljanich G., Adams M. E., Tsien R. W.** (1993) Five pharmacologically distinct high voltage-activated Ca²⁺ channels in cerebellar granule cells. *Soc. Neurosci. Abstr.* 19 : 1478.
- Rane S., Holtz G. G., Dunlap K.** (1987) Dihydropyridine inhibition of neuronal calcium current and substance P release. *Pflügers Arch.* 409 : 361-366.
- Regan L. J.** (1991) Voltage-dependent calcium currents in Purkinje cells from rat cerebellar vermis. *J. Neurosci.* 11 : 2259-2269.
- Regan L. J., Sah D. W. Y., Bean B. P.** (1991) Ca²⁺ channels in rat central and peripheral neurons: high-threshold current resistant to dihydropyridine blockers and ω -conotoxin. *Neuron* 6 : 269-280.

- Regehr W. G., Connor J. A., Tank D. W. (1989)** Optical imaging of calcium accumulation in hippocampal pyramidal cells during synaptic activation. *Nature* 341 : 533-536.
- Rogawski M. A. (1985)** The A-current: how ubiquitous a feature of excitable cells is it? *Trends Neurosci.* 8: 214-219.
- Romey G., Lazdunski D. (1982)** Lipid-soluble toxins thought to be specific for Na channels block Ca channels in neuronal cells. *Nature* 297 : 79-80.
- Rothe T., Grantyn R. (1994)** Retinal ganglion neurons express a toxin-resistant developmentally regulated novel type of high-voltage-activated calcium channel. *J. Neurophysiol.* 72 : 2542-2546.
- Rudy B. (1988)** Diversity and ubiquity of K channels. *Neuroscience* 3 : 729-749.
- Sah P., McLachlan E. M. (1992)** Potassium currents contributing to action potential repolarization and the afterhyperpolarization in rat vagal motoneurons. *J. Neurophysiol.* 98 : 1834-1841.
- Sakanaka M., Magari S. (1989)** Reassessment of enkephalin (ENK)-containing afferents to the rat lateral septum with reference to the fine structures of septal ENK fibers. *Brain Res.* 479 : 205-216.
- Sakanaka M., Senba E., Shiosaka S., Takatsuki K., Inagaki S., Takagi H., Hawai Y., Hara Y., Tohyama M. (1982)** Evidence for the existence of an enkephalin-containing pathway from the area just ventrolateral to the anterior hypothalamic nucleus to the lateral septal area of the rat. *Brain Res.* 239 : 240-244.
- Sánchez D., Ribas J. (1991)** Properties and ionic basis of the action potentials in periaqueductal grey neurones of the guinea-pig. *J. Physiol. (London)* 440 : 167-187.
- Sar M., Stumpf W. E., Miller R. J., Chang K. J., Cuatrecasas P. (1978)** Immunohistochemical localization of enkephalin in rat brain and spinal cord. *J. Comp. Neurol.* 182 : 17-38.
- Scharfman H. E., Schwartzkroin P. A. (1989)** Selective depression of GABA-mediated IPSPs by somatostatin in area CA1 of rabbit hippocampal slices. *Brain res.* 493 : 205-211.
- Schellenberg G. D., Anderson L., Swanson P. (1983)** *Molecular Pharmacol.* 24 : 251.
- Schmitt R., Clozel J.-P., Iberg N., Bühler F. R. (1995)** Mibefradil prevents neointima formation after vascular injury in rats. Possible role of the blockade of the T-type voltage-operated calcium channel. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15 : 1161-1165.
- Schroeder J. E., Fischbach P. S., McCleskey E. W. (1990)** T-type calcium channels : heterogeneous expression in rat sensory neurons and selective modulation by phorbol esters. *J. Neurosci.* 10 : 947-951.
- Schwartzkroin P. A. (1981)** To slice or not to slice. In : *Electrophysiology of isolated mammalian CNS preparation.* Kernt G.A. et Wheal H.V., eds, Acad. Press (Lond.), pp: 15-50.
- Schwartzkroin P. A., Mathers L. H. (1978)** Physiological and morphological identification of a non-pyramidal hippocampal cell type. *Brain Res.* 154 : 1-10.
- Schweitzer P., Madamba S., Champagnat J., Siggins G. R. (1993)** Somatostatin inhibition of hippocampal CA1 pyramidal neurons: mediation by arachidonic acid and its metabolites. *J. Neurosci.* 13 : 2033-2049.
- Scott R. H., Pearson H. A., Dolphin A. C. (1991)** Aspects of vertebrate neuronal voltage-activated calcium currents and their regulation. *Prog. Neurobiol.* 36 : 485-520.
- Seabrook G. R., Adams D. J. (1989)** Inhibition of neurally-evoked transmitter release by calcium channel antagonists in rat parasympathetic ganglia. *Br. J. Pharmac.* 97 : 1125-1136.
- Sheppard D. N., Valverde M. A., Represa J., Giraldez F. (1992)** Transient outward currents in cochlear ganglion neurons of the chick embryo. *Neuroscience* 51 : 631-639.

