



Faculté des Sciences et Techniques de Béni Mellal

كلية العلوم والتقنيات بني ملال



جامعة السلطان مولاي سليمان
Université Sultan Moulay Slimane

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Neurosciences

Présentée par :

Ghizlane ER-RAOUI

**CARACTERISATION ELECTROPHYSIOLOGIQUE DES RECEPTEURS
METABOTROPIQUES GABA_B DANS LES NEURONES CONTACTANT LE LIQUIDE
CEPHALORACHIDIEN AU NIVEAU DU COMPLEXE VAGAL DORSAL CHEZ LA
SOURIS**

Soutenue le : 31/12/2018

Sous la direction des professeurs:

Mohamed NAJIMI¹

Jérôme TROUSLARD²

Et codirection du docteur : Riad Seddik²

¹Laboratoire génie biologique : équipe biologie fonctionnelle et pathologique – Béni Mellal -
Maroc

²Physiologie et Physio-pathologie du Système nerveux somato-moteur et Neurovégétatif
(PPSN) – Marseille – France

Ce travail est dédié

A

L'âme de mon grand-père qui est parti trop tôt, avant qu'il puisse voir sa petite-fille là où il a toujours souhaité... J'aurais tant aimé que tu sois là...

A

Mes parents et ma grand-mère qui ont toujours été derrière moi, tous les mercis du monde ne seront jamais assez pour vous exprimer ma reconnaissance

A

Mes deux tantes et mon oncle chéri, je vous aime

A

Mes amis au Maroc qui m'ont toujours soutenu malgré la distance qui nous a séparé toutes ces années. Merci : Hafida, Nora, Assia, Mourad et Taoufik

Mes amis en France qui ont toujours su me remonter le moral et me donner la force pour aller de l'avant à chaque fois que j'en ai besoin, Merci :

Rabaa et Bruno, Adil, Momo, Hakima, Jefferson, Coraline, Christine, Corentin,...

Sans oublier bien sûr mes deux sœurs chéries : Hanane et Hind et ma petite nièce adorée

Kimmy.

Sans vous tous, je ne serais jamais arrivée !

Ghizlane.

Remerciements :

Cette thèse de doctorat est le fruit d'une collaboration entre deux laboratoires : le laboratoire de « Physiologie et physiopathologie du système nerveux somatomoteur et neurovégétatif » (PPSN) à Marseille, où j'étais sous la direction du professeur Jérôme Trouslard (chef du laboratoire PPSN et chef du département de biologie à AMU) que je remercie d'avoir l'amabilité de m'accueillir au sein de son équipe et de me faire bénéficier de son expertise en électrophysiologie et le laboratoire de génie biologique à Béni Mellal, sous la direction du professeur Mohamed Najimi lui-même directeur du laboratoire, à qui je dois la découverte du monde fascinant des neurosciences. Préparer ma thèse sous la direction du Pr. Najimi était donc un choix très naturel vu ses grandes compétences dans le domaine des neurosciences. Je profite pour le remercier d'avoir accepté ma candidature, c'était un grand plaisir de travailler sous sa direction.

En observant les profils de ces deux grands messieurs et professeurs, très compétents scientifiquement et avec des grandes valeurs et qualités humaines, je réalise à quel point j'ai été chanceuse de vous avoir comme directeurs de thèse. En vous côtoyant durant ces années, j'ai beaucoup appris sur le plan professionnel et personnel. Je ne saurais jamais vous remercier pour votre soutien et vos nombreux conseils qui me seront utiles durant toute ma carrière. Je vous serai toujours reconnaissante. Merci.

Ce travail n'aurait pas été possible sans le support financier de l'institut français du Maroc, qui m'a octroyé une bourse de recherches pendant mes trois premières années et sans ma famille qui m'a apporté diverses aides financières, qui m'ont permis de me consacrer sereinement à l'élaboration de ma thèse.

Je tiens à remercier les membres de jury qui ont accepté de juger mon travail après avoir pris le temps de le lire et qui m'ont honorée par leur présence le jour de ma soutenance : Je remercie donc Pr. Saadia Ba M'hamed (examinatrice) et Pr. Mohammed Bennis (rapporteur), professeurs de la faculté des sciences Semlalia, qui ont pris la peine de se déplacer un 31 décembre depuis Marrakech ainsi que le Pr. Samir Ahboucha (rapporteur) de

la faculté polydisciplinaire de Khouribga, qui avait la gentillesse d'accepter notre invitation. Votre présence a beaucoup apporté à notre discussion scientifique. Merci également à madame la présidente de jury (et rapporteuse) Pr. Fatihha Chigr, c'était un honneur de vous avoir à la tête du jury de ma thèse.

Ensuite, je remercie chaleureusement toutes les personnes qui m'ont aidé pendant l'élaboration de ma thèse et notamment Dr. Riad Seddik et Dr. Adeline Orts-Del'Imagine qui m'ont initié à la technique du patch clamp qui constitue le socle de mon travail de thèse. Spécialement Riad qui m'a accompagné tout au long de ce projet.

Je remercie également tout le personnel du laboratoire PPSN à Marseille pour leur disponibilité et l'accueil chaleureux que m'ont témoigné. Je remercie Coraline Airault, Dr. Nicolas Wanaverbecq, Nina Jurčic, Christine Cappai, Dr. Adel Derghal, Dr. Lourdes Mounien. Je remercie également mes amis de la Start-up Biomeostasis ; Dr. Thaïs Rouquet et Dr. Clément Pierre.

Ainsi que les membres de l'équipe du laboratoire génie biologique au Maroc, Hafsa, Nabila, Benyamine, Hammou, Fati, Nouhayla, Hicham Chahid et tous les autres sans exception, pour le soutien professionnel et personnel durant ces longues années où on est resté soudés telle une vraie famille.

Sans oublier de remercier une personne qui m'a longtemps inspirée ; Pr. Fatihha Chigr. Une femme que je connais depuis mes premières années à la faculté et qui représente pour moi le modèle à suivre de la femme marocaine moderne. Je vous remercie madame pour tout ce que vous m'avez appris durant toutes ces années d'étude et merci beaucoup car vous étiez toujours là pour moi, pour me soutenir, me conseiller et répondre à toutes mes questions.

Au terme de ce parcours, je remercie enfin celles et ceux qui me sont chers. Leurs attentions et encouragements m'ont accompagné tout au long de ces années. Je suis redevable à mes parents, pour leur soutien moral et matériel et leur confiance indéfectible dans mes choix. Enfin, j'ai une pensée toute particulière pour ma tante, Saadia Mghari, qui s'est investie fortement dans l'élaboration de cette thèse.

RESUME

Mon travail de thèse porte sur l'étude de neurones particuliers localisés autour du canal central, appelés neurones qui contactent le liquide céphalorachidien (NcLCR). Ces neurones présentent en effet une dendrite surmontée d'une protubérance appelée « bud » qui est au contact du liquide céphalorachidien circulant dans le canal central de la moelle épinière. Par ailleurs, ils expriment PKD2L1, un canal cationique non-sélectif de la famille des canaux TRP (« transient receptor potential »), sensible aux variations de pH et d'osmolarité du milieu extracellulaire. Bien que le rôle physiologique des NcLCR reste inconnu, leur morphologie particulière et leur signature moléculaire suggèrent qu'ils forment un système chémosensible permettant ainsi l'analyse de la composition du LCR. Le laboratoire PPSN où j'ai réalisé ma thèse a montré que les NcLCR présents dans le complexe vagal dorsal de souris (CVD, une région bulbaire impliquée dans la régulation de la prise alimentaire) reçoivent des terminaisons synaptiques inhibitrices qui libèrent du GABA et qui activent le récepteur ionotrope GABA_A. Néanmoins, l'action inhibitrice du GABA dans le système nerveux passe aussi par l'activation du récepteur métabotrope GABA_B. Par conséquent, nous avons cherché à savoir si les NcLCR du CVD expriment les récepteurs GABA_B et quels étaient leur fonction ainsi que leur rôle dans la définition de l'excitabilité de ces neurones.

Les récepteurs GABA_B sont formés par l'assemblage hétéromérique des sous-unités GABA_{B1} et GABA_{B2} et leur effet inhibiteur passe par l'activation d'un courant potassique à rectification entrante KIR3 ainsi que par l'inhibition des canaux calciques potentiel dépendants. Avec la technique d'immunofluorescence couplée à l'imagerie confocale, nous avons d'abord montré que les NcLCR expriment la sous-unité GABA_{B1}, suggérant la présence de récepteurs fonctionnels dans ces neurones. Cependant, les enregistrements en patch-clamp ont montré que l'activation des récepteurs GABA_B post-synaptiques localisés dans les NcLCR n'induit pas de courant potassique Kir3. Par ailleurs, nous avons montré que les récepteurs GABA_B sont aussi localisés pré-synaptiquement sur les terminaisons GABAergiques où leur activation diminue la libération de GABA.

Abstract

Medullo-spinal cerebrospinal fluid contacting neurons (CSF-cN) exist in all vertebrates. These neurons are located in the subependymal region of the central canal and are in contact with the CSF. They may analyze the composition of the CSF or detect the movement of CSF circulating in the central canal. These are the two main hypotheses concerning the properties of these neurons but those remain to be proven and overall their functions are still unknown. These neurons express PKD2L1, a non selective cationic channel member of the TRP family which is regulated by calcium, protons and osmolality. Previous works done in my laboratory have shown that CSF-cN recorded from acute brainstem slice prepared from adult PKD2L1: EGFP mice, can indeed detect alkalization and change in osmolarity reinforcing the idea that these neurons have chemosensitive capacities.

GABA is the main inhibitory neurotransmitters in the central nervous system and acts through ionotropic GABA_A and metabotropic GABA_B receptors. We have demonstrated that CSF-cN exhibit synaptic activity mediated by GABA_A/Cl⁻ ionotropic receptors and here, I will present evidence for the presence of GABA_B receptors. Using the whole cell configuration of the patch clamp technique, I show that application of 100μM (-) baclofen, a selective agonist for GABA_B receptors, induced an outward current in CSF-cN held at -50 mV and hyperpolarized CSF-cN under current clamp mode. This current is due to the activation of Kir3, an inward potassium rectifier which is blocked by barium. I investigate also if baclofen also has presynaptic effect by evaluating its action on GABA_A mediated synaptic current. Kir3 is modulated by G protein (Gi/Go) coupled receptors such as GABA_B.

Tables des matières

I.	INTRODUCTION	1
II.	LE SYSTEME DES NEURONES CONTACTANT LE LIQUIDE CEPHALORACHIDIEN	3
A.	Liquide céphalo rachidien et région épendymaire	3
1.	Composition du liquide céphalorachidien et ses variations.....	8
2.	Différentes interactions entre le liquide céphalorachidien et le système nerveux central	10
3.	Populations cellulaires autour du canal central	11
B.	Origine et conservation des NcLCR chez les vertébrés	13
C.	Morphologie des neurones contactant le LCR	16
1.	Caractéristiques de l'extension apicale des neurones contactant le liquide céphalorachidien	16
2.	Projections axonales des neurones contactant le LCR	19
D.	Distribution et développement des neurones contactant le LCR	21
E.	Phénotypes des NcLCR bulbo-spinaux.....	24
1.	GABA marqueur moléculaire des NcLCR.....	24
2.	Autres phénotypes moléculaires des NcLCR	26
3.	Récepteurs des NcLCR.....	31
4.	PKD2L1, un marqueur sélectif des NcLCR	35
5.	Expression des marqueurs de plasticité dans les NcLCR.....	37
F.	Fonctions physiologiques des NcLCR	39
1.	Les NcLCR constituent une interface sensorielle entre le LCR et le SNC	39
2.	Propriétés sécrétoires de NcLCR.....	42
3.	Rôle des NcLCR dans le circuit moteur	43
G.	Propriétés électrophysiologiques.....	44

III.	LE RECEPTEUR GABA _B	45
A.	Structure du récepteur GABA _B	48
1.	Appartenance à la famille 3 (ou C) des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) 48	
2.	Récepteurs hétérodimères.....	49
3.	Le nécessaire couplage entre GABA _{B1} et GABA _{B2}	50
B.	Distribution des récepteurs GABA _B dans le système nerveux central.....	54
C.	Pharmacologie du récepteur	55
1.	Aperçu historique sur le récepteur GABA _B	55
2.	Introduction à la pharmacologie du récepteur GABA _B	56
3.	Agonistes des récepteurs GABA _B	58
4.	Antagonistes des récepteurs GABA _B	63
D.	Les effecteurs	68
1.	Protéines G	68
2.	Adénylyl cyclase.....	69
3.	Canaux calciques potentiel dépendants	70
4.	KIR3, canal potassique rectifiant entrant	70
E.	Rôles physiologiques du GABA _B et ses implications cliniques	73
1.	Importance thérapeutique potentielle des ligands des récepteurs GABA _B 73	
2.	Nociception.....	74
3.	Cognition	75
4.	Toxicomanie	76
5.	Absences épileptiques.....	77
6.	Prise alimentaire	78
7.	Dépression et anxiété.....	78
8.	Autres actions	79
IV.	COMPLEXE VAGAL DORSAL.....	79

V.	MATERIELS ET METHODES	82
A.	Animaux	82
B.	Immunohistofluorescence:	84
1.	Protocole des doubles immunomarquage GABA _{B1} /PKD2L1 et GABA _{B2} /EGFP:.....	84
2.	Acquisition des images:.....	86
C.	Electrophysiologie:.....	87
1.	Préparation des solutions:.....	87
2.	Préparation des tranches:	89
3.	Patch clamp.....	91
4.	Déroulement des expérimentations:	95
5.	Mesure des propriétés passives des NcLCR.....	96
6.	Enregistrement des canaux potassiques à rectification entrante (GIRK/KIR3) dans les NcLCR :	96
7.	Enregistrement des courants synaptiques dans les NcLCR :.....	97
VI.	RESULTATS	99
VII.	DISCUSSION GENERALE DES RESULTATS.....	113
VIII.	CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	121
IX.	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	124
X.	Annexes 1: A single polycystic kidney disease 2-like 1 channel opening acts as a spike generator in cerebrospinal fluid-contacting neurons of adult mouse brainstem.....	154
XI.	Annexes 2: TRACE ELEMENTS DISTRIBUTION IN THE BRAIN OF STRESSED RATS.....	172
XII.	Annexes 3: GABAB receptors modulate Ca ²⁺ but not G protein-gated inwardly rectifying K ⁺ channels in cerebrospinal-fluid contacting neurones of mouse brainstem	182

Tables des illustrations

Figure II.1. Système ventriculaire et le liquide céphalorachidien	4
Figure II.2. Représentation classique de la circulation du CSF dans le SNC	5
Figure II.3. Nouveau modèle de la circulation des fluides dans le cerveau.....	6
Figure II.4. Nouveau concept de circulation du LCR dans le SNC	7
Figure II.5. Illustration schématique de la population cellulaire autour du canal central.....	12
Figure II.6: Caractéristiques générales des neurones contactant le liquide céphalorachidien	14
Figure II.7: Illustration des projections axonales des NcLCR.....	15
Figure II.8. Diversité dans les extensions des NcLCR chez différentes espèces.....	17
Figure II.9: schéma de la diversité de la cilliatures des NcLCR.....	19
Figure II.10: Comparaison des axones des NcLCR ventraux et dorsaux	20
Figure II.11. Distribution des NcLCR dans le système nerveux central	22
Figure II.12. Développement des NcLCR en fonction de l'âge	23
Figure II.13. Le GABA est un marqueur moléculaire des NcLCR	25
Figure II.14. Localisation du glutamate et de la glycine dans les NcLCR	26
Figure II.15. Identification de la sérotonine et de la dopamine dans les NcLCR, révèlent l'existence de populations distinctes au sein de ces neurones.	28
Figure II.16. Expression de la somatostatine dans les NcLCR chez la lamproie.	30
Figure II.17. Le récepteur GABA _A et le récepteur de la glycine ont un effet inhibiteur dans les NcLCR.....	32
Figure II.18. Les NcLCR expriment les récepteurs d'acétylcholine et AMPA/Kainate du glutamate.....	33
Figure II.19. l'activité électrophysiologique spontanée d'un NcLCR	34
Figure II.20. Expression du canal PKD2L1 dans les NcLCR.....	36
Figure II.21. PKD2L1 est un générateur de PA dans les NcLCR.....	37
Figure II.22. Les NcLCR expriment différents marqueurs de maturité et d'immaturité.....	38
Figure II.23. Rôle des NcLCR dans l'arc de réflexe moto sensoriel dans la moelle épinière.	39
Figure II.24. les canaux PKD2L1 sont sensibles aux variations de pH et aux mouvements.	41
Figure II.25. Expression du récepteur P2X2 de l'ATP dans les NcLCR	42

Figure II.26. Exemple de l'action des NcLCR dans le processus de locomotion chez le <i>zebrafish</i>	44
Figure II.27. Profil de décharge neuronale des NcLCR.....	45
Figure III.1. Représentation schématique avec les deux types de récepteurs GABA.....	46
Figure III.2. Classification des RCPG	48
Figure III.3. Le récepteur GABAB est un RCPG de classe C	49
Figure III.4. Représentation des domaines structurels composant le récepteur GABAB.....	50
Figure III.5. Mécanisme interactionnel des sous-unités GABA _{B1} et GABA _{B2}	52
Figure III.6 ; Formalisation d'une interface de contact	53
Figure III.7: Distribution des sous-unités du récepteur GABA _B dans le cerveau.....	54
Figure III.8. Insensibilité du GABA à la Bicuculline	55
Figure III.9. L'agoniste spécifique aux RCPG GABA _B ; le baclofène et ses antagonistes (phaclofène et Saclofène).....	56
Figure III.10. Structures de certains agonistes et antagonistes du récepteur GABA _B	57
Figure III.11. Structures des agonistes des récepteurs GABA _B	59
Figure III.12. Structures de deux agonistes partiels du récepteur GABA _B	62
Figure III.13. Structures des antagonistes du récepteur GABA _B de première génération.....	63
Figure III.14. Structures d'antagonistes du récepteur GABA _B de deuxième génération	65
Figure III.15. Le récepteur GABA _B module plusieurs effecteurs.....	68
Figure III.16. Vue schématique des étapes membranaires de transduction du signal par les RCPG après activation par un ligand agoniste.	69
Figure III.17. Arbre phylogénétique représentant les sous-familles des canaux Kir.....	71
Figure III.18. Les KIR3 sont activés par le baclofène et bloqués par le barium	72
Figure IV.1: Organisation du complexe vagal dorsal	80
Figure V.1. Production des souris PKD2L1: EGFP	83
Figure V.2. Etapes de préparation des tranches pour l'étude électrophysiologique.....	90
Figure V.3. Matériels utilisés lors de la préparation des tranches	91
Figure V.4. Différentes configurations du patch clamp.....	93
Figure V.5. Localisation des NcLCR autour du canal central en vue d'un enregistrement patch clamp	94
Figure V.6. Dispositif de microscopie relié à la technique du « patch clamp »	95
Figure V.7. Tests électrophysiologiques postsynaptiques	97
Figure V.8. Protocole des tests électrophysiologiques présynaptiques	98
Figure VI.1: Les NcLCR expriment la sous-unité GABA _{B1}	100

Figure VI.2: Expression de la sous-unité GABAB2 dans les NcLCR.....	101
Figure VI.3: Effet du baclofène sur les NcLCR et les DMNX.....	103
Figure VI.4: Effet du baclofène sur les CPSI évoqués dans les NcLCR.....	105
Figure VI.6: Effet du baclofène sur les CPSE évoqués dans les NcLCR.....	107
Figure VI.7 Baclofène augmente le PPR dans les CPSI et CPSE.....	109
Figure VI.8 Effet du baclofène sur la cinétique des CPSI et CPSE.....	110
Figure VII.1: Protocoles électrophysiologiques de la mise en évidence des canaux KIR via le propanol-1 et le barium.....	116
Figure VII.2: Résultat préliminaires de la caractérisation postsynaptique des récepteurs NPY.....	120
Figure VIII.1: DTA supprime les NcLCR dans les souris CRE ⁺ /DTA ⁺	122
Figure VIII.2: Test pour évaluation du rôle des NcLCR dans la régulation de la prise alimentaire.....	123

Tableaux

Tableau II.1.Comparaison entre la composition du plasma et du liquide céphalorachidien ...	8
Tableau II.2. Exemples des neurotransmetteurs et hormones présents dans le LCR	11
Tableau III.1. Variété de récepteurs métabotropiques de différents neurotransmetteurs	46
Tableau III.2: Agonistes et antagonistes du récepteurs GABA _B	67
Tableau V.1. Les anticorps utilisés lors de la double immunohistofluorescence afin de localiser les sous-unités GABA _{B1} et GABA _{B2} dans les NcLCR :	84
Tableau V.2. Protocole d'immunomarquage PKD2L1/GABA _{B1} :	86
Tableau V.3. Composition de la solution de coupe	88
Tableau V.4. Composition de la solution d'enregistrement et récupération	88
Tableau V.5. Composition des solutions intra pipette	92
Tableau VI.1: Effet du baclofène sur les propriétés électrophysiologiques des NcLCR.....	102

Abréviations

AADC: décarboxylase des acides L-aminés aromatiques	KIR3: canal potassique à rectification entrante de type 3
AC: adénylyl cyclase	LCR: liquide céphalo-rachidien
ACSF: liquide céphalo-rachidien artificiel	LCRa: liquide céphalo-rachidien artificiel
AMPc : adénosine monophosphate cyclique	LCSa : liquide céphalo-spinal
ASICs : canaux ioniques sensibles à l'acide	MAP2: protéine associée aux microtubules 2
BHE : barrière hémato-encéphalique	mGlu: récepteurs métabotropiques du glutamate
BSA: albumine de sérum bovin	NcLCR : neurones contactant le liquide céphalo-rachidien
cc: canal central	NDS: sérum d'âne normal
CCK : La cholécystokinine	NGF: Facteur de croissance des nerfs
CPSE : courant post-synaptique excitateur	NPY: neuropeptide Y
CPSI : courant post-synaptique inhibiteur	NT: neurotransmetteur
CVD: complexe vagal dorsal	PA : potentiels d'action
EGFP ou GFP: protéine fluorescente verte	PKD2: polycystine de type 2
FGF-2 : facteur de croissance de fibroblaste 2	PKD2L1: polycystine de type 2-like 1
GABA: acide γ -aminobutyrique	PTX : toxine pertussis
GABA_A ou R-GABA_A: récepteur acide γ -aminobutyrique de type A	RCPG : récepteurs couplés aux protéines G
GAD: glutamate décarboxylase	RER : réticulum endoplasmique rugueux
GFAP: protéine acide fibrillaire gliale	Rf : fibre de Reissner
GnRH: hormone libérant de la gonadotrophine	R-GABA_B ou GABA_B: récepteur de l'acide γ -aminobutyrique de type B
G-protein: protéine de liaison à la guanine	rm : résistance membranaire
GTP : guanosine triphosphate	rs : résistance série
Igf2 : facteur de croissance insuline-like 2	SAS : espace subarachnoïdien
KA: cellules Kolmer-Agduhr	SCO : organe subcommissural
KCC1: cotransporteurs potassium-chlorure 1	
KCC2: cotransporteurs potassium-chlorure 2	

Slicing solution: solution de coupe

SNC : système nerveux central

TH: tyrosine hydroxylase

TRP: canaux à potentiel de récepteur transitoire

TRPP : polycistine à potentiel de récepteur transitoire

VFT : Vénus attrape-mouche

VGAT : transporteur vésiculaire du GABA

VGLUT : transporteur vésiculaire du glutamate

Vh: potentiel imposé

VRS: espace Robin Virchow

Y1 : Récepteur NPY du type 1

I. INTRODUCTION

Les neurones contactant le liquide céphalorachidien (NcLCR) dans la zone bulbo-spinale sont caractérisés par une morphologie particulière, un petit soma qui s'étend, à son niveau apical, en une terminaison dendritique terminée par une protubérance appelée bud. Cette extension rentre en contact avec le LCR, d'où la singularité de ces neurones. Ils sont caractérisés par l'expression d'un canal cationique non sélectif, PKD2L1, qui est responsable, au côté des canaux ASIC (*Acid-sensing ion channel*), de la génération de potentiels d'action dans les NcLCR (Orts-Del'Immagine et al. 2016). Ils sont également régulés par des récepteurs ionotropiques tels que les récepteurs GABA_A ou encore ceux de la glycine, exprimés à leurs surfaces (Orts-Del'immagine et al. 2012). Par contre et à ce jour, aucune modulation métabotrope de ces neurones n'a été mise en évidence. Ils se caractérisent de surcroît par une maturation particulière au stade adulte, puisqu'ils co-expriment, simultanément, des marqueurs de maturité et d'immaturité (Orts-Del'immagine et al. 2014). Dans cette étude, nous avons décidé d'explorer la voie de modulation métabotrope dans NcLCR, en commençant par la caractérisation des récepteurs GABA_B dans ces neurones.

Ces récepteurs de l'acide γ -aminobutyrique de type B (GABA_B) sont omniprésents dans le SNC, et jouent un rôle très important pour l'inhibition lente dans celui-ci. Ils font également partie des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), qui s'imposent comme la plus grande famille des récepteurs membranaires. Ils sont impliqués dans des processus multiples tels que la nociception, la dépression ou encore la régulation de la prise alimentaire, ce qui font d'eux une cible privilégiée de recherches pharmaceutiques.

Classiquement, les récepteurs GABA-B peuvent être localisés au niveau pré et post synaptique. Au niveau postsynaptique, les récepteurs GABA-B sont couplés négativement aux canaux calciques voltages dépendants et positivement à des canaux potassiques appelés KIR, nous avons donc exploré ces voies de couplage. A un niveau présynaptique, leur activation entraîne une inhibition de la libération de neurotransmetteur. Nous avons recherché également si l'activation de ces récepteurs pouvait conduire à une neurotransmission notamment GABAergique qui s'exerce sur les NcLCR.

Afin de répondre à ces questions, nous avons adopté deux approches. Premièrement, l'immunofluorescence qui a été utilisée pour localiser les R-GABA_B sur la membrane des NcLCR. Deuxièmement, nous avons utilisé la technique du patch-clamp pour évaluer les

conséquences de l'activation de ces récepteurs sur les propriétés électrophysiologiques des NcLCR.

Avant de présenter l'essentiel de nos travaux, nous nous attellerons dans un premier temps à reporter les spécificités des NcLCR, leurs propriétés et leur fonctionnement, ainsi que toutes les informations dont nous disposons en relation avec ces neurones jusqu'à présent (II). Sur la même lignée, nous passerons en revue lors de cette analyse bibliographique, l'autre acteur majeur en l'occurrence le récepteur GABA_B. Il sera ainsi question de ses caractéristiques pharmacochimiques et son rôle dans le SNC, données qui ont orienté fortement son investigation (III). La partie méthodologique sera dédiée aux différentes approches que nous avons déployées pour cette étude (IV). Le chapitre suivant comportera les résultats (V) et qui seront discutés ensuite dans le cadre d'une discussion générale (VI). L'ensemble se terminera par une conclusion avec une ouverture sur les différentes perspectives de ce projet (VII).

Analyse bibliographique

II. LE SYSTEME DES NEURONES CONTACTANT LE LIQUIDE CEPHALORACHIDIEN

Les neurones contactant le liquide céphalorachidien, objet du présent travail, constituent une population neuronale distincte, située autour du canal central chez tous les vertébrés. Ils ont une morphologie atypique et caractérisée par la projection d'une terminaison dendritique qui se termine par un bud en contact du liquide céphalorachidien. Ci-après, dans cette revue bibliographique, nous développerons les parties relatives à la composition du liquide céphalorachidien et ses différents rôles au sein du SNC, à la nature des populations cellulaires qui bordent le canal central (A) à la population neuronale distincte, les NcLCR, leur origine, leur développement et leur conservation chez les vertébrés) (B). Ensuite, nous nous focaliserons sur les NcLCR pour aborder leur morphologie (C), leur distribution (D), leurs phénotypes (E) et enfin leurs fonctions physiologiques dans le SNC (F).

A. Liquide céphalo rachidien et région épendymaire

Chez les mammifères, le liquide céphalorachidien (LCR) est un liquide physiologique incolore sécrété majoritairement par les plexus choroïdes (80%) et présent dans les cavités cérébrales (figure II.1). Le plexus choroïde est un tissu très vascularisé qui tapisse la paroi des ventricules à la jonction entre les deux ventricules latéraux et le troisième ventricule du cerveau ainsi que le toit quatrième ventricule. Ce sont à ces endroits que le plasma est filtré par les plexus choroïdes et que le LCR est sécrété dans les ventricules (Pollay and Curl 1967; O'Connell 1970; Brinker et al. 2014).

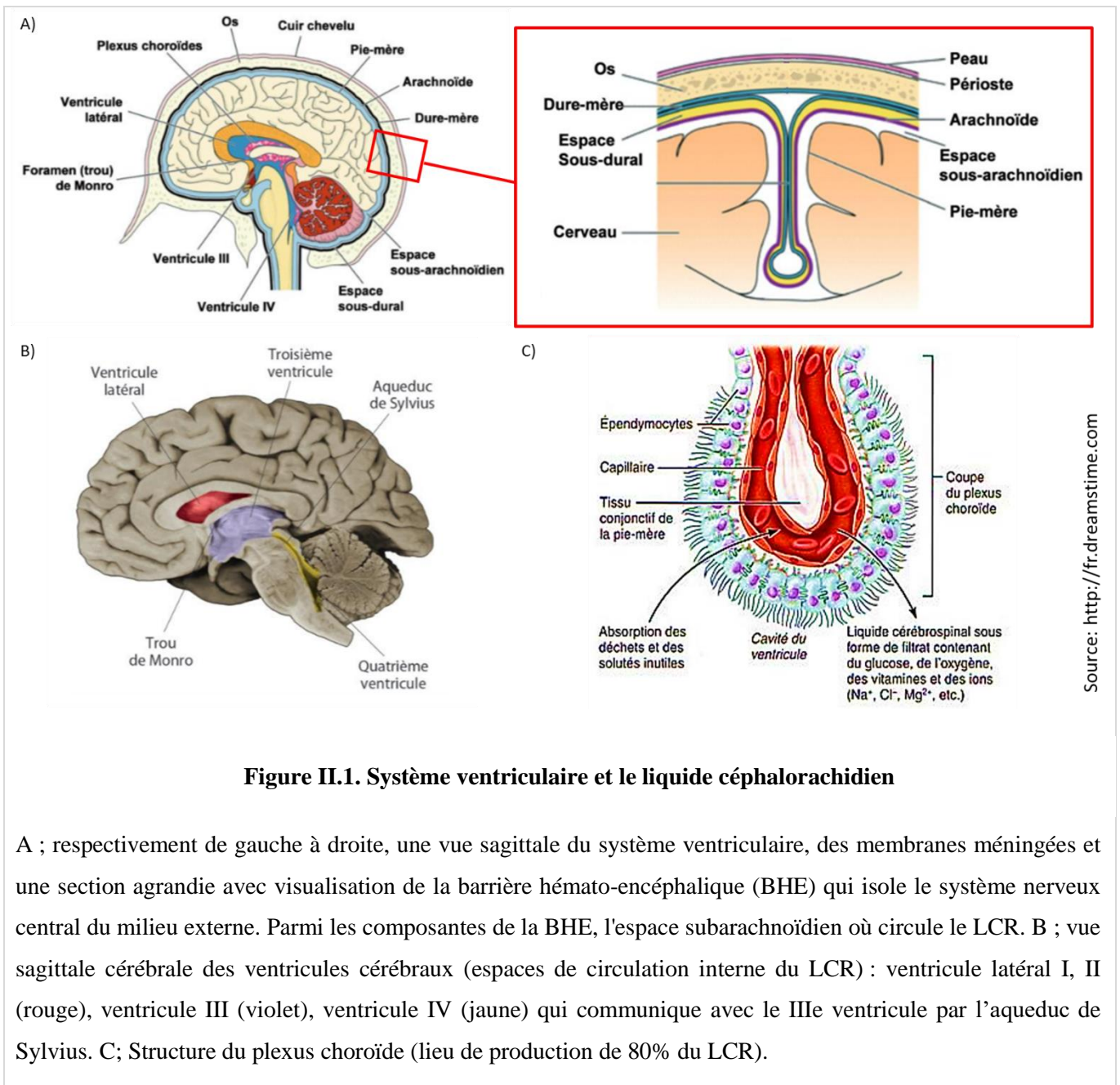


Figure II.1. Système ventriculaire et le liquide céphalorachidien

A ; respectivement de gauche à droite, une vue sagittale du système ventriculaire, des membranes méningées et une section agrandie avec visualisation de la barrière hémato-encéphalique (BHE) qui isole le système nerveux central du milieu externe. Parmi les composantes de la BHE, l'espace subarachnoïdien où circule le LCR. B ; vue sagittale cérébrale des ventricules cérébraux (espaces de circulation interne du LCR) : ventricule latéral I, II (rouge), ventricule III (violet), ventricule IV (jaune) qui communique avec le IIIe ventricule par l'aqueduc de Sylvius. C; Structure du plexus choroïde (lieu de production de 80% du LCR).

Le LCR circule dans les ventricules, l'espace sub-arachnoïdien qui entoure le cerveau et dans le canal central (figures II.1 et II.2).

Le concept classique de la circulation du LCR décrit un mouvement de fluide à travers les ventricules cérébraux, les citernes et l'espace subarachnoïdien (SAS: *Subarachno dien space*) avant d'être réabsorbé dans le sang par les villosités arachnoïdiennes (Black 1999; Pardridge 2011) (figure II.2).

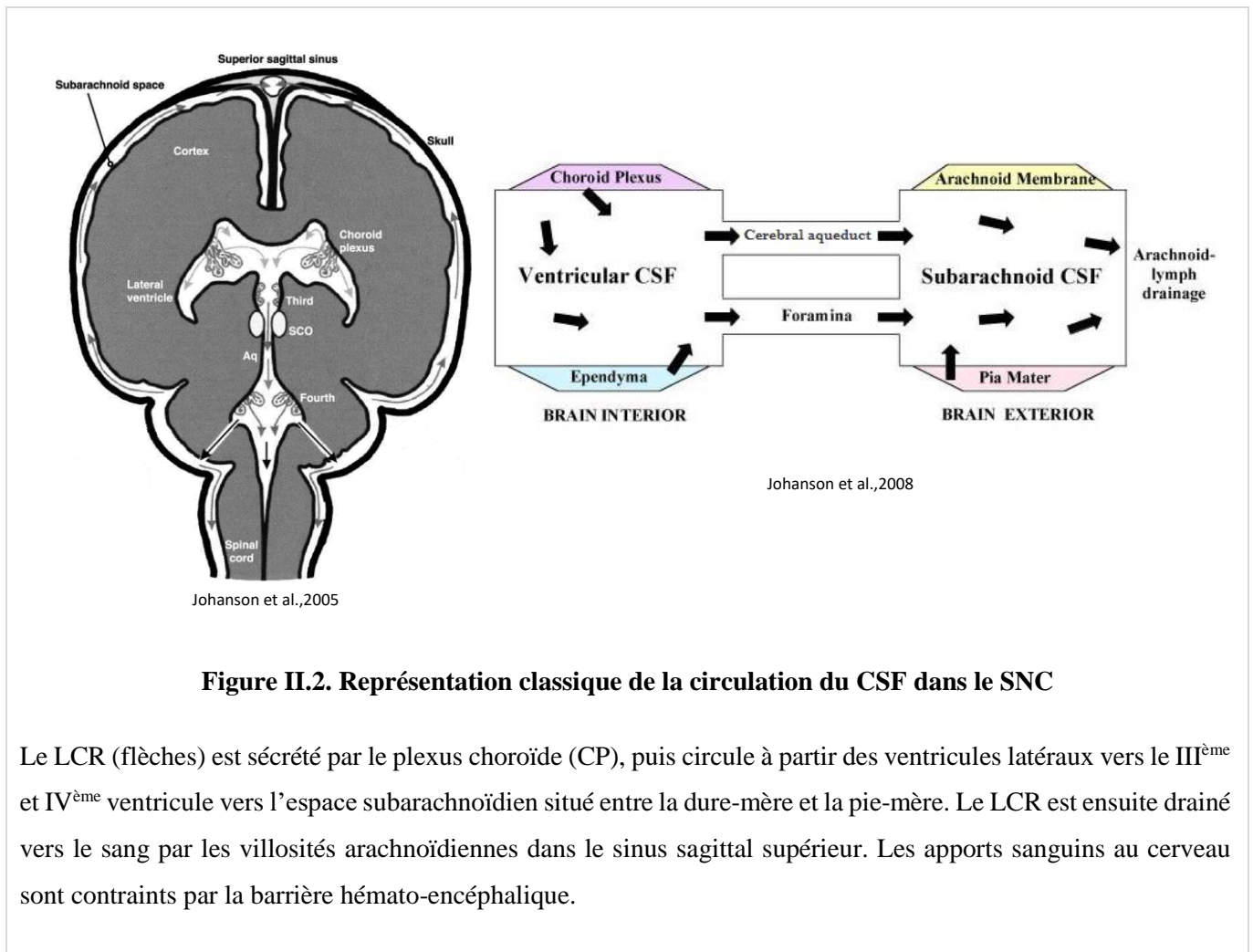


Figure II.2. Représentation classique de la circulation du LCR dans le SNC

Le LCR (flèches) est sécrété par le plexus choroïde (CP), puis circule à partir des ventricules latéraux vers le III^{ème} et IV^{ème} ventricule vers l'espace subarachnoïdien situé entre la dure-mère et la pie-mère. Le LCR est ensuite drainé vers le sang par les villosités arachnoïdiennes dans le sinus sagittal supérieur. Les apports sanguins au cerveau sont contraints par la barrière hémato-encéphalique.

L'hypothèse précédente néglige un élément important dans la circulation du LCR qui est l'espace de Robin-Virchow (VRS: *Virchow Robin space*). Le VRS est un espace périventriculaire qui entoure les vaisseaux sanguins (artérioles et veinules) qui arrivent dans le tissu nerveux en traversant l'espace subarachnoïdien (Brinker et al. 2014; Nakada 2014) (figure II.3A).

Le VRS est séparé de l'espace subarachnoïdien par la pie-mère, d'où la possibilité d'un échange entre les deux milieux (figure II.3B), qui donne lieu à un nouveau schéma de la circulation du LCR dans le cerveau (figure II.4).

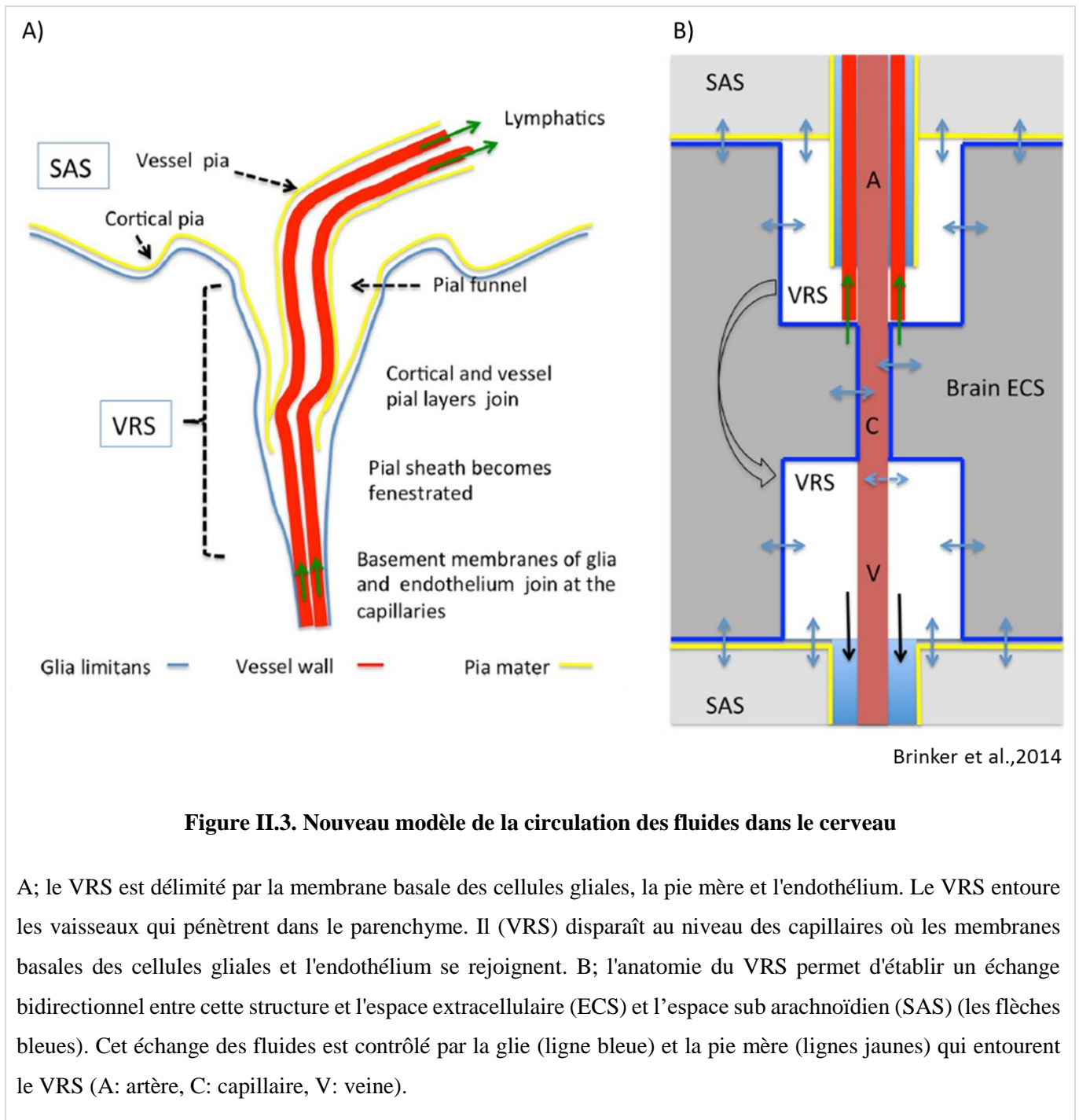


Figure II.3. Nouveau modèle de la circulation des fluides dans le cerveau

A; le VRS est délimité par la membrane basale des cellules gliales, la pie mère et l'endothélium. Le VRS entoure les vaisseaux qui pénètrent dans le parenchyme. Il (VRS) disparaît au niveau des capillaires où les membranes basales des cellules gliales et l'endothélium se rejoignent. B; l'anatomie du VRS permet d'établir un échange bidirectionnel entre cette structure et l'espace extracellulaire (ECS) et l'espace sub arachnoïdien (SAS) (les flèches bleues). Cet échange des fluides est contrôlé par la glie (ligne bleue) et la pie mère (lignes jaunes) qui entourent le VRS (A: artère, C: capillaire, V: veine).

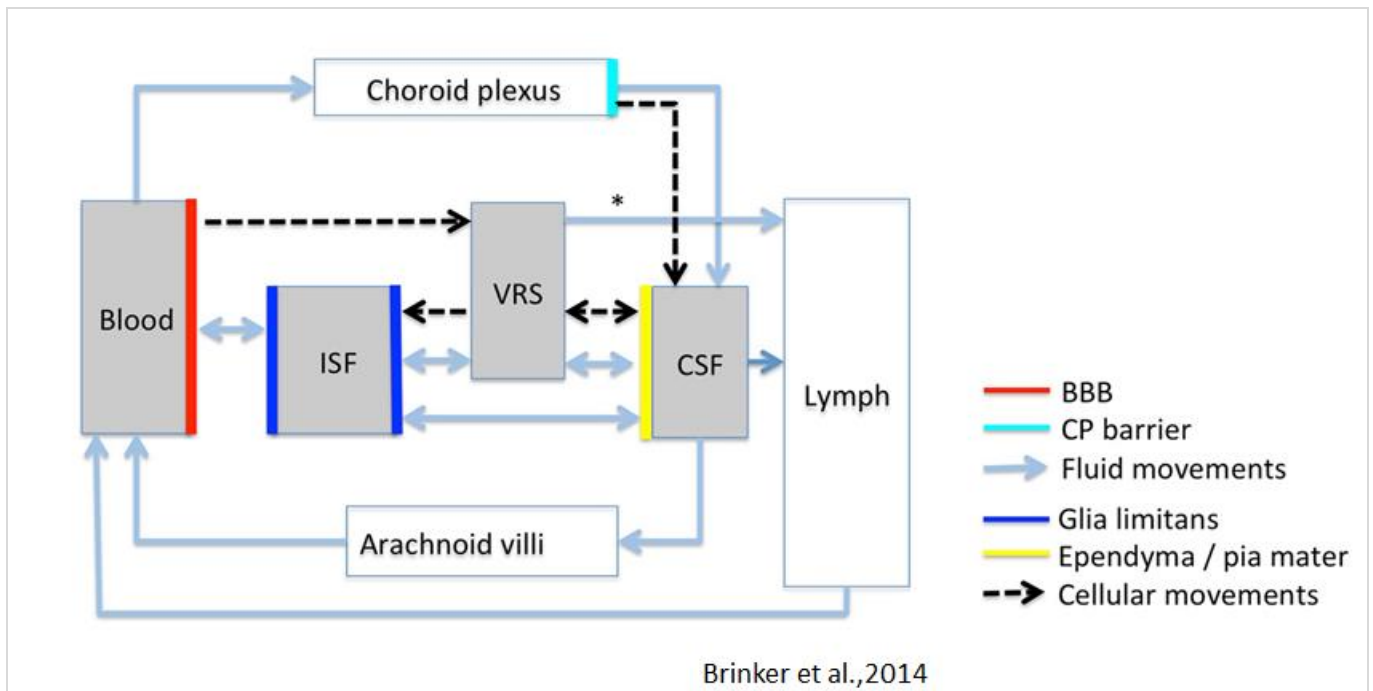


Figure II.4. Nouveau concept de circulation du LCR dans le SNC

Ce diagramme résume les mouvements des liquides et cellules à travers les différentes barrières et compartiments cérébraux (le sang, le liquide interstitiel, l'espace Virchow Robin (VRS), les cavités du SNC dont les ventricules cérébraux, citernes basales et l'espace subarachnoïdal cortical).

- Les échanges des liquides à travers la barrière gliale, la barrière endothéliale et la barrière du plexus choroïde sont contrôlés par plusieurs transporteurs tels que l'aquaporine.
- Le taux d'échanges bidirectionnels des fluides générés au niveau des glies, de l'endothélium et la barrière piale dépassent largement le taux de production du LCR dans les PC.
- Le plexus choroïde représente le seul lieu de communication directe entre le sang et le compartiment LCR.
- La majeure partie de l'eau dans le cerveau est parvenue dans le milieu lymphatique cervical via le VRS et le compartiment LCR.
- Les cellules inflammatoires transportées par le sang passent dans le cerveau à travers les veinules du VRS ou le plexus choroïde.
- Les fluides traversent les barrières en suivant les gradients osmotiques et hydrostatiques ou par des processus de transports actifs.
- Les mouvements des fluides à l'intérieur et à l'extérieur du VRS dépendent des pulsations de pression respiratoires et cardiaques.

(ISF: fluide interstitiel; BBB: Barrière hématoencéphalique, CP: Plexus choroïde)

1. Composition du liquide céphalorachidien et ses variations

Bien que le LCR soit décrit comme étant un filtrat du plasma, sa composition diffère de ce dernier. Une comparaison entre la composition de ces deux fluides biologiques est présentée dans le tableau I.1.

Tableau II.1. Comparaison entre la composition du plasma et du liquide céphalorachidien

	Plasma	LCR
Na ⁺	150 mmol/l	147 mmol/l
K ⁺	4,6 mmol/l	2,8 mmol/l
Ca ⁺⁺	1,8 mmol/l	1,1 mmol/l
Cl ⁻	115 mmol/l	130 mmol/l
HCO ₃ ⁻	26 mmol/l	22 mmol/l
pH	7,4	7,3
PCO ₂	45 mmHg	50 mmHg
Protéines	8 g/100ml	0,02 g/100ml
Glucose	0,7 – 1,1 g/l (Glycémie normale)	0,4 – 0,8 g/l (Glycorachie normale)

(Adapté de la source : http://umvf.cerimes.fr/media/ressWikinu/Neurophysiologie/Neurophysiologie_UPMC/2007-neurophysio-LCR-jfv.pdf)

Le LCR renferme une concentration élevée en ions, et contient des polypeptides qui traversent la barrière hémato-encéphalique, également des peptides et des centaines de protéines présentes en faibles concentrations (200-700µg de protéines/ml), incluant des régulateurs de la pression osmotique, des protéines à liaison aux hormones, des régulateurs de métabolisme lipidique, des composants de la matrice extracellulaire et diverses enzymes (Gato et al. 2004; Leary Swan et al. 2009; Parada et al. 2005, 2006). De même, d'autres facteurs ont été identifiés dans le LCR comme le facteur de croissance des nerfs (NGF : *Nerve growth factor*)

(Kasaian and Neet 1989) ; des marqueurs d'inflammation tel que le facteur de croissance transformant alpha (TGF- α : *transforming growth factor alpha*) (Van Setten et al. 1999). Il existe aussi des hormones libérées dans le LCR, dont la mélatonine sécrétée par la glande pinéale dans le troisième ventricule (Skinner and Malpoux 1999) et l'hormone de libération des gonadotrophines appelée aussi parfois lulibérine (GnRH : *gonadotropin releasing hormone*) qui provient de l'éminence médiane et probablement aussi de l'organe vasculaire de la lame terminale (*organum vasculosum du lamina terminalis*), l'un des organes circumventriculaires dont la barrière hémato-encéphalique (BHE) est lâche (Skinner et al. 1997).