- Sher E., Clementi F.** (1991) ω -Conotoxin-sensitive voltage-operated calcium channels in vertebrate cells. *Neuroscience* 42 : 301-307.
- Shirokov R. E.** (1988) Potential dependence of calcium current deactivating in the somatic membrane of mouse sensory neurons. *Neurophysiol. (Kiev)* 20 : 185-192.
- Shoji S., Akasu T., Hasuo H., Nonaka K.** (1991) Glucose depletion suppresses synaptic transmission in rat dorsolateral septal nucleus. *Jap. J. Physiol.* 41 : 809-815.
- Soltész I., Lightowler S., Leresche N., Jassik-Gerschenfeld D., Pollard C. E., Crunelli V.** (1991) Two inward currents and the transformation of low-frequency oscillations of rat and cat thalamocortical cells. *J. Physiol. (London)* 441 : 175-197.
- Soong T. W., Stea A., Hodson C. D., Dubel S. J., Vincent S.R., Snutch T. P.** (1993) Structure and functional expression of a member of the low-activated calcium channel family. *Science* 260 : 1133-1136.
- Spierings E. L.** (1988) Clinical and experimental evidence for a role of calcium entry blockers in the treatments of migraine. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 522 : 676-689.
- Spigelman I., Puil E.** (1989) K^+ channel blockade in trigeminal root ganglion neurons: effects on membrane outward currents. *J. Neurophysiol.* 62 : 802-809.
- Spigelman I., Zhang L., Carlen P. L.** (1992) Patch-clamp study of postnatal development of CA1 neurons in rat hippocampal slices : membrane excitability and K^+ currents. *J. Neurophysiol.* 68 : 55-69.
- Staiger J. F., Nürnbergger F.** (1989) Pattern of afferents to the lateral septum in the guinea pig. *Cell Tissue Res.* 257 : 471-490.
- Staiger J. F., Nürnbergger F.** (1991) The efferent connections of the lateral septal nucleus in the guinea pig: projections to the diencephalon and brainstem. *Cell Tissue Res.* 264 : 391-413.
- Staley K. J., Otis T. S., Mody I.** (1992) Membrane properties of dentate gyrus granule cells: comparison of sharp microelectrode and whole-cell recordings. *J. Neurophysiol.* 67 : 1346-1358.
- Stanley E. F., Atrakchi A. H.** (1990) Calcium currents recorded from a vertebrate presynaptic nerve terminal are resistant to the dihydropyridine nifedipine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87 : 9683-9687.
- Stansfeld et al** (1986) *Neurosci. Lett.* 64 : 299-304.
- Stengaard-Pedersen K., Larsson L. I.** (1983) Met- and Leu-enkephalinergic innervation of the lateral septal nucleus. *Brain Res.* 264 : 152-156.
- Steriade M., Deschênes M.** (1985) The thalamus as a neuronal oscillator. *Brain Res. Rev.* 8 : 1-63.
- Stern J. E., Armstrong W. E.** (1995) Electrophysiological differences between oxytocin and vasopressin neurones recorded from female rats *in vitro*. *J. Physiol. (London)* 488 : 701-708.
- Sternweis P. C., Gilman A. G.** (1982) Aluminium : a requirement for activation of the regulatory component of adenylate cyclase by fluoride. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79 : 4888-4891.
- Stevens D. R., Gallagher J. P., Shinnick-Gallagher P.** (1984) Intracellular recordings from dorsolateral septal neurons, *in vitro*. *Brain Res.* 305 : 353-356.
- Storm J. F.** (1990) Potassium currents in hippocampal pyramidal cells. J. Storm-Mathisen, J. Zimmer and O.P. Ottersen, eds, *Progress in brain research*, vol. 83, pp 161-187.
- Surmeier D. J., Bargas J., Kitai S. T.** (1989) Two types of A-currents differing in voltage-dependence are expressed by neurons of the rat neostriatum. *Neurosci. Lett.* 103 : 331-337.