Il est à noter que la composition du LCR varie selon l'activité sécrétoire des tissus cérébraux environnants (Reiber 2003; Skipor and Thiery 2008). Ainsi, l'organe sous-commissural (SCO : *subcommissural organ*), une petite glande située dans la région dorsocaudale du troisième ventricule, sécrète une protéine appelée la spondine qui s'agrège pour former la fibre de Reissner (Rf). Cette dernière s'étend du SCO jusqu'à l'extrémité caudale de la moelle épinière (Chodobski and Szmydynger-Chodobska 2001; Pérez et al. 1996; Vio et al. 2008). La Rf a une importance majeure durant la phase embryonnaire (Pérez-Fígares et al. 2001; Caprile et al. 2003). Elle participe aussi à l'épuration du LCR, grâce à ses résidus d'acide sialique chargés négativement qui fixent les amines biogènes présentes dans le LCR telles que la dopamine, la sérotonine ou la noradrénaline contrôlant ainsi leurs concentrations (Vio et al. 2008; Rodríguez, Oksche, et Montecinos, s. d. 2001). En l'absence de Rf, la concentration de monoamines dans le LCR augmente fortement (Hoyo-Becerra et al. 2006).

La Rf est impliquée dans le maintien de la circulation du LCR, elle assure l'ouverture de l'aqueduc de Sylvius. Le déficit de circulation du LCR entre le troisième et le quatrième ventricules, appelé sténose de l'aqueduc de Sylvius, est considéré comme la principale cause de l'hydrocéphalie (Overholser et al. 1954). Il est intéressant de noter dans ce sens que des investigations d'ordre embryologique, réalisées chez des souris sauvages et des souris mutantes pour la SCO-spondine atteintes d'une hydrocéphalie obstructive¹ ont montré que les souris mutantes présentent les premiers symptômes de l'hydrocéphalie bien avant la sténose. Ceci plaide en faveur de l'implication de cette protéine dans le développement de la pathologie. Cependant les mécanismes et le rôle joué par cette protéine dans le processus de l'hydrocéphalie restent à définir (Meiniel, 2007).

¹ Hydrocéphalie obstructive est due au blocage du flux du LCR dans les ventricules cérébraux ce qui peut augmenter la pression intracrânienne et causer la mort dans certains cas.

2. Différentes interactions entre le liquide céphalorachidien et le système nerveux central

Plusieurs hypothèses concernant le rôle du LCR ont surgi, la première l'était par rapport à sa position autour du système nerveux. Les anatomistes ont ainsi supposé un rôle de protection hydromécanique du système nerveux central par le LCR (Davson et al. 1962; Di Terlizzi & Platt 2006; Iliff et al. 2012).

La deuxième hypothèse concernait le rôle du LCR dans le transport des substances nutritives importantes comme le glucose (Agnati et al. 1995; Ferguson et al. 1991; Nicholson 1999) et l'acheminement des produits sécrétés par le plexus choroïdes vers leurs sites d'action (Chodobski & Szmydynger-Chodobska 2001).

Récemment, il a été démontré que lors du sommeil, le taux d'échange entre le LCR et le liquide interstitiel augmente (Xie et al. 2013). Cet échange favorise les flux d'évacuation des β -amyloïdes endogènes de l'espace interstitiel, suggérant ainsi que le LCR élimine des produits neurotoxiques assurant ainsi la purification du liquide interstitiel pendant le sommeil (Xie et al. 2013).

Les études s'intéressant aux stades embryonnaires chez le poussin ont montré que le LCR embryonnaire (e-LCR) a induit la survie des cellules souches neuroépithéliales et a incité leur prolifération et leur neurogenèse (Gato et al. 2005) et que cet effet continu au cours de la croissance grâce au facteur de croissance de fibroblaste 2 (FGF-2) (Martin & Groves 2006). Des études similaires menées chez le rat, ont également appuyé le fait que les cellules corticales survivent et prolifèrent dans le e-LCR (Miyani et al. 2006) et aussi que LCR fournit une niche proliférative pour d'autres cellules souches neurales suite à la présence du facteur de croissance insuline-like (Igf2) (Lehtinen & Walsh 2011; Lehtinen et al. 2011).

Chez la souris adulte, le LCR est impliqué dans la migration neurale, et ceci à travers son guidage (orientation) des neuroblastes depuis les ventricules latéraux au bulbe olfactif en créant un gradient de facteurs chemorépulseurs dans le cerveau (Sawamoto et al. 2006). Ces différentes modulations suggèrent une communication directe entre les récepteurs du SNC et le LCR.

D'autres études ont rapporté que le LCR module les fonctions du SNC en assurant un mode de transmission non-synaptique, via les grands volumes de substances neuro-actives comme les neurotransmetteurs, neuromodulateurs et neuropeptides (sérotonine, dopamine, noradrénaline, vasopressine, β -endorphine et ocytocine) qu'il transporte pour de longues distances.

Le tableau suivant (tableau I.2) résume l'essentiel des neurotransmetteurs et hormones rencontrés dans le LCR :

Tableau II.2. Exemples des neurotransmetteurs et hormones présents dans le LCR

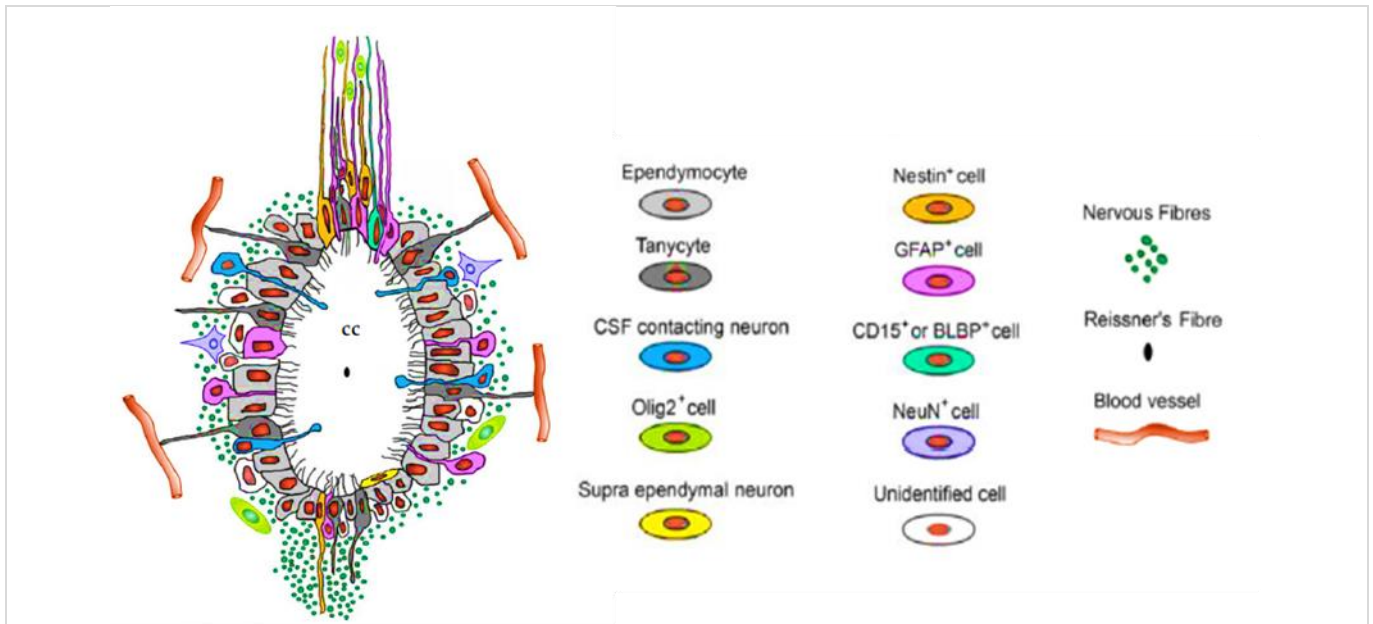
	LCR
GABA (nM)*	219 à 275
Glutamate (μ M) **	17
Glycine (μ M) **	6
Acétylcholine (nM) **	45
Noradrénaline (pM) **	615
ATP (nM) **	16
Leptine (pM)*	6,25
NPY (pM)*	0,5
α -MSH (pM)*	0,12
CCK (pM)*	1,15

(* chez les rongeurs ; ** chez l'homme)(Source : données recueillies dans la littérature)

3. Populations cellulaires autour du canal central

Les ventricules cérébraux et le canal central de la moelle épinière sont tapissés d'une couche cellulaire hétérogène, principalement composée de cellules épendymaires et de plusieurs

types de cellules subépendymaires, qui expriment des marqueurs, des morphologies et des fonctions très particulières (figure II.5).



Hugnot et al, 2011

Figure II.5. Illustration schématique de la population cellulaire autour du canal central.

La zone épendymaire est une structure complexe, avec une population cellulaire variée, dont les neurones contactant le LCR (en bleu) caractérisés par leur extension dendritique baignant dans le canal central (c.c).

Les épendymocytes, d'une forme cubique (en gris clair, figure II.5) sont la population majoritaire de la couche épendymaire. Elles bordent la lumière du canal central et possèdent généralement deux cils mobiles (Alfaro-Cervello et al. 2012). Les surfaces latérales des cellules épendymaires sont liées en leurs parties apicales par des zonula occludens ou des jonctions gap, suivies par des jonctions adhérentes ; plus bas (Bjugn et al. 1988; Hugnot and Franzen 2011). Ainsi, elles forment une interface entre le LCR et le tissu nerveux et permettent relativement une libre diffusion des solutés entre le fluide interstitiel et le LCR (Bruni & Reddy 1987; Johanson et al. 2008).

Les épendymocytes peuvent se différencier en tancocytes. Celles-ci constituent la deuxième population cellulaire de cette région et sont observées principalement aux cotés latérales du canal central. Les tancocytes (en gris foncé, figure II.5) sont rarement ciliées, elles contactent le LCR via leur soma jouxtant la lumière du canal central et envoient des longues projections basales vers les vaisseaux sanguins (Seitz et al. 1981; Bruni & Reddy 1987). Leur

position favorise des échanges de substances entre le tissu nerveux et le liquide céphalorachidien. Elles peuvent également contribuer à l'épuration et la régulation de la composition du LCR (Hugnot and Franzen 2011). A cette disposition, viennent ensuite, les cellules radiales qui expriment le *glial fibrillary protein acid* (GFAP⁺) (en rose, figure II.5) ou de la nestine (Nestin⁺) (en orange, figure II.5), qui projettent une extension radiale jusqu'à la couche épendymaire (Sabourin et al. 2009; Hugnot & Franzen 2011; Alfaro-Cervello et al. 2012).

D'autres cellules ont été localisées au niveau de la couche subépendymaire. Ces cellules sont GFAP⁺ et expriment en plus, les marqueurs BLBP (de l'anglais : *Brain lipid-binding protein*) spécifiques des glies radiales et CD15 (un marqueur de cellules souches neuronales). Les chercheurs les ont classées comme étant un sous-type des tanocytes (cellules en vert, figure II.5) (Sabourin et al. 2009; Hugnot & Franzen 2011).

A l'exception de ces cellules, une population neuronale inconnue a été aperçue autour du canal central. Ces cellules sont distribuées de manière arbitraire autour du canal central. Leurs somas se positionnent dans ou sous la couche épendymaire et envoient une projection dendritique se terminant par une protubérance en contact avec le LCR (Anderson & Waxman 1985; Johansson et al. 1999; Horner & Gage 2000; Sabourin et al. 2009; Hugnot & Franzen 2011; Sabelström et al. 2013).

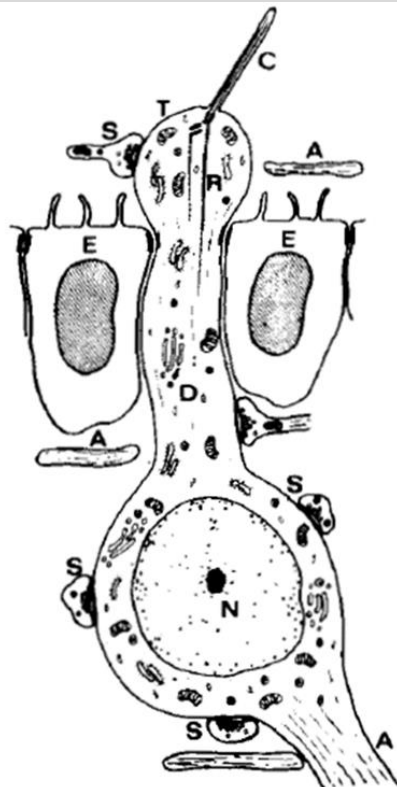
Ces neurones ont été surnommés, les neurones contactant le liquide céphalorachidien (NcLCR) (en bleu, figure II.5) et ils feront l'objet du paragraphe suivant.

B. Origine et conservation des NcLCR chez les vertébrés

Dans les années vingt du siècle précédent, des nouvelles cellules ont été découvertes aux abords du canal central de la moelle épinière dans plus de 200 espèces de vertébrés. A l'aide des méthodes de coloration de Golgi et de Nissl, Kolmer (1921) et Agduhr (1922) ont réussi à mettre en évidence des cellules avec une morphologie atypique, un petit soma et des projections atteignant le canal central.

En se basant sur leurs morphologies, Kolmer a suggéré qu'il s'agit de cellules neurosensorielles. Une année plus tard, Agduhr les a décrites comme étant des neurones intraépendymaires. Mais les deux chercheurs ont confirmé que ces cellules possèdent une extension apicale qui se termine par une protubérance baignant dans le canal central et envoient des projections axonales vers d'autres cellules.

Grâce à la microscopie électronique, la morphologie des NcLCR a été examinée davantage (Vigh & Vigh-Teichmann 1971, 1973). Des études ont prouvé, encore une fois, que les NcLCR possèdent une terminaison dendritique qui plonge dans la lumière du canal central. Ils ont démontré également que dans certaines espèces cette terminaison possède de multiples microvillosités et chez d'autres, elle possède un kinocilium² (mobile dans les NcLCR spinaux et immobile dans les NcLCR hypothalamiques) (Dale et al. 1987a; Djenoune et al. 2017; Vigh and Vigh-Teichmann 1973) (figure II.6).



- A: Axone
- C: Cil
- D: extension dendritique contactant le LCR
- E: Ependymocytes
- N: noyau
- R: corps basal
- S: synapse
- T: Terminaison dendritique contactant le LCR

Vigh et al., 1973 (modifiée)

Figure II.6: Caractéristiques générales des neurones contactant le liquide céphalorachidien

En 1982, la technique de coloration backfilling associée à la peroxydase de raifort (HRP ; *horseradish peroxidase*) a permis d'étudier la morphologie des neurones chez l'embryon du *Xenopus*. Cette technique est basée sur la diffusion de la coloration générée par la HRP dans les axones ce qui permet d'identifier clairement les composantes du neurone (Roberts and Clarke

² Le kinocilium ou cil est une extension cytoplasmique formée de microtubules. Ces derniers s'arrangent en doublets d'une manière circulaire en formant une structure appelée axonème. Il existe deux types de cils, les cils mobiles composés d'un axonème de neuf doublets en plus d'un doublet central (9 x 2+2) et les cils primaires ou immobiles constitué uniquement de neuf doublets de microtubules (9 x 2+0).

1982). Cette coloration a permis d'identifier huit classes neuronales parmi ceux-ci des cellules ciliées, GABAergiques, qui longent le canal central et qui ressemblent aux cellules décrites par Kolmer et Agduhr (les NcLCR). Ces neurones projettent leurs axones sagittalement et rostralement depuis la moelle épinière vers le cerveau (figure II.7). Depuis, ces données ont été confirmées par plusieurs études chez le *Xenopus* (Dale et al. 1987a, 1987b), mais aussi chez le poisson zèbre (Wyart et al. 2009; Fidelin et al. 2015; Djenoune et al. 2017) et chez le rat (Stoeckel et al. 2003).

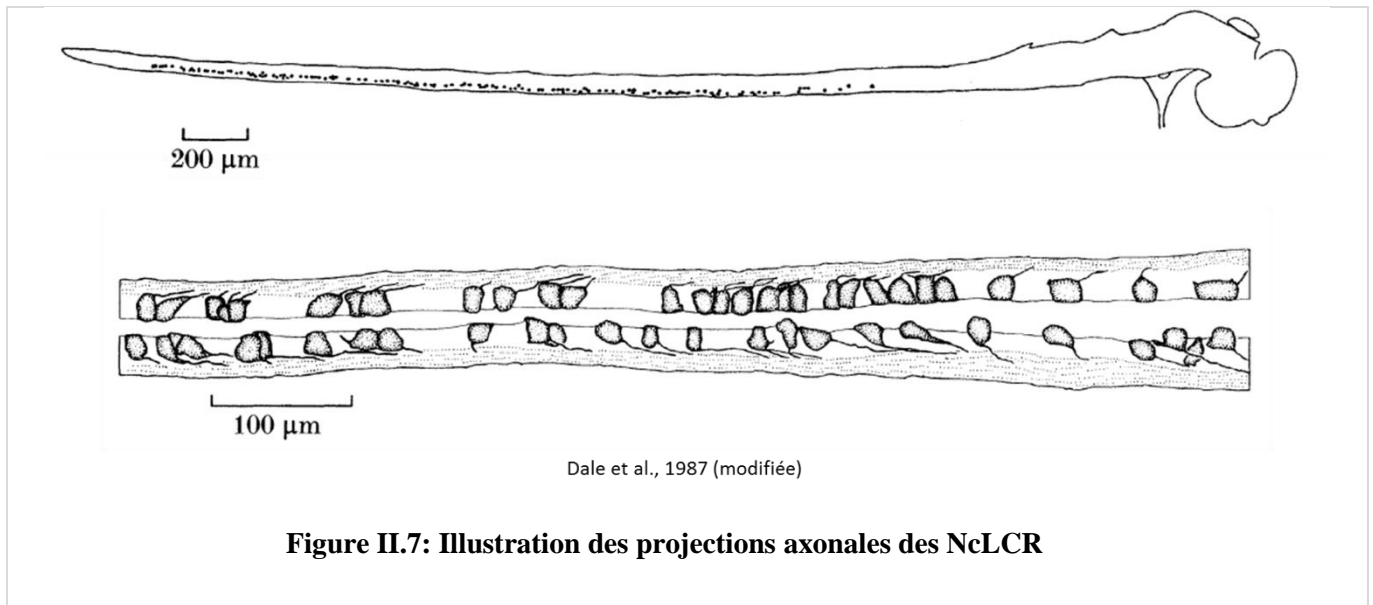


Figure II.7: Illustration des projections axonales des NcLCR

Dans un premier temps, Dale a proposé de les nommer « les cellules Kolmer-Agduhr (des KA) » en hommage aux deux scientifiques qui les ont découverts, cette nomenclature a été utilisée dans plusieurs publications scientifiques (Dale et al. 1987a, 1987b; Park et al. 2004). Hormis ceci, multiples autres termes ont été employés pour désigner les NcLCR : neurones intraépendymaires (Adgur 1922), cellules épendymaires ciliées (Barber et al. 1982), cellules contactant le liquide (en anglais: *liquor contacting cells*) (Kaduri et al. 1987; Roberts et al. 1989; Uematsu et al. 1993; Schotland et al. 1996; Chiba & Oka 1999; Acerbo et al. 2003; Dervan and Roberts 2003; Megías et al. 2003), et les neurones contactant le liquide céphalorachidien (NcLCR), cette dernière appellation est la plus courante dans la littérature (Sabourin et al. 2009; Stoeckel et al. 2003; Vigh et al. 1971a).

Dans le présent document nous avons choisi d'utiliser le terme des neurones contactant le liquide céphalorachidien ou NcLCR pour la désignation de ces neurones.

C. Morphologie des neurones contactant le LCR

Les NcLCR ont une morphologie particulière, leur soma est situé dans la couche intra ou subépendymaire de la zone entourant le canal central (Vigh-Teichmann et al. 1970; Vigh & Vigh-Teichmann 1971, 1973, 1998; Vigh et al. 1974; Nagatsu et al. 1988; Kawaguchi et al. 2010).

Le soma des NcLCR est de petite taille, avec un diamètre de 10 µm environ (Barber et al. 1982b; Orts-Del'immagine et al. 2014; Stoeckel et al. 2003). Il est généralement d'une forme ronde (Barber et al. 1982; Dale et al. 1987a, 1987b; Djenoune et al. 2017; Shimosegawa et al. 1986; Stoeckel et al. 2003) mais il peut être parfois, triangulaire ou fusiforme (Barber et al. 1982b; Shimosegawa et al. 1986; Stoeckel et al. 2003). Leurs noyaux sont ronds à ovales (Barber et al. 1982; Schueren & DeSantis 1985; Marichal et al. 2009; Alfaro-Cervello et al. 2012) et renferment un ou plusieurs nucléoles (Schueren & DeSantis 1985; Alfaro-Cervello et al. 2012).

Le cytoplasme des NcLCR contient moins de filaments intermédiaires et de corps lipidiques que leurs voisines, les épendymocytes (Alfaro-Cervello et al. 2012), aussi le cytoplasme de leurs bud renferment de petites vésicules rondes et claires (LaMotte 1987; Vigh et al. 1977).

1. Caractéristiques de l'extension apicale des neurones contactant le liquide céphalorachidien

- *Présence d'une ciliature au niveau du bud*

les NcLCR spinaux portent une extension apicale dirigée vers le canal central, qui exprime des marqueurs dendritiques comme le MAP2 (*Microtubule-associated protein 2*) (chez le rat: (Alonso 1999; Kútina et al. 2014); chez la souris: (Orts-Del'immagine et al. 2014). Cette extension a été appelée « bud » en raison de sa forme semblable à un bourgeon (Jalalvand et al. 2014a). Ce bud porte des microvillosités et dans certaines espèces il porte seulement un kinocilium (figure II.8).

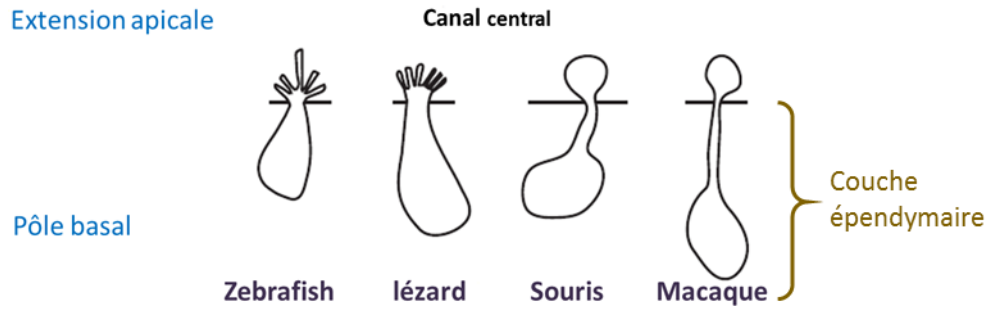


Figure II.8. Diversité dans les extensions des NcLCR chez différentes espèces

Les NcLCR spinaux possèdent une extension dendritique apicale proéminente dont la forme diffère entre l'espèce. Particulièrement l'extension apicale chez les anamniotes porte une multitude de microvillosités tandis que l'extension apicale des NcLCR chez les amniotes porte moins de microvillosités.

Il existe deux types de cils; les cils primaires et les cils mobiles. Les cils primaires non-mobiles ont un axonème constitué de neuf doublets de microtubules périphériques ($9 \times 2 + 0$). Les cils primaires sont rencontrés dans la plupart des cellules, ils forment le centre sensoriel de la cellule qui régule la prolifération cellulaire et le développement embryonnaire. Les cils mobiles ont aussi neuf doublets de microtubules, mais avec un doublet central supplémentaire ($9 \times 2 + 2$).

Les premiers cils primaires immobiles, ont été découverts dans les cellules ciliées sensorielles, (Wersall 1956). A leur découverte, Wersall a attribué à ces cils, un rôle de mécanosenseurs dans les systèmes auditifs et vestibulaires. Ils convertissent les mouvements de la tête et les ondes sonores en signaux électriques (Schwander et al. 2010). Cette désignation est devenue la terminologie commune dans la description des cils des cellules sensorielles (Wersall 1956; Flock & Duvall 1965; Kindt et al. 2012). Le kinocilia des cellules ciliées auditives, contrairement à ceux du système vestibulaire, sont présents dès les premières étapes du développement puis ils régressent chez les mammifères et les oiseaux tandis qu'ils restent conservés chez le zebrafish et Xenopus (Tanaka & Smith 1978; Denman-Johnson & Forge 1999).

De la même manière, un kinocilia³, a été retrouvé sur l'extension apicale des NcLCR spinaux d'adulte mais uniquement dans certaines espèces : comme chez les amphibiens (Vigh &

³ Le kinocil est un stéroécil qui est plus long que les autres stéréocils. Les stéréocils sont immobiles et se ressemblent aux microvillosités, ils distinguent en microscopie électronique en étant parallèles les uns aux autres en leurs parties bassales mais deviennent de plus en plus sinueux et s'emmêlent entre eux vers leurs extrémités.

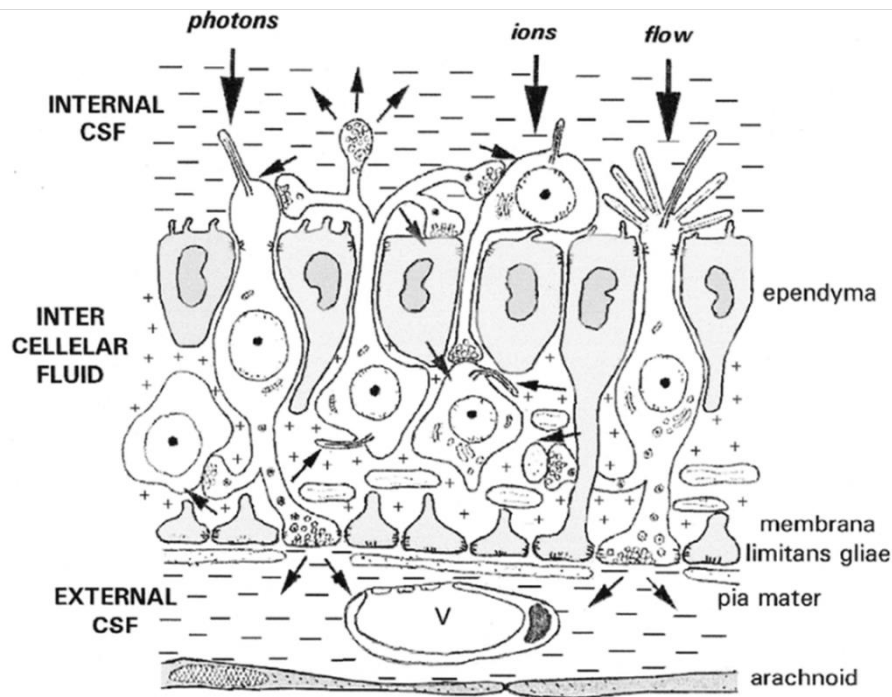
Vigh-Teichmann 1971, 1998; Dale et al. 1987a; Alibardi & Meyer-Rochow 1990), la lamproie (Schotland et al. 1996), le poussin (Schueren & DeSantis 1985), la carpe (Vigh et al. 1974), la tortue (Trujillo-Cenóz et al. 2007; Vigh et al. 1977) et probablement chez rat (Marichal et al. 2009; Stoeckel et al. 2003).

Cependant, il n'y a aucun consensus à ce sujet chez les rongeurs puisque dans des études chez la souris, les cils ont été localisés essentiellement sur le soma des NcLCR et non sur le bud (Alfaro-Cervello et al. 2012; Orts-Del'immagine et al. 2014). Cette absence de kinocilia sur le bud en contact avec le LCR semble être partagée avec le reste des mammifères comme chez le lapin par exemple (Leonhardt 1967).

Le bud des NcLCR porte de multiples microvillosités⁴ dont le nombre varie selon l'espèce étudiée (Vigh et al. 1974, 1977; Schueren & DeSantis 1985; LaMotte 1987; Vigh & Vigh-Teichmann 1998; Marichal et al. 2009). Par exemple chez le *Xenopus*, les NcLCR ont une bordure en brosse constituée de nombreuses microvillosités longues et minces (parfois plus de 20) (Alibardi and Meyer-Rochow 1990; Vigh and Vigh-Teichmann 1998).

Chez des mammifères les NcLCR possèdent moins de microvillosités que chez les amphibiens ou les téléostéens. Ceci a été soutenu par des travaux réalisés chez la souris (Orts-Del'immagine et al. 2012; Vigh et al. 1983), chez le macaque (LaMotte 1987), l'opossum (Vigh et al. 1983) et le rat (Jaeger et al. 1983; Marichal et al. 2009). La forme de l'extension apicale diffère entre les espèces. En effet, chez les anamniotes (les poissons et les amphibiens), les microvillosités sont localisées au pôle apical du soma des NcLCR (chez le lézard, poisson zèbre ; voir figure II.8). Les microvillosités des neurones contactant le LCR se distinguent de celles des cellules épendymaires car elles sont plus longues et plus épaisses (Vigh et al. 1974) (figure II.9).

⁴ Les microvillosités cellulaires sont des fins prolongements de la membrane se situant au pôle apicale des cellules. Elles sont formées de filaments d'actine, leurs membranes sont riches de glycoprotéines, d'enzymes et de canaux protéiques. Le rôle de ces structures est d'augmenter la surface d'échanges des cellules et l'absorption des substances circulantes.



Vigh et al., 1974

Figure II.9: schéma de la diversité de la cilliaturation des NcLCR

Les NcLCR contactent le LCR externe et interne ainsi que l'espace intercellulaire. Les flèches indiquent que ces neurones peuvent communiquer par voie synaptique (en bas) par libération des vésicules (V) ou par voie non synaptique via des cils et microvillosités.

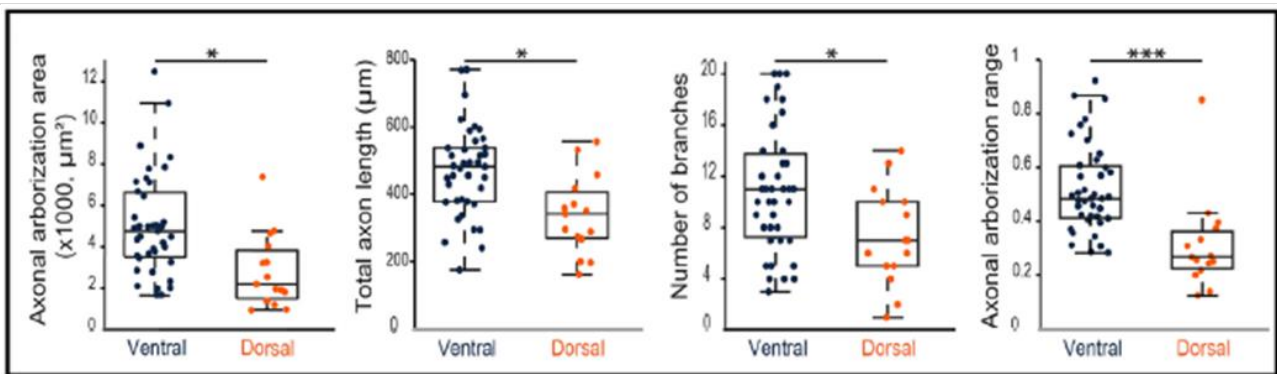
- *Propriétés sécrétoires du bud*

En plus des microvillosités, les extensions proéminentes des NcLCR exposent aussi des structures subcellulaires caractéristiques aux cellules sécrétoires. Chez le rat par exemple, ces prolongements sont riches en microtubules et renferment de nombreuses vésicules (Jaeger et al. 1983; Stoeckel et al. 2003), pareillement chez la souris (Alfaro-Cervello et al. 2012; Vigh et al. 1977), le cochon d'inde (Vigh et al. 1983), le macaque (LaMotte 1987), le poussin (Schueren & DeSantis 1985), le *Xenopus* (Alibardi and Meyer-Rochow 1990) et chez la lamproie (Schotland et al. 1996) (voir le paragraphe F.2. Propriétés sécrétoires des NcLCR ; page : 43).

2. Projections axonales des neurones contactant le LCR

De nombreuses recherches ont confirmé que tous les NcLCR projettent leurs axones ventrolatéralement et constituent une voie ascendante ipsilatérale (figure II.7) (Vigh et al. 1977; Ochi & Hosoya 1974; Christenson et al. 1991b; Vigh et al. 2004; Jalalvand et al. 2014).

En revanche, les projections axonales des NcLCR ont dévoilé l'existence de deux populations au sein de ces neurones. Il a été observé que les NcLCR ventraux ont des axones plus longs avec une arborisation plus développée comparée aux NcLCR dorsaux (figure II.10). La longueur et l'arborisation développée des NcLCR ventraux peuvent suggérer que ces derniers se différencient avant les NcLCR dorsaux. De plus, les deux populations des NcLCR (ventraux et dorsaux) projettent dans différentes régions le long de l'axe dorso-ventral de la moelle épinière suggérant que ces deux populations peuvent cibler différents types de neurones de la moelle épinière (Djenoune & Wyart 2017).



Djenoune et al., 2017

Figure II.10: Comparaison des axones des NcLCR ventraux et dorsaux

De gauche à droite, une comparaison de la surface couverte par l'arborisation axonale des NcLCR ventraux (bleu ; n=15) et dorsaux (orange ; n=39), de la longueur de leurs axones, le nombre de branches par axone ainsi que le nombre de branches dans le périmètre dorsoventral de la moelle épinière. L'arborisation axonale des NcLCR ventraux (bleu) est plus étendue et leurs axones sont plus longs que ceux des NcLCR dorsaux (orange). De même, les axones des NcLCR ventraux ont un nombre plus important de branches (ramifications) et sont plus présents dans le périmètre dorsoventral de la moelle épinière.

Cette innervation axonale assure un relais d'informations entre les NcLCR et le LCR. Ils contactent le LCR interne (circulant dans le canal central) via leur extension apicale et le LCR externe (circulant dans l'espace sub-arachnoïdien) via les axones. En revanche, chez d'autres espèces comme le rat, les NcLCR envoient leurs axones, sagittalement regroupés en faisceau, sous l'épendyme (Stoeckel et al. 2003).

Des terminaisons axonales des NcLCR ont été observées à la surface externe de la moelle épinière. Ces axones se ramifient et s'élargissent au contact de la lame basale du tissu nerveux

de la même manière que pour les terminaisons neurosécrétrices. De plus des grandes vésicules denses sont présentes au niveau des axones des NcLCR chez plusieurs vertébrés, suggérant qu'ils peuvent avoir une activité neurosécrétoire (Vigh et al. 1977, 1983).

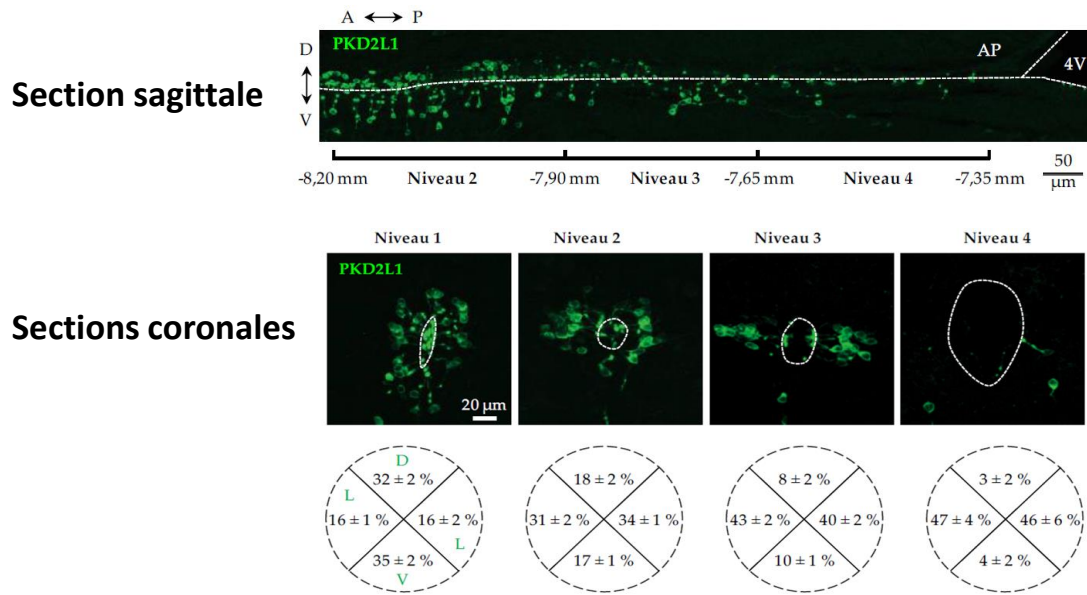
Il faut noter également que les axones des NcLCR ne sont pas myélinisés notamment chez le rat (Stoeckel et al. 2003) et la tortue (Vigh et al. 1977).

D. Distribution et développement des neurones contactant le LCR

Les neurones contactant le liquide cébrospinal sont une population de neurones située le long de l'interface entre le SNC et le LCR. Ils sont répandus dans plusieurs structures du cerveau, à savoir le SCO, la glande pinéale, l'hypophyse, la rétine et les organes circumventriculaires (Vigh et al. 1969; Vigh-Teichmann et al. 1970; Vigh & Vigh-Teichmann 1981, 1998).

Les travaux de Vigh et Vigh-Teichmann, regroupent plusieurs données à propos de la diversité des NcLCR dans différents organes et espèces. Chez les oiseaux par exemple, les NcLCR au niveau du noyau paraventriculaire hypothalamique ont été révélés comme étant photosensibles et impliqués dans la régulation de la reproduction saisonnière chez les oiseaux (Nakane et al. 2014). Dans le mésencéphale du rat près de la ligne médiane de l'aqueduc ventral, dans le troisième et le quatrième ventricules, les NcLCR expriment les TRPM8 des récepteurs canaux sensibles au froid (Du et al. 2009) et sont impliqués dans la nociception.

Chez le rat, les NcLCR sont dispersés le long du canal central avec une densité plus élevée au niveau thoracique (Shimosegawa et al. 1986; Stoeckel et al. 2003) tandis que chez la souris les NcLCR sont principalement localisés dorsalement et ventralement avec plus de cellules latéralement (Orts-Del'immagine et al. 2012). La densité des NcLCR décroît en partant de la moelle épinière vers le tronc cérébral (Orts-Del'immagine et al. 2014) (figure II.11).



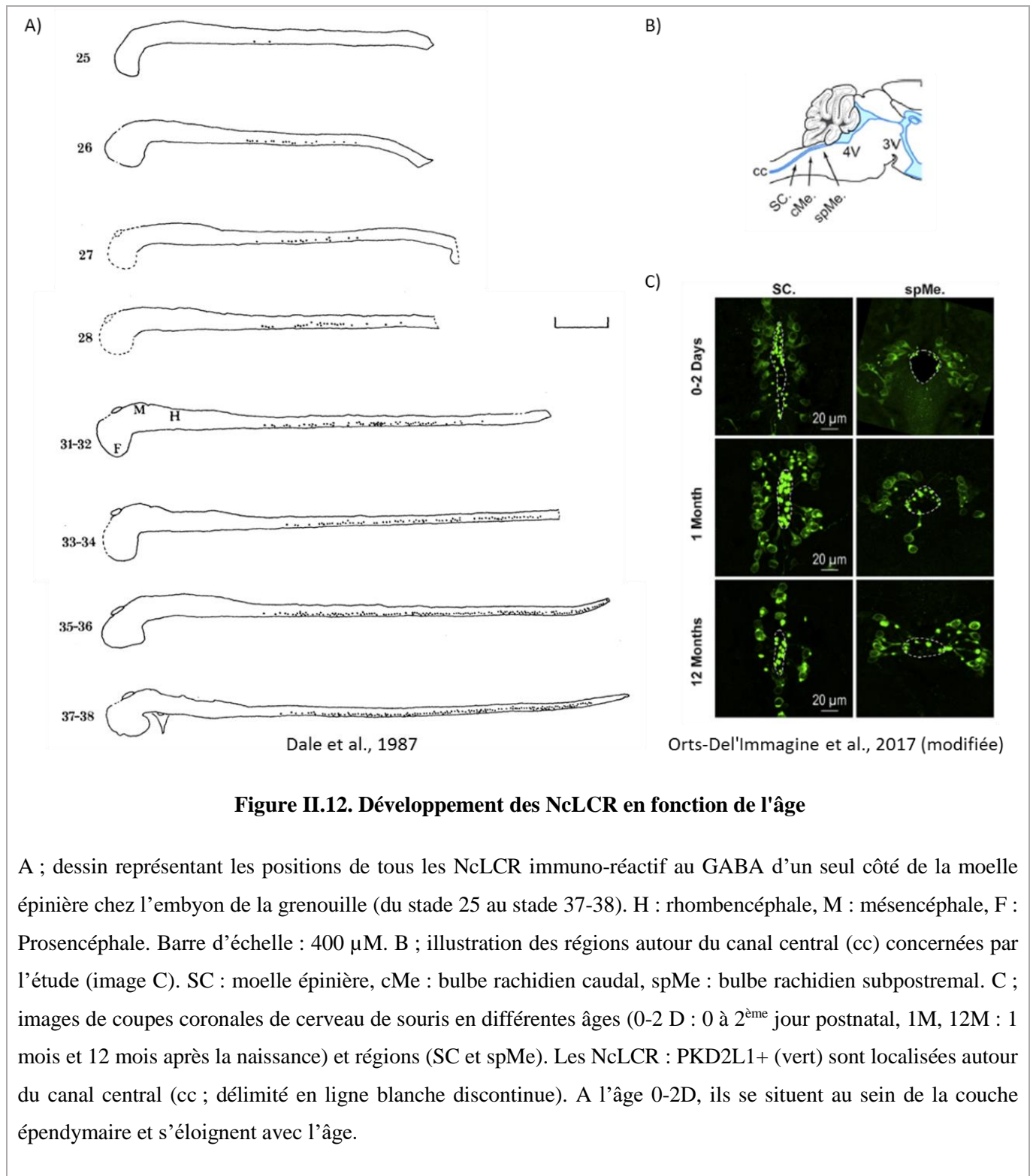
Orts-Del'Immagine et al., 2014 (modifiée)

Figure II.11. Distribution des NcLCR dans le système nerveux central

Localisation des NcLCR par immunofluorescence dirigée contre le canal PKD2L1, marqueur spécifique des NcLCR chez la souris au niveau de quatre zones le long du canal central. La distribution des NcLCR est décroissante en partant du côté antérieur (A) vers le côté postérieur (P) (coupe sagittale en haut). Ainsi que les NcLCR sont plus concentrés ventralement (V) versus dorsalement (D). Les NcLCR spinaux sont plus proches du canal central alors qu'ils deviennent de plus en plus distaux rostralement (coupes coronales (en bas)).

Il faut noter que la distribution des NcLCR varie en fonction de l'âge. Le marquage immunocytochimique du GABA dans le SNC de la grenouille a révélé que les NcLCR apparaissent pendant le stade larvaire et continuent à accroître au fur et à mesure du développement embryonnaire. Au départ, ils apparaissent au niveau rostral de la moelle épinière puis les nouvelles cellules surgissent caudalement (figure II.12A) (Dale et al. 1987b). Ces données ont été appuyées plus récemment par Orts-Del'Immagine et son équipe qui ont montré que l'organisation et la densité des NcLCR (révélés par immunofluorescence anti-PKD2L1), le long de l'axe medullo-spinal, variaient avec l'âge (Orts-Del'Immagine et al. 2017). Cette étude s'est intéressée aussi à la distribution de ces neurones autour du canal central. Les somas des NcLCR deviennent de plus en plus distants du canal central, à l'exception des NcLCR ventraux,

mais il faut noter que la majorité des NcLCR sont latéraux (figure II.12C) (Orts-Del'Immagine et al. 2014; Orts-Del'Immagine et al. 2017).



E. Phénotypes des NcLCR bulbo-spinaux

Plusieurs marqueurs ont été détectés dans les NcLCR dont le GABA et d'autres types de facteurs moléculaires qui seront cités dans la partie suivante.

1. GABA marqueur moléculaire des NcLCR

L'expression du GABA dans les NcLCR a été découverte la première fois chez le rat (Barber et al. 1982). Depuis, l'expression du GABA dans les NcLCR, de l'enzyme responsable de sa synthèse : la glutamate décarboxylase (GAD) ou encore de son transporteur vésiculaire (VGAT), ont été mis en évidence chez les vertébrés inférieurs et les mammifères (Anadón et al. 1998; Barber et al. 1982; Binor and Heathcote 2001; Brodin et al. 1990; Christenson et al. 1991a, 1991c; Dale et al. 1987b, 1987a; Dervan and Roberts 2003; Djenoune et al. 2014; Feldblum et al. 1995; Higashijima et al. 2004a, 2004b; Jalalvand et al. 2014b; Kaduri et al. 1987; Kútina et al. 2014; Mackie et al. 2003; Magoul et al. 1987; Martin et al. 1998; Orts-Del'immagine et al. 2014; Park et al. 2004; Reali et al. 2011; Roberts et al. 1995; Rodicio et al. 2008; Ruiz et al. 2004; Schotland et al. 1996; Stoeckel et al. 2003; Sueiro et al. 2004; Uematsu et al. 1993; Villar-Cerviño et al. 2008; Wyart et al. 2009; Yang et al. 2010; Yeo and Chitnis 2007) (figure II.13).

De plus, regardant la distribution des neurones GABAergiques dans la moelle épinière du rat, (Barber et al. 1982) deux types de NcLCR GAD positif ont été identifiés avec des formes de soma qui sont compatibles avec les études précédentes. Ces découvertes suggèrent que les NcLCR constituent une population hétérogène sur le point moléculaire, classés au moins en deux sous-types de neurones avec des caractéristiques morphologiques spécifiques. L'hypothèse d'une hétérogénéité au sein des NcLCR est renforcée par d'autres marqueurs observés uniquement dans l'un des sous-types de ces cellules.

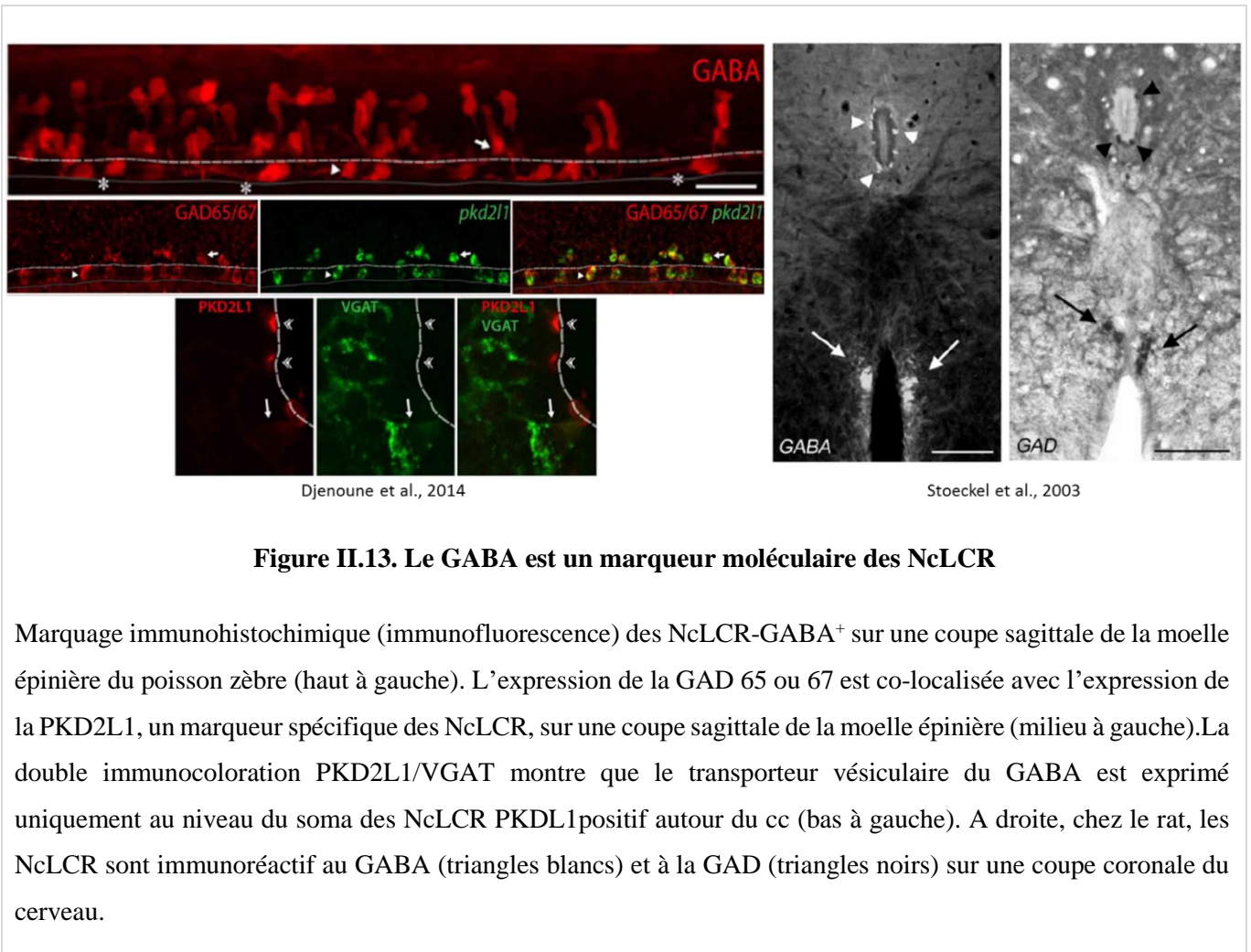


Figure II.13. Le GABA est un marqueur moléculaire des NcLCR

Marquage immunohistochimique (immunofluorescence) des NcLCR-GABA⁺ sur une coupe sagittale de la moelle épinière du poisson zèbre (haut à gauche). L'expression de la GAD 65 ou 67 est co-localisée avec l'expression de la PKD2L1, un marqueur spécifique des NcLCR, sur une coupe sagittale de la moelle épinière (milieu à gauche). La double immunocoloration PKD2L1/VGAT montre que le transporteur vésiculaire du GABA est exprimé uniquement au niveau du soma des NcLCR PKDL1 positif autour du cc (bas à gauche). A droite, chez le rat, les NcLCR sont immunoréactif au GABA (triangles blancs) et à la GAD (triangles noirs) sur une coupe coronale du cerveau.