- Surmeier D. J., Wilson C. J., Eberwine J.** (1994) Patch-clamp techniques for studying potassium currents in mammalian brain neurons. *Met. Neurosci.* 19 : 39-67.
- Sutor B., Zieglgänsberger W.** (1987) A low-voltage activated, transient calcium current is responsible for the time-dependent depolarizing inward rectification of rat neocortical neurons *in vitro*. *Pflügers Arch.* 410 : 102-111.
- Suzuki S., Rogawski M. A.** (1989) T-type calcium channels mediate the transition between tonic and phasic firing in thalamic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86 : 7228-7232.
- Swandulla D., Carbone E., Schafer K., Lux H. D.** (1987) Effects of menthol on two types of Ca currents in cultured sensory neurons of vertebrates. *Pflügers Arch.* 409 : 52-59.
- Takahashi K., Ueno S., Akaike N.** (1991) Kinetic properties of T-type Ca²⁺ currents in isolated rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J. Neurophysiol.* 65 : 148-154.
- Takahashi K., Wakamori M., Akaike N.** (1989) Hippocampal CA1 pyramidal cells of rats have four voltage-dependent calcium conductances. *Neurosci. Lett.* 104 : 229-234.
- Talukder G., Harrison N. L.** (1995) On the mechanism of modulation of transient outward current in cultured rat hippocampal neurons by di- and trivalent cations. *J. Neurophysiol.* 73 : 73-79.
- Tang C.-M., Presser F., Morad M.** (1988) Amiloride selectively blocks the low threshold (T) calcium channel. *Science* 240 : 213-215.
- Tasker J. G., Dudek F. E.** (1991) Electrophysiological properties of neurones in the region of the paraventricular nucleus in slices of rat hypothalamus. *J. Physiol. (London)* 434 : 271-293.
- Tell F., Bradley R. M.** (1994) Whole-cell analysis of ionic currents underlying the firing pattern of neurons in the gustatory zone of the nucleus tractus solitarii. *J. Physiol. (London)* 71 : 479-492.
- Thomson A. M.** (1988) Inhibitory postsynaptic potentials evoked in thalamic neurons by stimulation of the reticularis nucleus evoke slow spikes in isolated brain slices. *Neuroscience* 25 : 491-502.
- Tramu G., Beauvillain J.-C., Croix D., Leonardelli J.** (1981) Comparative immunocytochemical localization of enkephalin and somatostatin in the median eminence, hypothalamus and adjacent areas of the guinea-pig brain. *Brain Res.* 215 : 235-255.
- Tsien R. W., Lipscombe D., Madison D. V., Bley K. R., Fox P.** (1988) Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *Trends Neurosci.* 11 : 431-438.
- Tseng G. F., Parada I., Prince D. A.** (1991) Double-labelling with rhodamine beads and biocytin: a technique for studying corticospinal and other projection neurons *in vitro*. *J. Neurosci. Met.* 37 : 121-131.
- Twery M. J., Gallagher J. P.** (1990) Somatostatin depresses GABA receptor-mediated inhibition in the rat dorsolateral septal nucleus. *Brain Res.* 519 : 277-286.
- Tytgat J., Vereecke J., Carmeliet E.** (1988) Differential effects of verapamil and flunarizine on cardiac L-type and T-type Ca channel. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmac.* 337 : 690-692.
- Umemiya M., Berger A. J.** (1994) Properties and function of low- and high-voltage-activated Ca²⁺ channels in hypoglossal motoneurons. *J. Neurosci.* 14 : 5652-5660.
- Vanhoutte P. M., Paoletti R.** (1987) The WHO classification of calcium antagonists. *TIPS* 8 : 4-5.
- Vanner S., Evans R. J., Matsumoto S. G., Surprenant A.** (1993) Potassium currents and their modulation by muscarine and substance P in neuronal cultures from adult guinea pig celiac ganglia. *J. Neurophysiol.* 69 : 1632-1644.