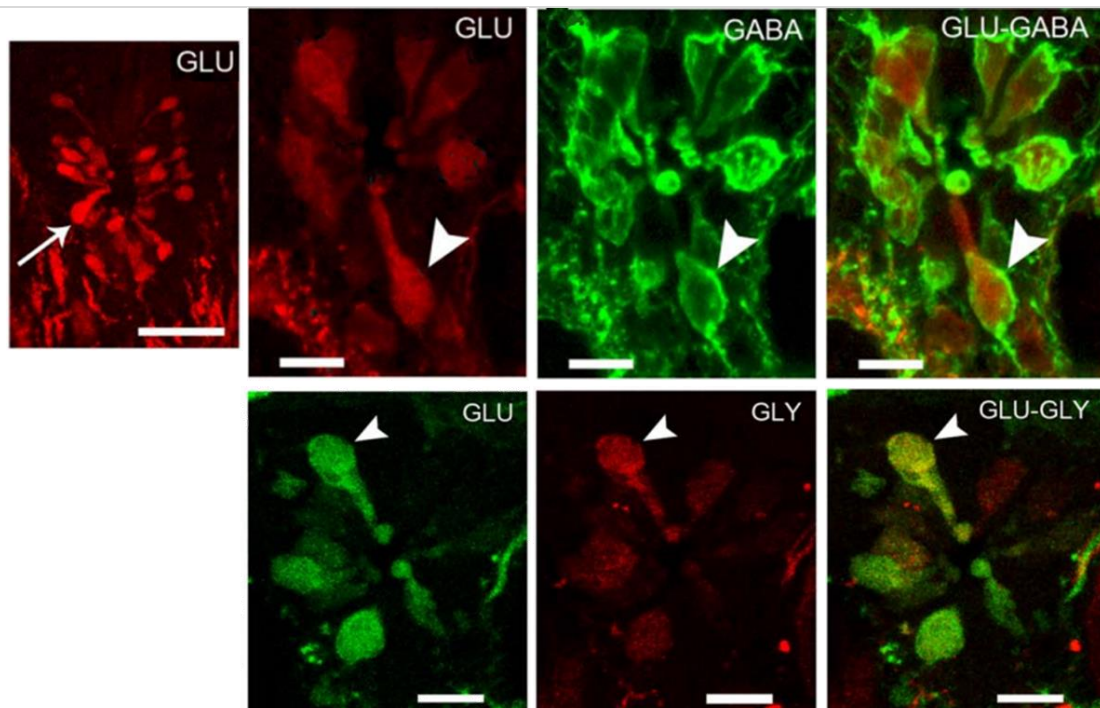
▪ D'autres neurotransmetteurs trouvés dans les NcLCR spinaux

D'autres neurotransmetteurs ont été mis en évidence dans les NcLCR. Ainsi, l'hybridation *in situ* et l'immunohistochimie ont révélé la présence du transporteur vésiculaire du glutamate (VGLUT) et le glutamate lui-même dans la moelle épinière de la lamproie (Fernández-López et al. 2012).

Le glutamate occupe un rôle essentiel dans le métabolisme. Il est le neurotransmetteur exciteur majeur dans le SNC et est impliqué dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques, comme la transmission synaptique excitatrice, la plasticité synaptique, la mort cellulaire, les accidents vasculaires cérébraux et la douleur chronique (Basbaum et Woolf 1999). La pertinence physiologique de la co-expression du GABA et glutamate dans les NcLCR de lamproie n'est toujours pas déterminée. Néanmoins, cette expression glutamatergique dans les NcLCR pourrait être spécifique à la lamproie car le glutamate n'a jamais été retrouvé dans les NcLCR chez d'autres espèces.

Dans le cas de la glycine, il a été rapporté que seulement certains NcLCR glutamatergiques étaient également glycinergiques chez la lamproie (Fernández-López et al. 2012). De même, comparant l'expression du GABA et de la glycine, seulement une population des NcLCR situés ventralement co-expriment les deux neurotransmetteurs (Villar-Cerviño et al. 2008). Il existe donc deux populations moléculairement distinctes au sein des NcLCR.

Par ailleurs, l'expression de la glycine dans une seule sous-population des NcLCR pourrait être exclusive aux agnathes car dans d'autres espèces comme le poisson zèbre ou encore la souris, cela n'a pas été mentionné (Higashijima et al. 2004a) (figure II.14).



Fernandez-Lopez et al., 2012

Figure II.14. Localisation du glutamate et de la glycine dans les NcLCR

L'immunofluorescence sur des coupes de moelle épinière montre, respectivement, l'identification du glutamate (rouge), le GABA (vert) et la coexpression des deux neurotransmetteurs dans les NcLCR (en haut). La glycine (rouge, en bas) est exprimée dans les NcLCR, elle est également colocalisée avec le glutamate.

2. Autres phénotypes moléculaires des NcLCR

Plusieurs monoamines et neuropeptides peuvent être retrouvés dans les NcLCR :

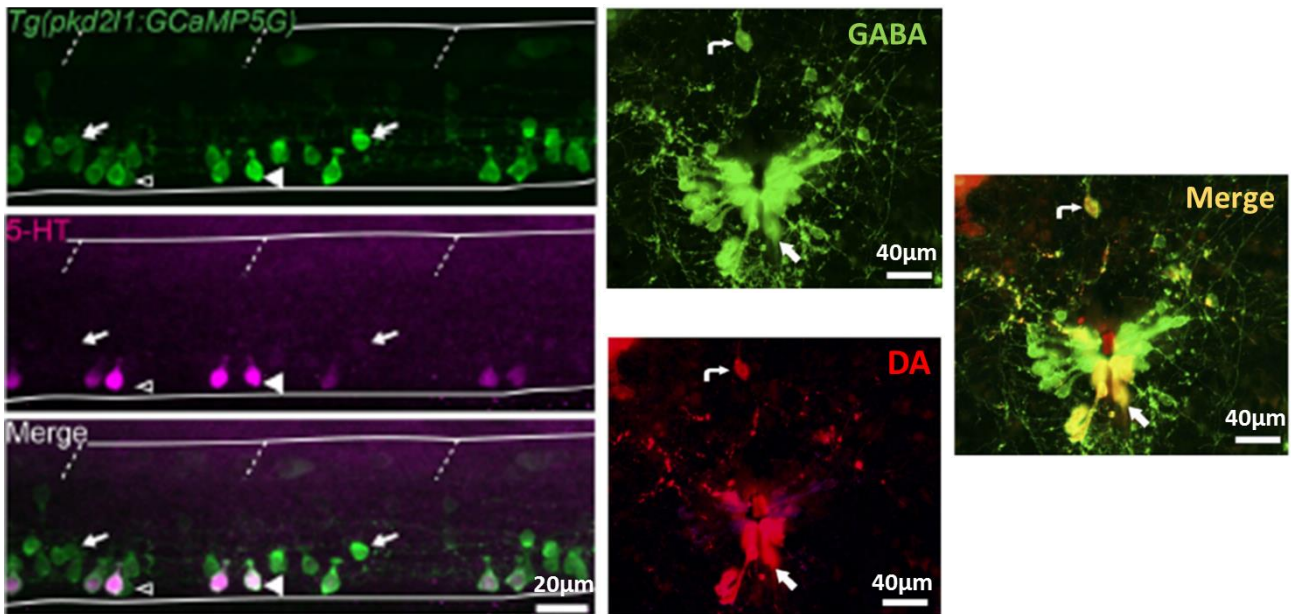
- **Les catécholamines**

Parmi les monoamines exprimées dans les NcLCR, les catécholamines sont présents chez la salamandre (Sims 1977), l'orphie (Parent and Northcutt 1982) et la caille (Guglielmone and Panzica 1985).

Aussi, l'enzyme responsable de la synthèse des catécholamines, la tyrosine hydroxylase (TH) est exprimée dans les NcLCR de *Xenopus laevis* (Heathcote and Chen 1993), de la grenouille-taureau, de la grenouille léopard (Chesler & Nicholson 1985) et du poussin (Wallace et al. 1987). Quant à la dopamine, elle a été retrouvée dans des NcLCR de multiples espèces: la lamproie (McPherson & Kemnitz 1994; Schotland et al. 1995, 1996; Pierre et al. 1997; Pombal et al. 1997; Barreiro-Iglesias et al. 2008; Rodicio et al. 2008), la raie (Roberts & Meredith 1987), l'anguille (Roberts et al. 1989, 1995), le caméléon (Bennis et al. 1990) et le pigeon (Acerbo et al. 2003). Dans ces espèces, l'expression de la dopamine étaient principalement localisée ventralement (Acerbo et al. 2003; Heathcote and Chen 1993; Roberts et al. 1995; Rodicio et al. 2008). Comme pour la glycine, la co-expression de la dopamine et du GABA est spécifique à une sous-population des NcLCR GABAergiques (Roberts and Meredith 1987; Rodicio et al. 2008).

▪ La sérotonine

En plus de catécholamines, les NcLCR expriment d'autres monoamines chez certaines espèces. Ainsi, la sérotonine est exprimée chez la salamandre immature et adulte (Sims 1977), chez la lamproie et les myxines (Ochi et al. 1979), chez l'orphie (Parent and Northcutt 1982), chez le lépisosté tacheté, chez le poussin (Sako et al. 1986) et chez le poisson zèbre (Djenoune et al. 2017; Montgomery et al. 2016). Des NcLCR sérotoninergiques ont été identifiés au niveau ventral du canal central (Ochi et al. 1979; Sims 1977) ce qui définit à une sous-population au sein des NcLCR (Djenoune et al. 2017; Montgomery et al. 2016) (Figure II.15).



Djenoune et al., 2017

Rodicio et al., 2008 (modifiée)

Figure II.15. Identification de la sérotonine et de la dopamine dans les NcLCR, révèle l'existence de populations distinctes au sein de ces neurones.

À gauche, la majorité des NcLCR ventraux expriment la sérotonine (5-HT, violet) et la GFP (vert) dans des animaux transgéniques (*Tg(pkd211:GCaMP5G)*). Alors que les NcLCR dorsaux (flèches) ne sont pas sérotoninergiques. Les lignes horizontales représentent les bords de la moelle épinière. Les petits traits « hachurés » délimitent le cc. À droite, La colocalisation de la dopamine et du GABA est observée essentiellement dans les NcLCR ventraux et dans une cellule dorsale (flèche courbée) éloignée du cc.

▪ Les neuropeptides

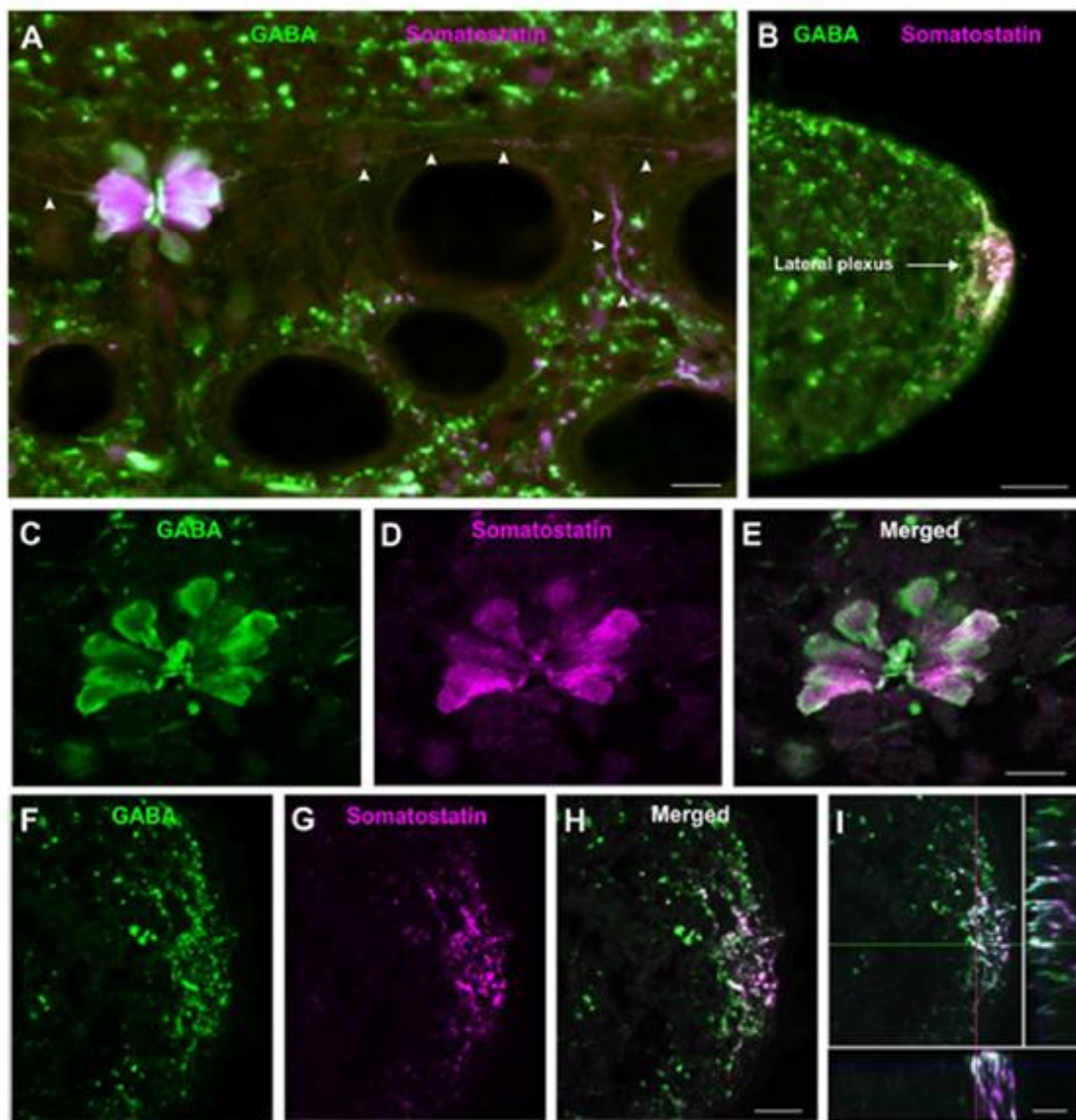
En plus des neuromodulateurs classiques, d'autres molécules ont été retrouvées dans les NcLCR spinaux.

Parmi celles-ci, la somatostatine, considérée comme le plus commun neuropeptide signalé dans ces neurones. La somatostatine a été révélée dans les NcLCR de lamproie (Buchanan et al. 1987; Christenson et al. 1991a; Jalalvand et al. 2014a) (figure II.16), du saumon argenté (Yulis and Lederis 1988a), et du poisson zèbre (Wyart et al. 2009; Djenoune et al. 2017). En plus, l'urotensine II (UII), qui est un neuropeptide vasoconstricteur, a été décrite il y a longtemps dans les NcLCR de nombreux poissons (Yulis & Lederis 1986, 1988a, 1988b). La co-expression de la somatostatine et l'UII a été exclusive à un groupe des NcLCR (Yulis & Lederis 1988a; Quan

et al. 2015) confirmant (chez le poisson) l'hypothèse de l'existence d'au moins deux sous-populations distinctes de NcLCR.

Parmi les peptides exprimés par les NcLCR, la méthionine- enképhaline -arginine-glycine leucine (Met-Enk-Arg-Gly-Leu) qui est un peptide opioïde endogène identifié dans les granules de chromaffine surrénale bovine (Kilpatrick et al. 1981). Ce peptide dérive de la Met-enképhaline qui elle-même est une dérivée de la Proenképhaline.

Un peptide supplémentaire, le peptide vasointestinal (VIP), principalement répertorié au niveau du système entérique, a également été retrouvé dans les NcLCR chez le rat et chez le macaque (LaMotte 1987).



Jalalvand et al., 2014

Figure II.16. Expression de la somatostatine dans les NcLCR chez la lamproie.

A ; Photomicrographie d'une section transversale de moelle épinière montrant des NcLCR immunopositifs tant pour la somatostatine (violet) que pour le GABA (vert) situés dans les quarts de cercles latéraux du canal central. Les pointes de flèche montrent des fibres somatostatine /GABA-immunoréactifs. B ; La somatostatine et GABA sont co-localisés (couleur blanche) dans le plexus latéral de la marge de moelle épinière. C-E; Sections optiques confocales (épaisseur 1 μm) du canal central montrant des cellules immunopositives au GABA (C, vert), la somatostatine (D, violet) et quand fusionné la somatostatine/GABA sont co-localisés (E, blanc). F-H ; sections optiques confocales minces transversales à travers le plexus latéral de la marge de la moelle épinière, montrant aussi une co-localisation de la somatostatine et du GABA. J ; une projection 90° du plexus latéral confirmant la co-localisation entre la somatostatine et le GABA.

*La barre d'échelle = 50 μm (B) et 20 μm (C-I).

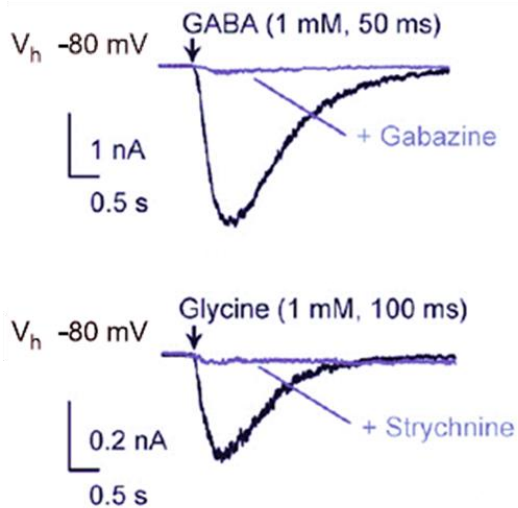
3. Récepteurs des NcLCR

Dans la zone médullaire, les NcLCR sont en contact étroit avec de nombreuses fibres GABAergiques, cholinergiques, sérotoninergiques et monoaminergiques. Ils pourraient ainsi exprimer une panoplie de récepteurs.

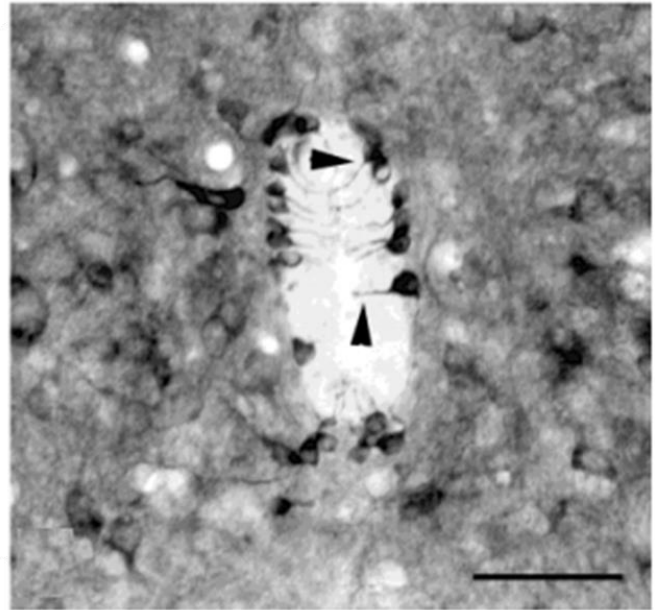
Parmi ces récepteurs, le récepteur ionotropique du GABA, qui est omniprésent dans le SNC et qui induit une inhibition dans la majorité des neurones. De nombreuses études ont démontré que les NcLCR expriment en effet le R-GABA_A. Des expériences menées chez le rat et chez la souris ont prouvé que l'application du GABA induit une inhibition qui peut être médiée par le R-GABA_A présent dans ces neurones (Marichal et al. 2009; Orts-Del'immagine et al. 2012) (figure II.17).

Les NcLCR pourraient exprimer également le récepteur GABA_B. En 1999, Margeta-Mitrovic a observé chez le rat, des cellules qui semblent être des NcLCR exprimant une immunoréactivité au récepteur GABA_B (figure II.17) (Margeta-Mitrovic et al. 1999a)

L'inhibition dans les neurones contactant le LCR est médiée par un autre récepteur, celui de la glycine. Des études précédentes ont montré que les NcLCR expriment également un récepteur fonctionnel de la glycine (figure II.17). La glycine est un acide aminé inhibiteur, qui agit via le même mécanisme que le GABA, en provoquant une hyperpolarisation et donc un potentiel postsynaptique inhibiteur (PPSI) (Orts-Del'immagine et al. 2012).



Orts-Del'Immagine et al., 2012 (modifiée)



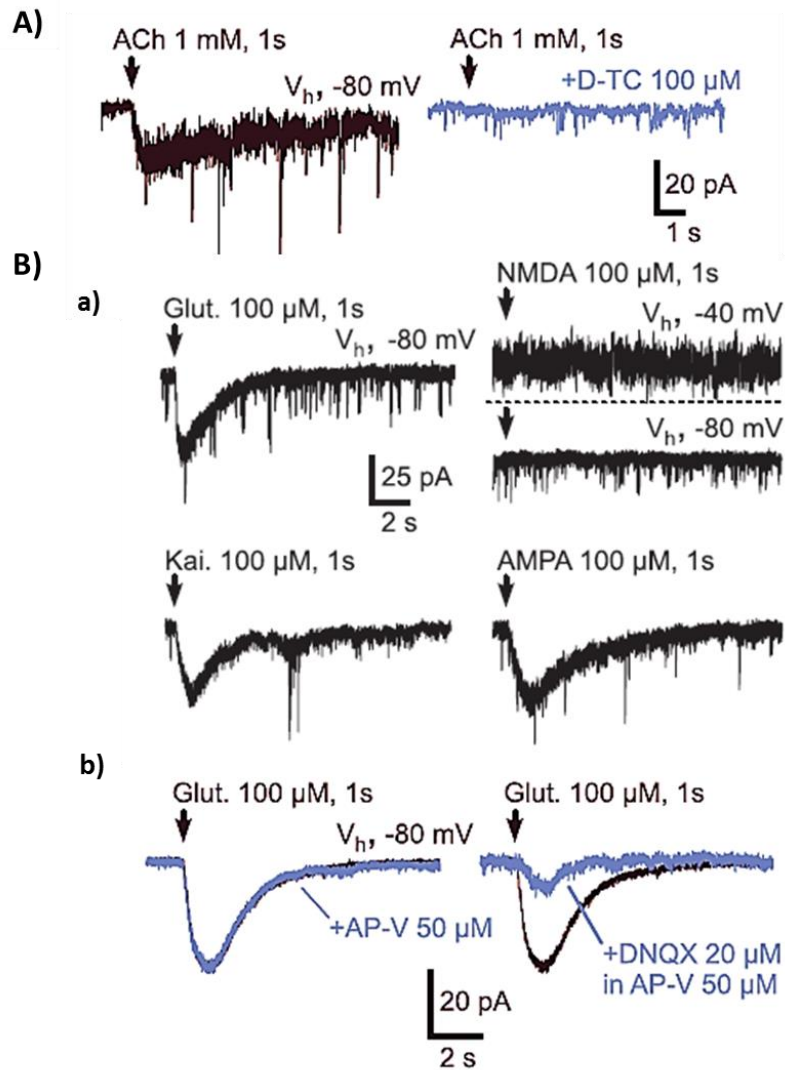
(Margeta-Mitrovic et al. 1999)

Figure II.17. Le récepteur GABA_A et le récepteur de la glycine ont un effet inhibiteur dans les NcLCR

L'application du GABA 1mM pendant 50ms (à haut) ou la glycine 1mM pendant 100ms (en bas) induit un courant entrant due à l'activation des canaux chlore. L'application de la gabazine (10 μ M) et strychnine (10 μ M), respectivement antagoniste du GABA_A et de la glycine, inhibe totalement cet effet (En bleu). Ces réponses ont été enregistrées sur un NcLCR en potentiel imposé ($V_h = -80\text{mV}$) ; $E_{Cl} = 2\text{mV}$. Une coupe coronale chez le rat montre que les NcLCR possèdent le récepteur GABA_{B1} (flèches noires) (l'image à droite).

L'effet excitateur peut être modulé par d'autres récepteurs, comme le récepteur purinergique de type P2X2 de l'ATP qui a été identifié chez le rat (Marichal et al. 2009; Stoeckel et al. 2003). Néanmoins, ce récepteur est absent dans les NcLCR bulbaires chez la souris.

Ces neurones possèdent des récepteurs nicotiques de l'acétylcholine (ACh) et les récepteurs ionotropiques AMPA/Kaïnate du glutamate (figure II.18). Pourtant, aucune activité synaptique cholinergique et glutamatergique spontanée n'a été observée dans les NcLCR (Orts-Del'immagine et al. 2012).



Orts-Del'Immagine et al., 2015 (modifiée)

Figure II.18. Les NcLCR expriment les récepteurs d'acétylcholine et AMPA/Kaïnate du glutamate.

A ; la réponse des NcLCR à l'application de l'acétylcholine (ACh, 1 mM) pendant 1s (à gauche) et après l'application D-tubocurarine (D-TC, 100mM), un antagoniste spécifique aux récepteurs nicotiques de l'acétylcholine (potentiel imposé -80 mV). B ; les NcLCR expriment les récepteurs AMPA/Kaïnate mais pas NMDA. a ; la réponse des NcLCR à l'application par pression du glutamate, AMPA, kaïnate et NMDA à une concentration de 100 μ M pendant 1s. Les enregistrements ont été réalisés en mode potentiel imposé -80 mV et un enregistrement supplémentaire a été effectué à -40 mV afin d'éviter le blocage potentiel-dépendant des récepteurs NMDA par les ions Mg^{2+} . Cependant, aucune réponse NMDA n'a été enregistrée dans les deux cas (trace à droite en haut). b ; le courant médié par le glutamate et réduit seulement en présence de DNQX (20 μ M) l'antagoniste spécifique aux récepteurs AMPA/kaïnate en plus du AP-5 (50 μ M) l'antagoniste spécifique du NMDA (en bleu à droite), mais pas en présence de AP-5 (50 μ M) (en bleu à gauche) seul.

L'enregistrement de l'un de ces neurones révèle une activité synaptique spontanée, due à l'activation des récepteurs GABA_A et ceux de la glycine, mais aussi une activité canal (figure II.19). Il s'agit du canal PKD2L1 présenté dans le chapitre suivant.

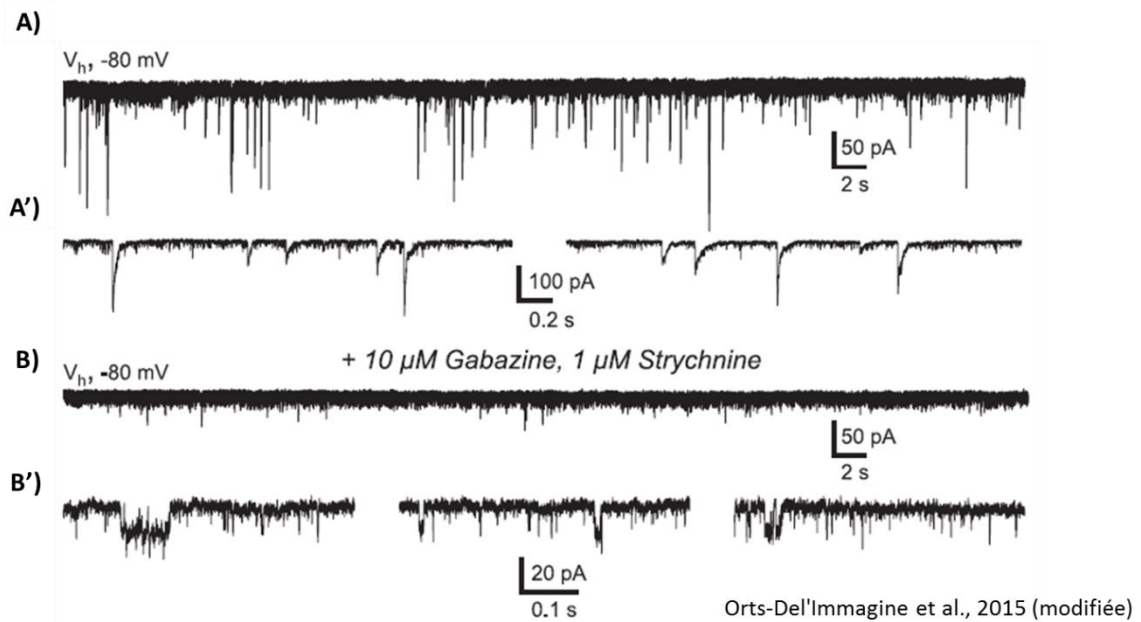


Figure II.19. l'activité électrophysiologique spontanée d'un NcLCR

A ; l'enregistrement des NcLCR en potentiel imposé -80 mV, révèle une activité synaptique spontanée dû à l'activation des divers récepteurs canaux exprimés dans ces neurones, A' ; des sections de la trace au-dessus présentées avec une meilleure résolution temporelle. B ; à l'application de la gabazine 10μM et la strychnine 1μM les antagonistes respectifs du récepteur GABA_A et de la glycine, l'activité synaptique a été totalement supprimée et uniquement un courant unitaire a été enregistré, dû à l'expression des canaux PK2L1, B' ; des sections de la trace au-dessus présentées avec une meilleure résolution temporelle.

Les récepteurs nicotiniques et AMPA/Kaïnate ne génèrent pas d'activité synaptique spontanée dans les NcLCR.

En plus des récepteurs cités ci-dessus, des données obtenues chez le rat, ont démontré la présence du récepteur 5HT_{1A} de la sérotonine dans les NcLCR distaux (Jiang and Zhang 2008). Les auteurs ont postulé l'implication de ce sous type de récepteur sérotoninergique présent dans les NcLCR dans la nociception.

L'ensemble de ces données citées ci-dessus mentionnant la présence d'une multitude de ces RCPG dans les NcLCR subépendymaires, questionnant sur leur rôle à ce niveau cérébral et donc sur le rôle de ce type neuronal. Le but de la présente thèse va dans ce sens en, explorant la

présence des R-GABA_B dans ces neurones vu qu'il constitue un des RCPG le plus répandu dans le SNC.

4. PKD2L1, un marqueur sélectif des NcLCR

Le canal PKD2L1 (*polycystic kidney disease type 2 like 1*) est spécifiquement exprimé dans les NcLCR (Huang et al. 2006). Les PKD2L1 appartiennent à la famille des TRPP (*transient receptor potential polycystin*), une sous-famille des canaux TRP (*Transient Receptor Potential channel*), (*polycystic kidney disease type 2*) (Delmas 2005; Nilius 2007; Ishimaru & Matsunami 2009). Ces protéines sont modulables par les variations de pH et des stimuli thermiques et mécaniques (Delmas 2004, 2005; Ramsey et al. 2006; Venkatachalam & Montell 2007; Nilius & Owsianik 2011).

Les PKD2L1 sont classés parmi les canaux cationiques non sélectifs, perméables aux ions sodium, potassium et calcium. Ils ont d'une grande conductance (150 à 180 pS) et leur ouverture génère un courant ionique important. Ces canaux peuvent être régulés par le calcium et par l'osmolarité du milieu extracellulaire. (Chen et al. 1999; Delmas 2005; Murakami et al. 2005; Nauli et al. 2003).

La présence des PKD2L1 dans les NcLCR chez la souris (Huang et al. 2006) a été démontrée par immunohistochimie sur des coupes coronales et sagittales tout au long de la moelle épinière. Dès lors, l'usage des lignées de souris transgéniques avec un gène promoteur PKD2L1, est devenu très fréquent pour l'étude des propriétés physiologiques des NcLCR chez la souris (Bushman et al. 2015; Orts-Del'immagine et al. 2012, 2014; Orts-Del'immagine et al. 2016) (figure II.20).

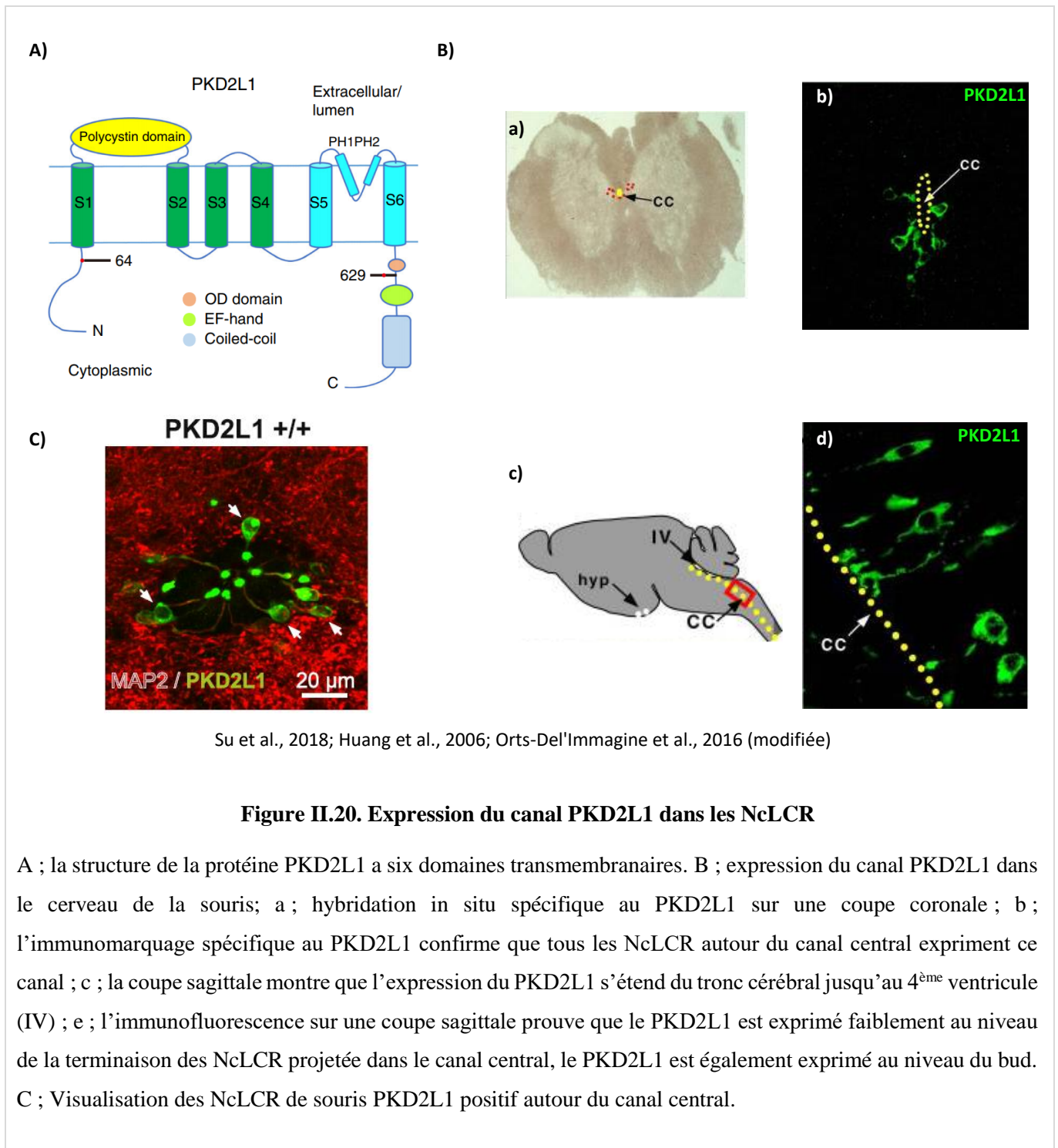


Figure II.20. Expression du canal PKD2L1 dans les NcLCR

A ; la structure de la protéine PKD2L1 a six domaines transmembranaires. B ; expression du canal PKD2L1 dans le cerveau de la souris; a ; hybridation in situ spécifique au PKD2L1 sur une coupe coronale ; b ; l'immunomarquage spécifique au PKD2L1 confirme que tous les NcLCR autour du canal central expriment ce canal ; c ; la coupe sagittale montre que l'expression du PKD2L1 s'étend du tronc cérébral jusqu'au 4^{ème} ventricule (IV) ; e ; l'immunofluorescence sur une coupe sagittale prouve que le PKD2L1 est exprimé faiblement au niveau de la terminaison des NcLCR projetée dans le canal central, le PKD2L1 est également exprimé au niveau du bud. C ; Visualisation des NcLCR de souris PKD2L1 positif autour du canal central.

En effet, les canaux PKD2L1 contribuent à la modulation de l'excitabilité des NcLCR. Il a été prouvé que chez les souris sauvages, les NcLCR génèrent plus de potentiels d'action que chez les souris KO- PKD2L1, dévoilant ainsi un rôle excitateur de ces canaux dans les NcLCR (Bushman et al. 2015; Huang et al. 2006; Orts-Del'immagine et al. 2012; Orts-Del'Immagine et al. 2016) (figure II.21). En fait, Orts - Del'immagine et coll. ont montré que l'ouverture d'un seul canal pouvait être suffisante pour dépolariser la membrane et déclencher un potentiel d'action.

Autrement dit, ce canal PKD2L1 en s'ouvrant de manière aléatoire participe à l'activité basale de PA ; ceci explique que chez les souris KO-PKD2L1 on n'observe moins de potentiels d'action que chez les animaux contrôle.

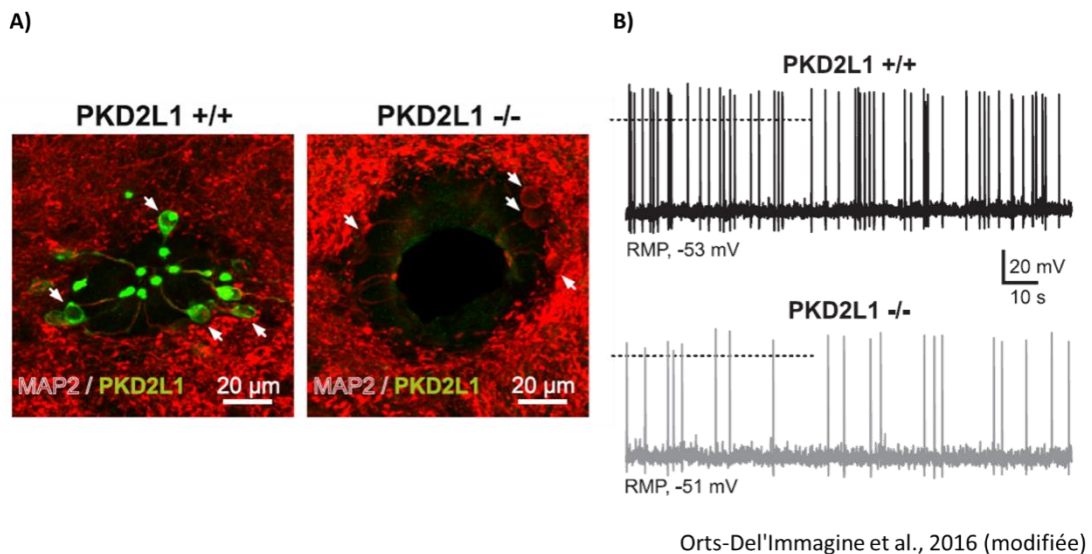


Figure II.21. PKD2L1 est un générateur de PA dans les NcLCR

A ; un double immunomarquage de coupes coronales issues de tronc cérébral de souris sauvages (PKD2L1 +/+ ; à gauche) et de souris mutantes du gène PKD2L1 (PKD2L1 -/- ; à droite). Les souris sauvages sont marquées par les anticorps PKD2L1 et le marqueur dendritique MAP2 alors que les mutantes n'affichent que le marqueur MAP2. B ; l'enregistrement effectué en potentiel de repos (RMP) illustre une activité de décharge spontanée dans les NcLCR, chez les animaux sauvages (en haut) et les animaux mutants. Ces deux tracés indiquent que l'absence du canal PKD2L1 affecte la fréquence des PA dans les NcLCR.

5. Expression des marqueurs de plasticité dans les NcLCR

La région autour du canal central a longtemps été considérée comme une niche neuronale. Dans ce but, un nombre important de recherches se sont focalisées sur l'organisation de cette niche, sur la place et le rôle des NcLCR dans cette niche. De manière intéressante, il a été montré que les NcLCR expriment plusieurs marqueurs de plasticité comme la PSA-NCAM (*Polysialylated neuronal cell adhesion molecule*), un marqueur de neuroplasticité (Bonfanti et al. 1992; Seki et Arai 1993; Alonso 1999; Stoeckel et al. 2003; Marichal et al. 2009). De plus, les chercheurs ont remarqué très rapidement que ces neurones ont un profil de maturité assez particulier. Ils seraient dans une phase intermédiaire de développement appelée mode « stand-by » (Marichal et al. 2009) et coexprimeraient à la fois des marqueurs de maturité et

d'immatunité. Comme présenté dans la figure suivante (figure II.22), les NcLCR expriment des marqueurs de maturité (NeuN, GFAP,...), d'immatunité (Nkx6.1, DCX, Vimentine,...) ainsi que d'autres marqueurs de prolifération et de migration cellulaire caractéristiques des zones de cellules souches (tel que BrdU) (Marichal et al. 2009; Orts-Del'immagine et al. 2014; Orts-Del'immagine et al. 2017; Petracca et al. 2016).

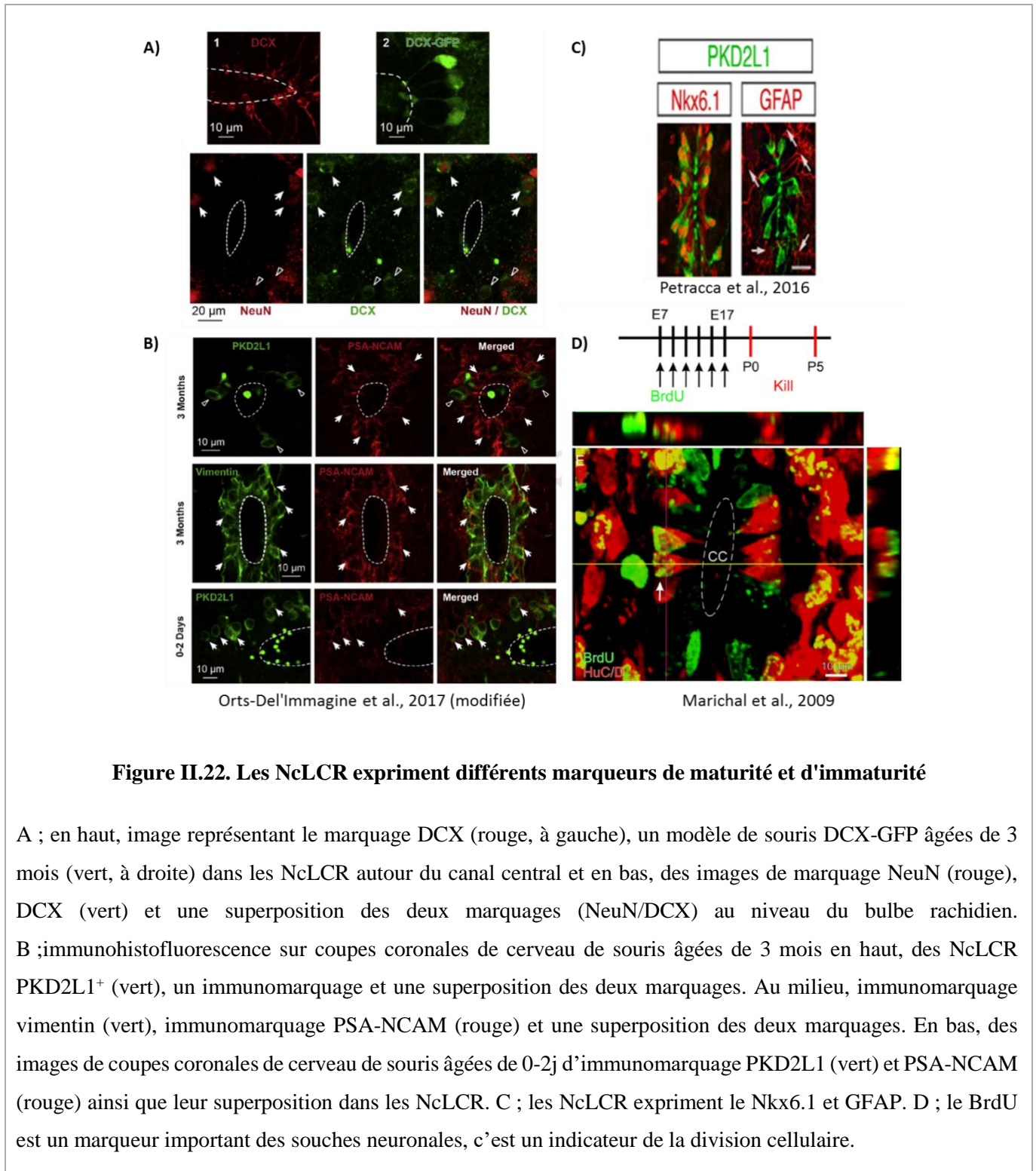


Figure II.22. Les NcLCR expriment différents marqueurs de maturité et d'immatunité

A ; en haut, image représentant le marquage DCX (rouge, à gauche), un modèle de souris DCX-GFP âgées de 3 mois (vert, à droite) dans les NcLCR autour du canal central et en bas, des images de marquage NeuN (rouge), DCX (vert) et une superposition des deux marquages (NeuN/DCX) au niveau du bulbe rachidien. B ; immunohistofluorescence sur coupes coronales de cerveau de souris âgées de 3 mois en haut, des NcLCR PKD2L1⁺ (vert), un immunomarquage et une superposition des deux marquages. Au milieu, immunomarquage vimentin (vert), immunomarquage PSA-NCAM (rouge) et une superposition des deux marquages. En bas, des images de coupes coronales de cerveau de souris âgées de 0-2j d'immunomarquage PKD2L1 (vert) et PSA-NCAM (rouge) ainsi que leur superposition dans les NcLCR. C ; les NcLCR expriment le Nkx6.1 et GFAP. D ; le BrdU est un marqueur important des souches neuronales, c'est un indicateur de la division cellulaire.

F. Fonctions physiologiques des NcLCR

1. Les NcLCR constituent une interface sensorielle entre le LCR et le SNC

Depuis presque un siècle, Kolmer et Agduhr ont cité les NcLCR en tant que neurones sensoriels sensibles aux contenus du LCR (1922, 1921, 1931). Erik Agduhr a suggéré que ces cellules neurosensorielles peuvent avoir des fonctions régulatrices dans la moelle épinière (1922). De son côté, Walter Kolmer a suggéré que ces cellules peuvent avoir une fonction de mécanorécepteurs : en percevant les mouvements de la colonne vertébrale et en se connectant via leurs axones aux motoneurones constituant ainsi un composant majeur de la proprioception⁵ dans le circuit moto-sensoriel intra spinal (1922, 1921, 1931). Plus tard, Vigh et Vigh-Teichmann qui ont largement étudié l'ultrastructure du système NcLCR, ont indiqué que ceux-ci ont un rôle sensoriel grâce à leur morphologie assez particulière (Böhm and Wyart 2016; Vigh et al. 1971b, 1971a, 1971c, 1977; Vigh and Vigh-Teichmann 1973) (figure II.23).

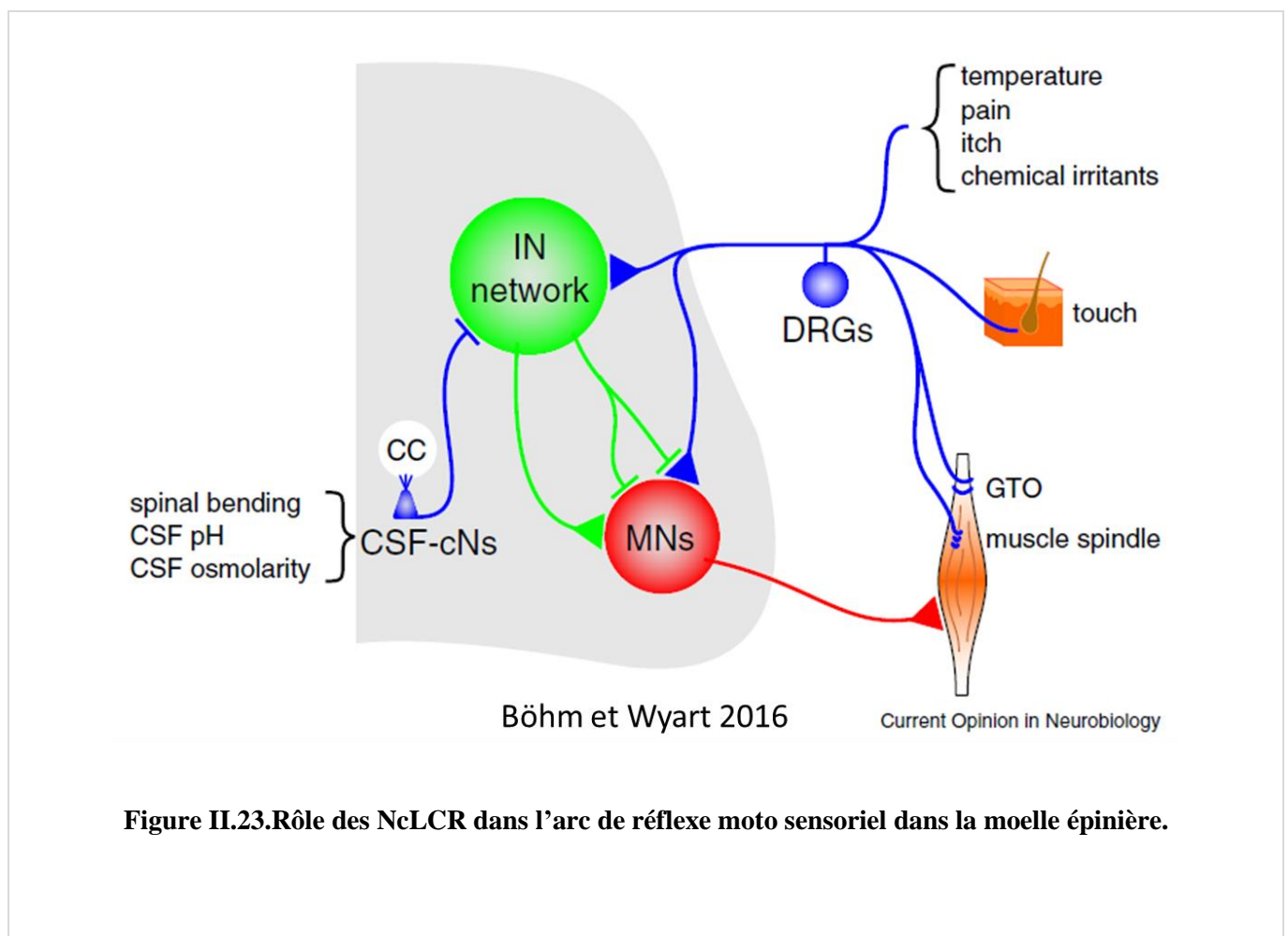


Figure II.23. Rôle des NcLCR dans l'arc de réflexe moto sensoriel dans la moelle épinière.