- Varoqueaux F.** (1995) Etude morpho-fonctionnelle des projections du septum latéral médiolatéral vers l'aire préoptique et l'hypothalamus neuroendocrines chez le cobaye et le rat. Mémoire de Thèse. Université des Sciences et Technologies de Lille.
- Varoqueaux F., Ciofi P., Tramu G., Beauvillain J.C., Poulain P.** (1995) Direct projections from the lateral septum to GnRH neurons in the rat. *Soc. Neurosci. Abst.* 21 : 1898.
- Varoqueaux F., Poulain P.** (1994) Lateral septal projections onto tubero-infundibular neurons in the hypothalamus of the guinea-pig. *Cell Tissue Res.* 278 : 217-225.
- Velasco M. E., Taleisnik S.** (1969) Release of gonadotropins induced by amygdaloid stimulation in the rat. *Endocrinology* 84 : 132-139.
- Viana F., Bayliss D. A., Berger A. J.** (1993) Calcium conductances and their role in the firing behavior of neonatal rat hypoglossal motoneurons. *J. Neurophysiol.* 69 : 2137-2149.
- Wahren W.** (1957) Das Zwischenhirn des Kaninchens. *J. Hirnforsch.* 3 : 143-242.
- Wamsley J. K., Young W. S., Kuhar M. J.** (1980) Immunohistochemical localization of enkephalin in rat forebrain. *Brain Res.* 190 : 153-174.
- Wang G., Lemos J. R.** (1995) Tetrandrine: a new ligand to block voltage-dependent Ca^{2+} and Ca^{2+} -activated K^{+} channels. *Life Sci.* 56 : 295-306.
- Westenbroek E., Hell J. W., Warner C., Dubel S. J., Snutch T. P., Catterall W. A.** (1992) Biochemical properties and subcellular distribution of an N-type calcium channel $\alpha 1$ subunit. *Neuron* 9 : 1099-1115.
- Wheeler D. B., Randall A. D., Tsien R. W.** (1994) Roles of N-type and Q-type Ca^{2+} channels in supporting hippocampal synaptic transmission. *Science* 264 : 107-111.
- Wilcox K. S., Gutnick M. J., Christoph G. R.** (1988) Electrophysiological properties of neurons in the lateral habenula nucleus: an *in vitro* study. *J. Neurophysiol.* 59 : 212-225.
- Wong R. K. S., Prince D. A.** (1981) Afterpotential generation in hippocampal pyramidal cells. *J. Neurophysiol.* 45 : 86-97.
- Wuarin J. P., Dudek F. E.** (1994) Glutamate microstimulation of local inhibitory currents in rat supraoptic nucleus. *Soc. Neurosci. Abst.* 20 : 1177.
- Yaari Y., Hamon B., Lux H. D.** (1987) Development of two types of calcium channels in cultured mammalian hippocampal neurons. *Science* 235 : 680-682.
- Yamada K., Teraoka T., Morita S., Hasegawa T., Nabeshima T.** (1993) Neuropharmacological characterization of voltage-sensitive calcium channels: possible existence of neomycin-sensitive, ω -conotoxin GVIA- and dihydropyridines-resistant calcium channels in the rat brain. *Japan J. Pharmacol.* 63 : 423-432.
- Yung W. H., Häusser M. A., Jack J. J. B.** (1991) Electrophysiology of dopaminergic and non-dopaminergic neurons of the guinea-pig substantia nigra compacta *in vitro*. *J. Physiol. (London)* 436 : 643-667.
- Zbicz K. L., Weight, F. F.** (1985) Transient voltage and calcium dependent outward currents in hippocampal CA3 pyramidal neurons. *J. Neurophysiol.* 53 : 1038-1058.
- Zhang J.-F., Randall A. D., Ellinor P. T., Horne W. A., Sather W. A., Tanabe T., Schwartz T. L., Tsien R. W.** (1993) Distinctive pharmacology and kinetics of cloned neuronal Ca^{2+} channels and their possible counterparts in mammalian CNS neurons. *Neuropharmacology* 32 : 1075-1088.

Le travail, réalisé sur tranches de cerveau de 400µm maintenues *in vitro* à 34°C, a permis la caractérisation électrophysiologique des neurones enképhalinerigiques du noyau magnocellulaire dorsal de l'hypothalamus du cobaye.

En courant-imposé, les propriétés électriques des neurones du noyau ne dépendent pas de la méthode d'enregistrement (intracellulaire, n=63, ou *patch-clamp* "cellule entière", n=40) et ne diffèrent pas de celles des neurones immédiatement voisins. Contrairement aux neurones de classe II (20,4%), les neurones de classe I (79,6%) émettent en condition hyperpolarisée un potentiel dépolarisant lent qui déclenche ou non, dans les mêmes proportions, une bouffée de potentiels d'action. Une rectification membranaire est apparente pour les deux classes de neurones.

Enregistrées en *patch-clamp* en potentiel-imposé (n=61), les caractéristiques biophysiques, cinétiques et pharmacologiques du courant calcique transitoire à l'origine des potentiels dépolarisants lents sont semblables pour tous les neurones de classe I, à l'exception de l'amplitude qui est plus élevée pour les neurones à bouffées de potentiels d'action. Ce courant s'active vers -80mV, est complètement activé vers -50mV et inactivé vers -65mV. Il est bloqué par les ions Ni²⁺ et Co²⁺ et il est sensible à l'amiloride et à l'octanol. Il ressemble au courant de type T particulièrement abondant dans l'hypothalamus. Il s'en distingue par son insensibilité à la nifédipine et à la flunarizine.

Etudié avec les mêmes méthodes (n=42), le courant potassique transitoire à l'origine de la rectification membranaire diffère par sa cinétique dans les neurones de classe I et II. Il s'active vers -65mV, est complètement activé vers 0mV et inactivé vers -50mV. Il est bloqué par la 4-aminopyridine 5mM, et il est insensible au tétraéthylammonium et à la dendrotoxine, ce qui l'apparente au courant de type A.

L'étude comparative des courants T et A montre que leur interaction est importante pour déterminer la forme et l'amplitude des potentiels dépolarisants lents.

Mots-clés

Hypothalamus

Patch-clamp

Courant calcique bas-seuil

Cobaye

Courant-imposé

Courant potassique transitoire

Electrophysiologie

Potentiel-imposé