⁵La proprioception regroupe les récepteurs et l'ensemble des terminaisons nerveuses permettant la perception, consciente ou inconsciente, de la position des différentes parties du corps sans avoir à les observer visuellement.

Figure II.23 : Le rôle des NcLCR dans l'arc de réflexe moto sensoriel dans la moelle épinière (suite)

Les informations sensorielles internes sont véhiculées par les neurones sensoriels des racines dorsales (DRG), sous forme de signal excitateur, vers les motoneurons (MNs) ou le réseau des interneurons spinaux (IN network). Ce réseau spinal intègre également des informations sensorielles externes (mécanique, thermique, nociceptive) mais aussi proprioceptive (longueur et tension musculaire) transmises par DRG. De plus d'autres informations d'origine somatique peuvent provenir des mécanorécepteurs des fuseaux neuromusculaires et des organes tendineux Golgi (GTO). Cette intégration de diverses informations sensorielles est à la base de réflexe. L'idée nouvelle est que ce même réseau spinal intègre des informations d'origine centrale (courbure de la moelle épinière, pH et osmolarité du LCR) transmises par les NcLCR.

L'hypothèse chémosensorielle a été renforcée par des études plus récentes chez des mammifères montrant que les NcLCR expriment les canaux PKD2L1 (*Polycystic Kidney Disease 2-like 1*), connus au préalable par leur rôle dans la sensation du goût acide dans les papilles gustatives (Ishimaru et al. 2006, 2010; Inada et al. 2008; Ishii et al. 2009; Kawaguchi et al. 2010; Yu et al. 2012; Zheng et al. 2015). En outre, ces canaux sont modulés par les variations de pH extracellulaire et d'osmolarité (Huang et al. 2006; Orts-Del'Immagine et al. 2012; Orts-Del'Immagine et al. 2016). Les NcLCR sont donc sensibles aux variations du pH du LCR et pourraient retransmettre ces informations aux circuits spinaux (figure II.24).

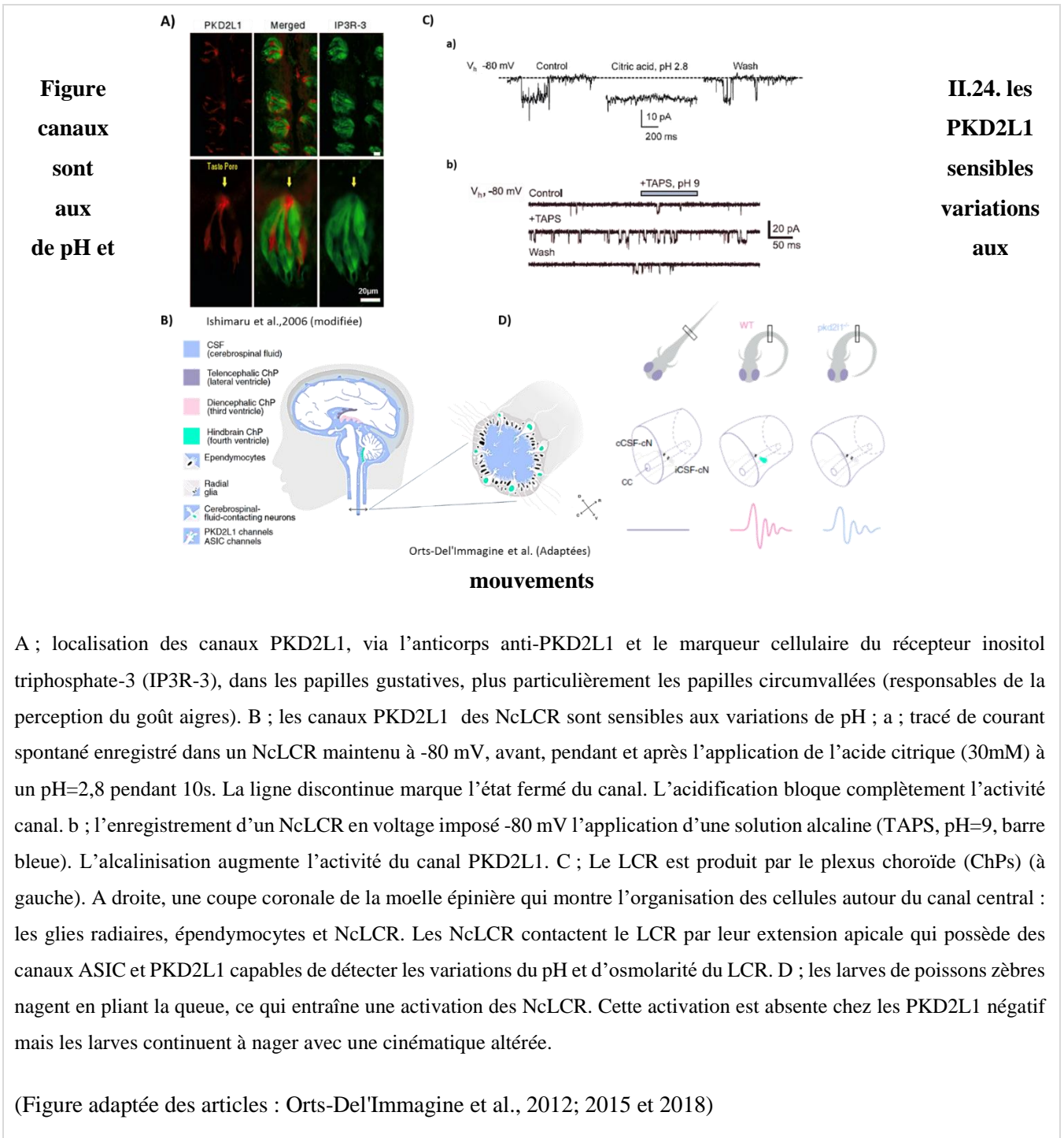
De plus, les NcLCR expriment d'autres canaux activés par un pH acide à l'inverse des PK2DL1 qui eux en sont inhibés. Ces canaux, appelés ASIC (*Acid-sensing ion channel*), sont des canaux ioniques activés par l'acidité extracellulaire. Il existe six isoformes de ces canaux codés par quatre gènes différents: ASIC1, ASIC2, ASIC3 et ASIC4. ASIC1a, 1b et 2a, 2b. Ces derniers s'assemblent en homo- ou en hétéro-trimères pour former un canal fonctionnel (Gonzales et al. 2009; Jasti et al. 2007).

Les NcLCR expriment trois sous-unités : ASIC1, ASIC2 et ASIC3. Parmi ces derniers le canal ASIC3 se distingue par son hypersensibilité aux protons (H^+) extracellulaires, est activé par toute variation du pH aussi minime soit-elle ($pH \approx 6$) (Jalalvand et al. 2016; Orts-Del'Immagine et al. 2016).

Les canaux ASIC3 sont connus pour être exprimés dans les neurones sensoriels et sont impliqués dans la mécanoperception. Une étude chez la lamproie a révélé que les ASIC3 des NcLCR sont également sensibles aux mouvements des fluides (Jalalvand et al. 2016). Idem d'autres travaux chez le poisson zèbre, ont confirmé que les PKD2L1 sont impliqués dans la

perception des mouvements locomoteurs et les flexions de la moelle épinière (Böhm et al. 2016) (figure II.24 D).

Pour conclure, les NcLCR sont des mécano- et chimio-récepteurs à travers l'expression des canaux des canaux PKD2L1 et ASIC sensibles aux variations de pH et d'osmolarité.



Une autre hypothèse avait également été avancée pour expliquer la sensibilité des NcLCR aux protons. En effet, chez le rat, les NcLCR expriment des récepteurs à l'ATP P2X2 (Stoeckel

et al. 2003) dont l'activité est sensible au pH (Dunn et al. 2001; Khakh 2001). Cependant le rôle de ces récepteurs P2X₂ dans la détection de variations de pH par les NcLCR n'a jamais été démontrée (figure II.25).

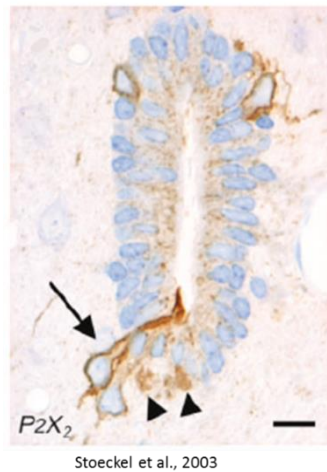


Figure II.25. Expression du récepteur P2X₂ de l'ATP dans les NcLCR

2. Propriétés sécrétoires de NcLCR

En plus de la fonction sensorielle suggérée pour les NcLCR, des propriétés sécrétoires leur ont été décrites. Des investigations menées au niveau ultrastructural, par Vigh et Vigh-Teichmann plaident pour le fait que ces cellules constituent avec leurs axones un système neurosécrétoire basé sur leurs terminaisons contenant des vésicules synaptiques. Il a été montré aussi que ces terminaisons sont rattachées à la membrane basale de la surface externe du tissu nerveux par des hémidesmosomes où les vésicules synaptiques s'accumulent (Vigh et al. 1971a, 1977; Vigh & Vigh-Teichmann 1973). Les NcLCR reçoivent des stimuli acheminés par le LCR interne (ventriculaire) et répondent par une activité neurosécrétoire dirigée vers l'espace sous-arachnoïdien (LCR externe) qu'ils atteignent par leurs axones. Leonhardt a aussi attribué une fonction sécrétoire alternative aux NcLCR (Leonhardt 1967) qui a lieu au niveau du bud à partir duquel les NcLCR peuvent sécréter leurs produits de « neurosécrétions » dans le LCR du canal central. Plus tard, des grandes vésicules denses ont été caractérisées au niveau du bud chez le zebrafish (Djenoune et al. 2017) mais le mécanisme de libération de ces vésicules dans le LCR reste à démontrer.

Le cytoplasme du bud renferme des mitochondries, des endosomes, des granules denses, des vésicules claires et denses (Alibardi and Meyer-Rochow 1990; Schueren and DeSantis 1985).

Chez le rat, des vésicules de différentes tailles, formes (rondes ou ovales) et densités (denses ou claires) renfermant la décarboxylase des acides L-aminés aromatiques (AADC ; *L-amino-acid decarboxylase*) ont été observées dans le cytoplasme du bud des NcLCR. L'AADC est une enzyme qui catalyse la synthèse de plusieurs neurotransmetteurs (NT) amines comme la sérotonine, la dopamine, l'adrénaline ou encore la noradrénaline. Dans le SNC, l'AADC est spécifique aux neurones qui synthétisent, stockent et libèrent les NT amines (Jaeger et al. 1983).

Les extensions apicales des NcLCR sont liées aux cellules épendymaires environnantes par des jonctions d'ancrage (Vigh & Vigh-Teichmann 1971; Vigh et al. 1974; LaMotte 1987), bien que d'autres auteurs aient observé des jonctions de type «*adherens*» entre l'extension apicale et les cellules épendymaires (Stoeckel et al. 2003) ou les deux jonctions à la fois (LaMotte 1987).

3. Rôle des NcLCR dans le circuit moteur

L'activation des NcLCR induit la locomotion dans les larves des poissons zèbres (Wyard et al. 2009). La preuve étant que ces cellules pourraient projeter directement dans le réseau locomoteur spinal. Des recherches plus récentes renforcent cette hypothèse (Djenoune et al. 2017; Fidelin et al. 2015; Hubbard et al. 2016). L'étude anatomique des projections des NcLCR a permis de les classer en trois groupes d'interneurones : des interneurones promoteurs excitateurs V0-v, V3, et des interneurones V2a (Djenoune et al. 2017; Fidelin et al. 2015). Ces trois classes sont actives lors de la locomotion lente chez la larve du *poisson zèbre* (Borowska et al. 2013; Crone et al. 2008; Dougherty and Kiehn 2010a, 2010b; Menelaou et al. 2014; Zhang et al. 2008). Remarquablement, ce travail révèle que les NcLCR ont une action inhibitrice lorsqu'ils sont stimulés pendant la locomotion, tandis qu'ils retardent la natation simulée au repos. Un rapport direct a été également démontré entre une sous-population des NcLCR et motoneurones. Les NcLCR peuvent configurer et régler la vitesse du circuit locomoteur et contrôler la fréquence et la durée des événements locomoteurs (Djenoune et al. 2017; Hubbard et al. 2016) (figure II.26).

Chez la lamproie, les NcLCR envoient des projections au plexus ventral (Agnati et al. 1995; Jalalvand et al. 2014b; Megías et al. 2003) ou vers la marge ventrolatérale où se situent leurs terminaisons (Megías et al. 2003; Vigh et al. 1977) Cette innervation permet des interactions entre le LCR interne et externe. Les NcLCR du lamproie, semblent contacter le plexus latéral via des récepteurs intraspinaux des cellules de bord (*edge cells* en anglais) (Christenson et al. 1991b; Jalalvand et al. 2014a), qui sont des neurones mécanosensoriels modulant le réseau locomoteur (Grillner and Blomberg 1984; Vinay et al. 1996). Cette projection

suggère que les NcLCR peuvent moduler la locomotion en influençant les cellules de bord et ainsi le retour d'information sensoriel concernant la locomotion. En revanche, il reste à vérifier si les NcLCR sont toujours connectés aux neurones promoteurs ou si leur rôle modulateur dans le réseau locomoteur spinal est conservé chez les mammifères.

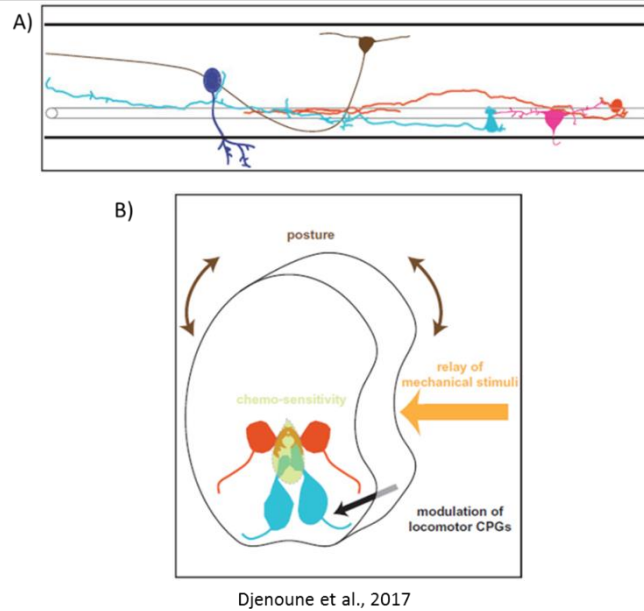


Figure II.26. Exemple de l'action des NcLCR dans le processus de locomotion chez le *zebrafish*.

A; Les NcLCR spinaux contactent plusieurs classes d'interneurones et des motoneurones au niveau de la moelle épinière du poisson zèbre. Le NcLCR dorsal (en bleu) projette sur V0-v (au marron). Alors que le NcLCR ventral (en bleu clair) contacte les CaP (des motoneurones primaires) (en rouge). Les deux populations des NcLCR sont connectés aux interneurones sensoriels appelés CoPA (en rose).

B; Les NcLCR Spinaux font partie d'une interface sensorielle entre le LCR et le SNC. Les NcLCR répondent à la courbure de la moelle épinière, assurent le contrôle d'équilibre postural, en ayant une projection sur le réseau locomoteur spinal (CPGs) et pourrait donc intégrer des signaux depuis le LCR.

G. Propriétés électrophysiologiques

Les neurones contactant le liquide céphalorachidien ont une faible capacité membranaire (cm) (3.4 ± 0.2 pF; $n = 70$), une résistance membranaire élevée (2.1 ± 0.3 G₋; $n = 70$) et un potentiel de repos (V_r) assez dépolarisé en comparaison avec d'autres populations neuronales, environ $-57,08 \pm 7,39$ mV ($n = 12$). (Orts-Del'immagine et al., 2012).

En mode courant imposé à -60 mV et en injectant un courant entre +10 et +20 pA, les NcLCR génèrent des potentiels d'action (PA) ce qui prouve leur nature neuronale. L'analyse du patron de décharge indique que les NcLCR forment deux populations neuronales: des neurones à décharge tonique de PA (41%) et des neurones à décharge phasique de PA (59%), lors de l'injection d'un courant positif. En revanche, les deux populations gardent les mêmes propriétés passives (même capacité et résistance membranaires et même potentiel de repos) (Orts-Del'immagine et al., 2012) (figure II.27).

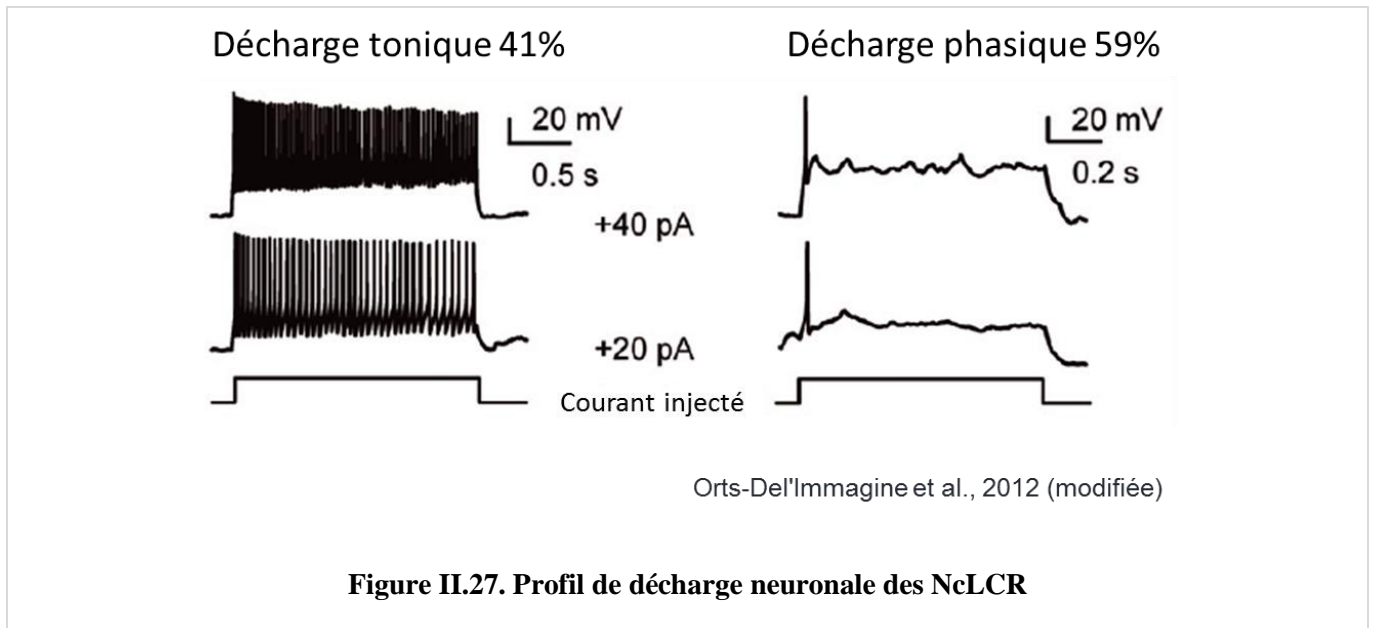


Figure II.27. Profil de décharge neuronale des NcLCR

III. LE RECEPTEUR GABA_B

L'acide γ -aminobutyrique (GABA) est le neurotransmetteur inhibiteur majeur du système nerveux central (SNC). Il joue un rôle clé dans la modulation de l'activité neuronale. Le GABA se fixe sur deux grandes classes de récepteurs : d'une part, les récepteurs ionotropiques GABA_A,

d'autre part, les récepteurs métabotropiques GABA_B (figure III.1 et tableau III.1). Contrairement aux récepteurs GABA_A qui sont des récepteurs-canaux, les récepteurs GABA_B sont des récepteurs couplés aux protéines G liant des nucléotides : guanosine diphosphate et guanosine triphosphate. Ces protéines G interagissent avec de nombreuses autres protéines dont des canaux ioniques calciques (Ca²⁺) et potassiques (K⁺).

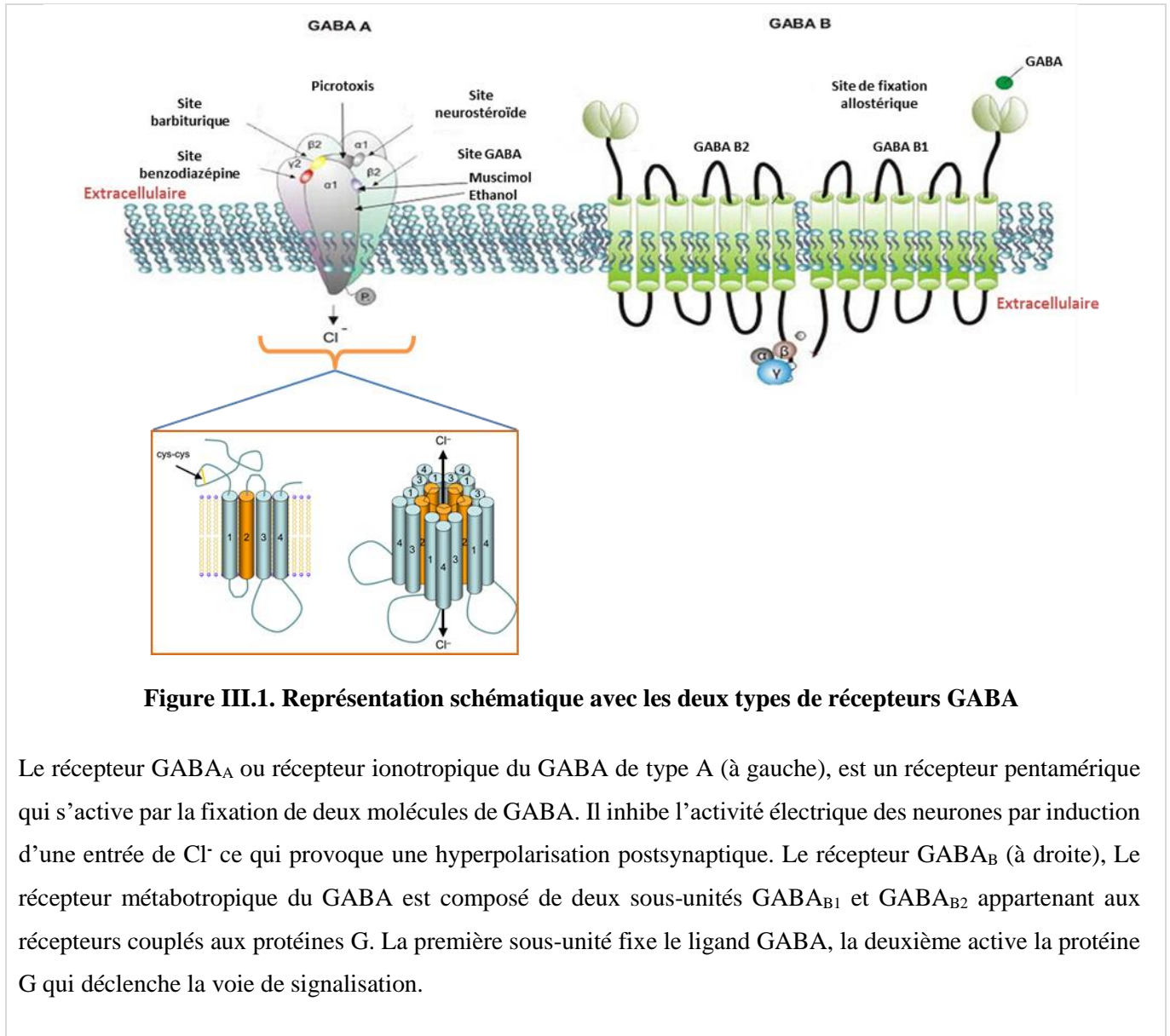


Tableau III.1. Variété de récepteurs métabotropiques de différents neurotransmetteurs

Récepteur	Muscarinique	Glutamate	GABA _B	Dopamine	Adrénérrique	Histamine	Sérotonine	Purines
Sous-type de récepteur	M ₁	Class I	GABA _{B1}	D ₁	Alpha	H ₁	5-HT _{1A}	Adenosine
	M ₂	mGlu ₁	GABA _{B2}	D ₂	α _{1A}	H ₂	5-HT _{1B}	A ₁
	M ₃	mGlu ₅		D ₃	α _{1B}	H ₃	5-HT _{1D}	A _{2A}
	M ₄	Class II		D ₄	α _{1D}	H ₄	5-HT _{1E}	A _{2B}
	M ₅	mGlu ₂		D ₅	α _{2A}		5-HT _{1F}	A ₃
		mGlu ₃			α _{2B}		5-HT _{2A}	P2Y
		Class III			α _{2C}		5-HT _{2B}	P2Y ₁
		mGlu ₄			Beta		5-HT _{2C}	P2Y ₂
		mGlu ₆			β ₁		5-HT ₄	P2Y ₄
		mGlu ₇			β ₂		5-HT _{5A}	P2Y ₆
		mGlu ₈			β ₃		5-HT ₆	P2Y ₁₁
							5-HT ₇	P2Y ₁₂
								P2Y ₁₃
								P2Y ₁₄

Purves et al., 2008, p. 116

Les récepteurs GABA_B sont largement exprimés dans le système nerveux, ils ont été impliqués dans une grande variété de troubles neurologiques et psychiatriques, y compris les crises d'absence (épilepsie), la toxicité du γ -hydroxybutyrate et, plus récemment (Benes and Berretta 2001), l'encéphalite limbique auto-immune.

Le baclofène est le seul agoniste des récepteurs GABA_B, disponible en clinique et utilisé pour le traitement de la spasticité⁶, la dystonie⁷, ainsi que certains types de douleurs neuropathiques. Ces récepteurs peuvent également constituer une cible pour la prise en charge de la toxicomanie, de l'anxiété et de la douleur viscérale (Brusberg et al. 2009).

Dans ce chapitre, nous allons présenter la structure de ce récepteur (A), sa pharmacologie (B), ses effecteurs (C), ainsi que les rôles physiologiques des récepteurs GABA_B et ses implications cliniques (D).

⁶ La spasticité correspond à la contraction involontaire et exagérée des muscles suite à une lésion cérébrale ou de la moelle épinière. Elle survient également chez les personnes tétraplégiques ou atteintes de sclérose en plaques.

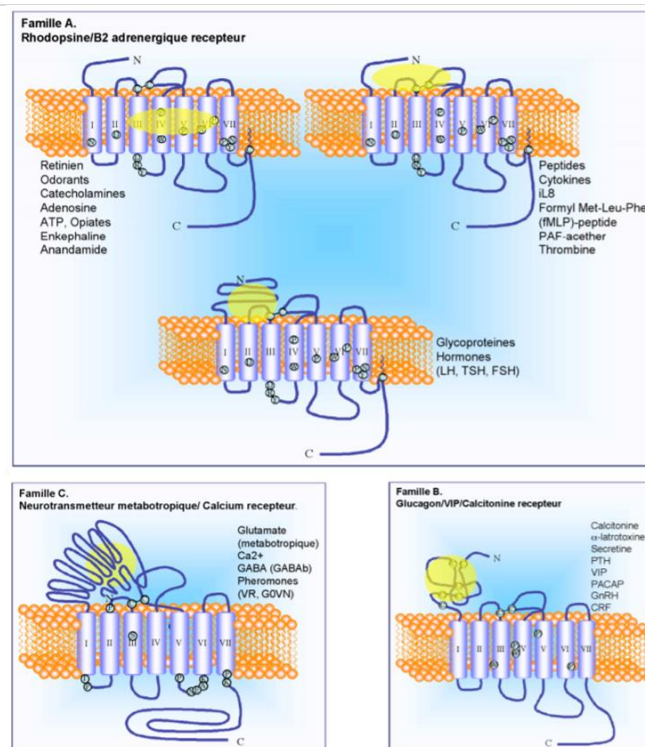
⁷ La dystonie est un trouble de tonus musculaire entraînant des contractions involontaires qui se traduisent par des mouvements répétitifs et des postures anormales.

A. Structure du récepteur GABA_B

Les propriétés structurales du récepteur GABA_B ont été caractérisées grâce au clonage du gène d'expression en utilisant l'antagoniste de haute affinité [¹²⁵I]-CGP64213. L'expression d'un récepteur GABA_B entièrement fonctionnel nécessitait un couplage entre deux sous-unités, à savoir : GABA_{B1} et GABA_{B2}. Les récepteurs GABA_B sont donc le premier exemple d'un récepteur métabotrope hétérodimère fonctionnel.

1. Appartenance à la famille 3 (ou C) des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)

En 1997, des chercheurs ont réussi à cloner la première sous-unité GABA_B, qu'ils ont nommée GABA_{B1} (Kaupmann et al., 1997). La séquence dérivée de GABA_{B1} indique qu'elle ne partage aucune similarité de séquence significative avec les récepteurs GABA_A, mais elle est classée dans la famille 3 (classe C) des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) (figures III.2). Cette famille comprend les récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluRs) ainsi que la majorité des récepteurs de la sérotonine, une famille de récepteurs de phéromone et certains récepteurs gustatifs des mammifères.



Gether et al., 2001

Figure III.2. Classification des RCPG

Comme les autres RCPG de la classe C, les sous-unités $GABA_{B1}$ présentent plusieurs caractéristiques (Colombo 2016), notamment une extrémité N-terminale très volumineuse, et surtout très organisée. Elle se structure en forme de double-lobes qui constituent la poche de fixation du ligand (Bockaert and Pin 1999), suivie de sept domaines transmembranaires rapprochés, indiquant leur appartenance aux RCPG (figure III.3).

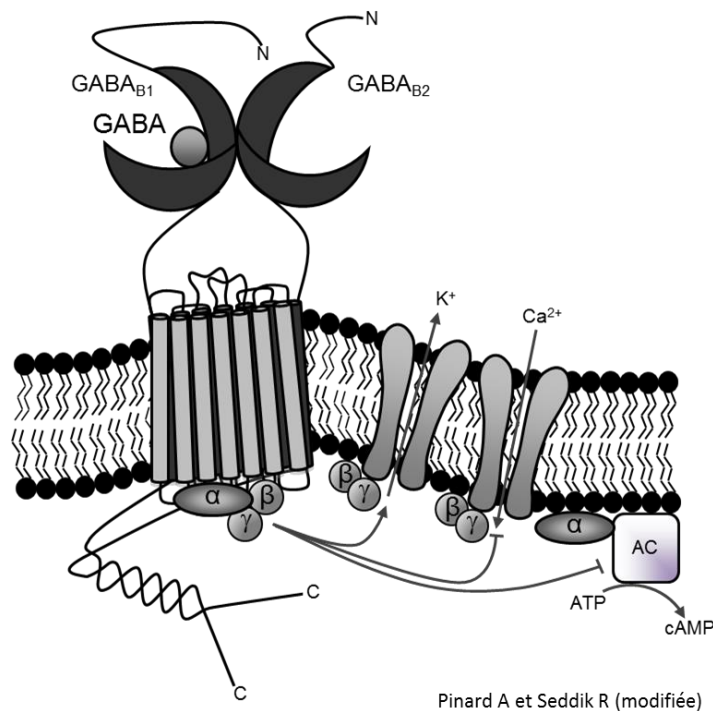


Figure III.3. Le récepteur GABAB est un RCPG de classe C

Il est composé de deux sous-unités, $GABA_{B1}$ qui fixe le ligand et $GABA_{B2}$ qui active la protéine G.

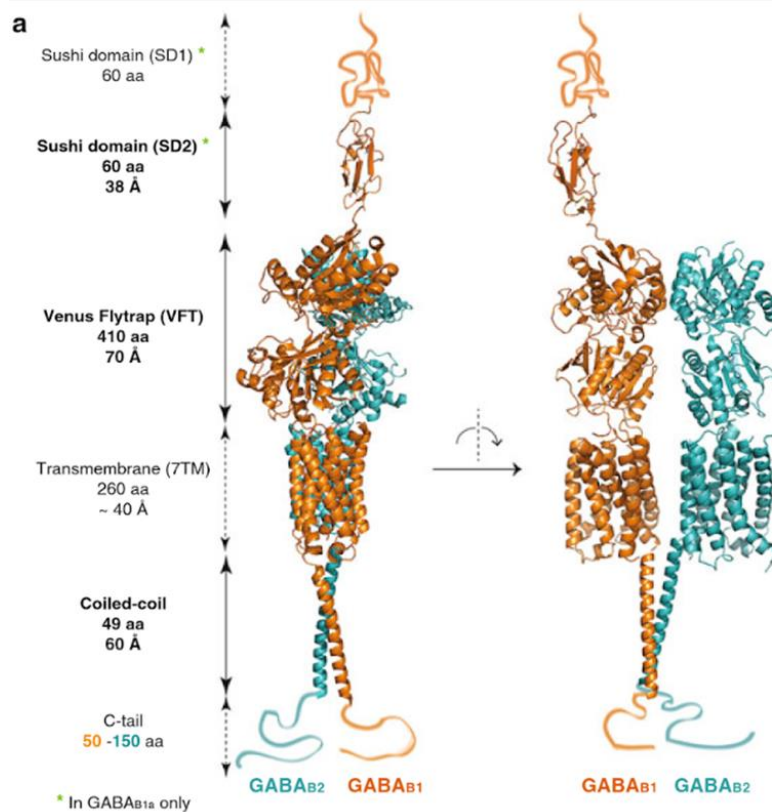
2. Récepteurs hétérodimères

Les récepteurs composés uniquement de la sous-unité $GABA_{B1}$ ne sont pas fonctionnels (Colombo 2016b). Alors qu'ils présentent des caractéristiques de liaison et des caractéristiques biochimiques similaires à celles des récepteurs $GABA_B$ natifs, plusieurs écarts importants ont été notés entre ces récepteurs clonés et les récepteurs $GABA_B$ natifs. Par exemple, l'affinité aux agonistes et aux antagonistes, qui est 100 à 150 fois inférieure pour le type $GABA_{B1}$ que pour les récepteurs natifs (Nakayasu et al. 1993). Plus important encore, lorsqu'il est exprimé dans des lignées cellulaires, le type $GABA_{B1}$ était couplé seulement et faiblement à l'adénylyl cyclase et ne se couple pas à d'autres effecteurs (Bettler et al. 2004), tels que les canaux calcium ou potassium. La raison de la non-fonctionnalité des récepteurs $GABA_{B1}$ a été examinée en utilisant

la technique du transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (HTFR, *homogeneous time-resolved fluorescence resonance energy transfer technology*) pour étudier la distribution cellulaire de la protéine GABA_{B1} (Maurel et al. 2004). Il a été constaté que GABA_{B1} était retenu dans le réticulum endoplasmique et donc n'atteint pas la surface cellulaire. Ainsi, il est apparu que le type GABA_{B1} nécessitait des informations supplémentaires pour le ciblage fonctionnel de la membrane plasmique.

3. Le nécessaire couplage entre GABA_{B1} et GABA_{B2}

L'incapacité de GABA_{B1} à produire des récepteurs GABA_B fonctionnels a inspiré une recherche intensive d'autres gènes apparentés, aboutissant à la découverte d'un second gène récepteur GABA_B, appelé GABA_{B2} (Bettler et al. 2004). Ce sous-type de récepteur était homologue à 35% avec GABA_{B1} et présentait de nombreuses caractéristiques structurales du GABA_{B1}, y compris un poids moléculaire élevé, un N-terminale extracellulaire étendu et sept domaines transmembranaires (figure III.4).



Colombo, 2016, p. 96

Figure III.4. Représentation des domaines structuraux composant le récepteur GABA_B

Il est important de noter que ce récepteur doit être co-exprimé avec GABA_{B1} pour former un récepteur GABA_B fonctionnel. La co-expression de GABA_{B1} et GABA_{B2} a entraîné une expression efficace du récepteur à la surface cellulaire et l'affinité agoniste de ces récepteurs hétérodimériques était similaire à celle des récepteurs GABA_B natifs (Colombo 2016a). Cette découverte représentait la première preuve d'hétérodimérisation parmi les RCPG. Les récepteurs GABA_B hétéromères clonés sont entièrement fonctionnels et présentent un couplage robuste avec tous les effecteurs des récepteurs GABA_B natifs.

L'existence de l'hétérodimère GABA_B dans les neurones a été confirmée par des expériences d'immunoprécipitation (Bettler et al. 2004). Lors de ces expériences, les anticorps dirigés contre le GABA_{B2} ont coprécipité efficacement les protéines GABA_{B1} des membranes corticales. Inversement, les anticorps qui reconnaissent le GABA_{B1} ont coprécipité le récepteur GABA_{B2}. Ainsi, les récepteurs GABA_B natifs sont des hétérodimères composés de GABA_{B1} et GABA_{B2}.

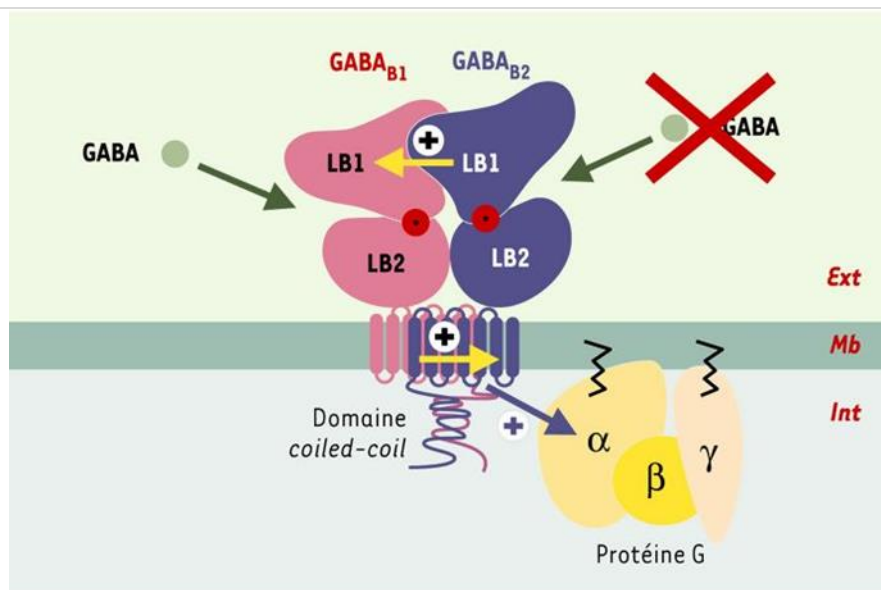
Des études de lignées de souris transgéniques (*KO GABA_{B1}* ou *KO GABA_{B2}*) ont montré que les souris dépourvues du gène GABA_{B1} ou GABA_{B2} présentent une perte de toutes les réponses GABA_B typiques (Sanger et al. 2002). Ces résultats indiquent l'importance de l'assemblage hétérodimère pour l'expression d'un récepteur fonctionnel. Ces résultats suggèrent également que, chez les souris de type sauvage, la quasi-totalité des protéines GABA_{B1} sont associées aux GABA_{B2}. Ces études confirment l'hypothèse selon laquelle les réponses GABA_B natives seraient principalement médiées par des récepteurs hétéromères dérivés des gènes GABA_{B1} et GABA_{B2}.

Pour les récepteurs GABA_B natifs et recombinants, l'interaction des sous-unités GABA_{B1} et GABA_{B2} au sein de la cellule est essentielle pour l'assemblage correct de l'hétérodimère sur la membrane plasmique. Nous savons que le GABA_{B1} ne peut pas atteindre la surface cellulaire à cause de la présence d'un signal de rétention du réticulum endoplasmique (RE) dans sa queue cytoplasmique (Couve et al. 1998). Le signal de rétention du RE dans GABA_{B1} est situé dans un domaine α -hélicoïdal dans l'extrémité C-terminale (aussi appelée extrémité carboxy-terminale, extrémité COOH ou terminaison carboxyle) du peptide. Il s'agit d'un domaine en spirale également présent dans l'extrémité C-terminale du type GABA_{B2}. Les deux types GABA_{B1} et GABA_{B2} forment un hétérodimère étroitement couplé via une interaction de ces deux domaines enroulés. La formation de cet hétérodimère masque le signal de rétention du RE dans GABA_{B1}, permettant au récepteur hétéromère de se déplacer vers la surface cellulaire (Calver et al. 2001;

Gassmann et al. 2005; Pagano et al. 2001). Le motif de rétention du RE assure donc que seul le récepteur assemblé correctement peut être exprimé à la surface de la cellule.

De nombreux récepteurs de la classe C des RCPG, y compris les récepteurs métabotropiques du glutamate et le récepteur sensible au Ca^{2+} , peuvent former des homodimères (Giraldo and Pin 2011). Les récepteurs GABA_B étaient les premiers hétérodimères fonctionnels à être identifiés dans la classe métabotropique (Bettler et al. 2004). La formation de dimères de ces récepteurs s'est avérée être due à l'interaction disulfure des résidus de cystéine dans le domaine N-terminale extracellulaire. Ces résidus de cystéine sont absents dans le cas du récepteur GABA_B , qui se dimérise principalement par l'interaction des domaines en spirale enroulée dans l'extrémité carboxy-terminale.

Ces récepteurs étroitement apparentés ont développé différents mécanismes de dimérisation, ce qui suggère son importance pour cette classe de récepteurs.



Galvez T., et Pin J. P., 2003

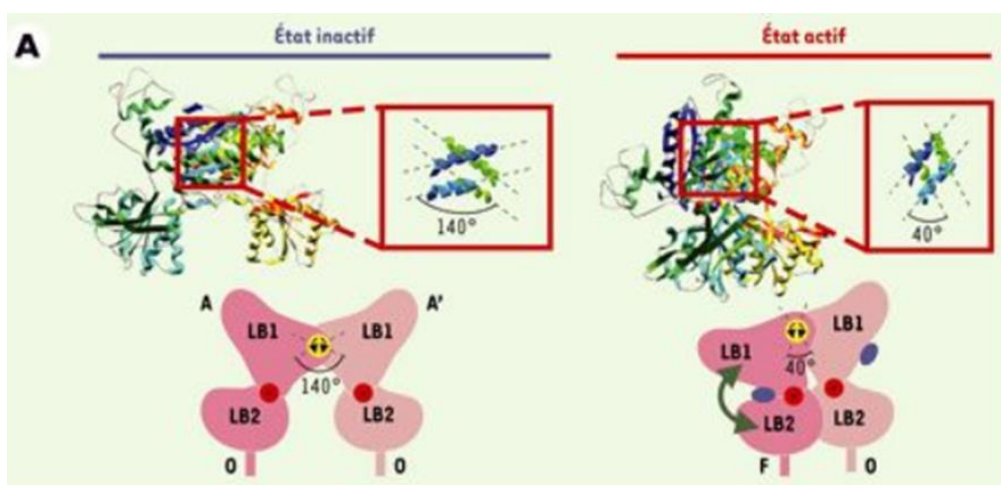
Figure III.5. Mécanisme interactionnel des sous-unités GABA_{B1} et GABA_{B2}

LB1 : lobe 1 et LB2 : lobe 2 du domaine « *Venus flytrap* »

Les sous-unités GABA_{B1} et GABA_{B2} possèdent une interaction physique des protéines dans le domaine intracellulaire appelé coiled-coil (figure III.5). Le type GABA_{B1} comporte le

site de liaison du ligand (GABA) et ses agonistes via le domaine Venus flytrap, tandis que le domaine heptahélices du GABA_{B2} assure le couplage avec les protéines G via les sous-unités α , β et γ . En revanche, les domaines Venus flytrap de GABA_{B2} et heptahélices du GABA_{B1} œuvrent par ailleurs à accroître l'efficacité du couplage ainsi que l'affinité des agonistes (Galvez et al. 2001; Kniazeff 2002; Nelson et al. 2001). La fonctionnalité du récepteur GABA_B dépend donc de la coopération des deux sous-unités pour devenir effective.

La liaison des deux protomères se trouve facilitée par l'amplitude des mouvements des domaines heptahélices vis-à-vis des domaines Venus flytrap extracellulaires (figure III.6). Dès lors que la fermeture des domaines Venus flytrap est engagée, la présence de l'agoniste induit un changement conformationnel des domaines heptahélices par lequel le contact entre les sous-unités α du lobe LB1 de chaque monomère deviennent parallèles alors qu'elles forment un angle de 140° en l'absence d'agoniste (Kunishima et al. 2000). De leur côté, les lobes LB2 se trouvent éloignés par effet électrostatique (Tsuchiya et al. 2002). De là, lorsque la liaison est stabilisée, les hélices de chaque monomère réduisent leur angularité à 40° , ce qui donne lieu à la formalisation d'une nouvelle interface de contact entre les deux LB2.



Galvez T., et Pin J. P., 2003

Figure III.6 ; Formalisation d'une interface de contact

À gauche, l'état inactif est caractérisé par un angle de 140° entre les LB1 de chaque monomère ; à droite, cet angle se ferme à 40° avec un changement conformation d'un seul protomère ; le pivotement des deux LB1 induit un nouvel espace de contact entre les deux LB2.

B. Distribution des récepteurs GABA_B dans le système nerveux central

Les récepteurs GABA_B sont caractérisés par leur omniprésence dans le SNC (Bowery et al. 1987) Les densités les plus fortes de ce récepteur étant présentes au niveau du cervelet (Turgeon and Albin 1994) où les sites de liaison du GABA_B ont été localisés plus précisément au niveau des dendrites des cellules Purkinje et leurs axones. D'autres études ont montré l'existence des R-GABA_B dans le noyau vestibulaire médian, qui est connu pour recevoir des projections des cellules Purkinje du cervelet. La présence d'une densité importante des récepteurs GABA_B a également été documentée dans le noyau cochléaire (Juiz et al. 1994).

Les récepteur GABA_B sont présents chez les vertébrés amniotes et sont conservés remarquablement au cours de l'évolution. Leur distribution chez les mammifères est curieusement similaire à celle rencontré au niveau du prosencéphale et du tronc cérébral chez les oiseaux (Olsen and DeLorey 1999).

La sous-unité GABA_{B1} est abondamment exprimée au niveau du cortex cérébral, des cellules pyramidales des régions CA3-CA1 de l'hippocampe, du gyrus denté, du ganglion basal, de l'aire ventrale tegmentale, du bulbe olfactif, du thalamus, de l'amygdala et de l'hypothalamus, ainsi qu'au niveau des cellules de Purkinje et les cellules de la couche granulaire du cervelet. Pour ce qui est de la sous-unité GABA_{B2}, elle est fortement exprimée dans les cellules de Purkinje, le cortex cérébral, le thalamus et les cellules pyramidales de l'hippocampe mais faiblement exprimée dans l'hypothalamus (Calver et al. 2000) (figure III.7).

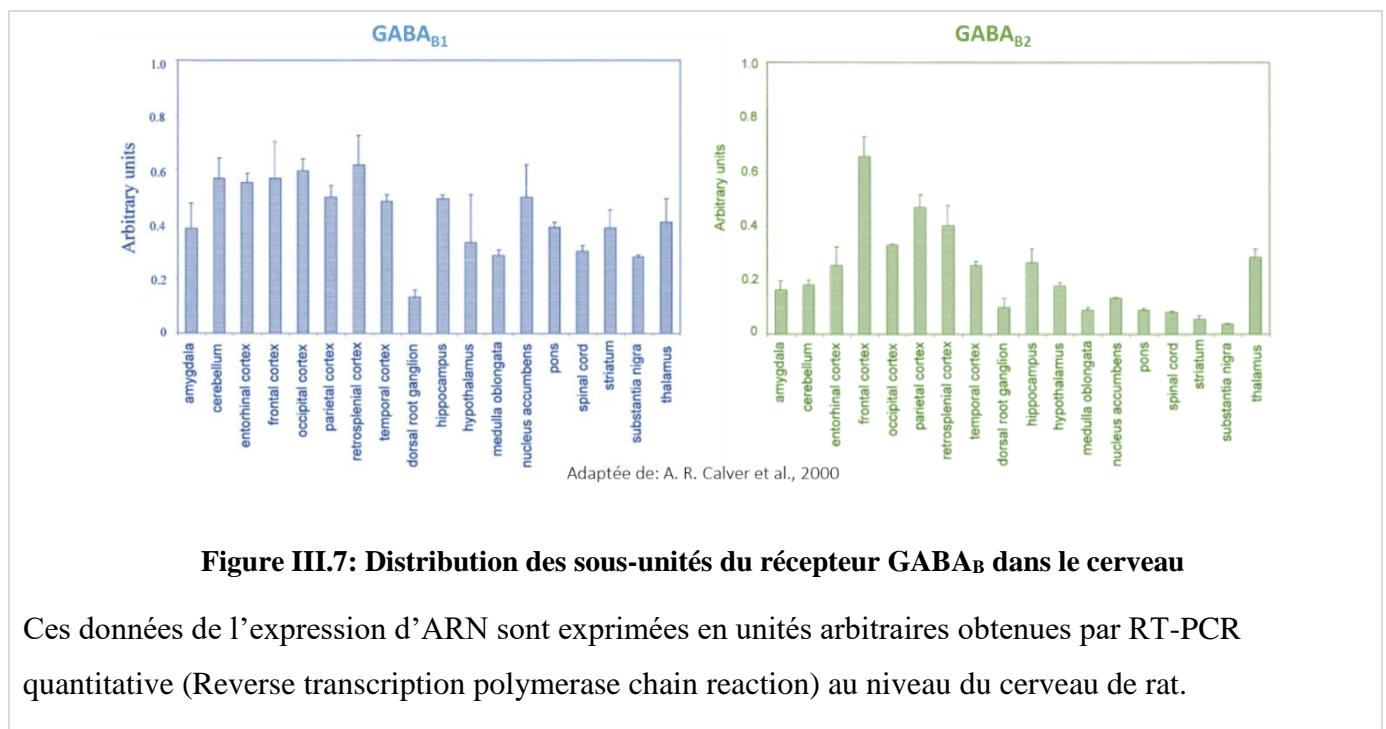


Figure III.7: Distribution des sous-unités du récepteur GABA_B dans le cerveau

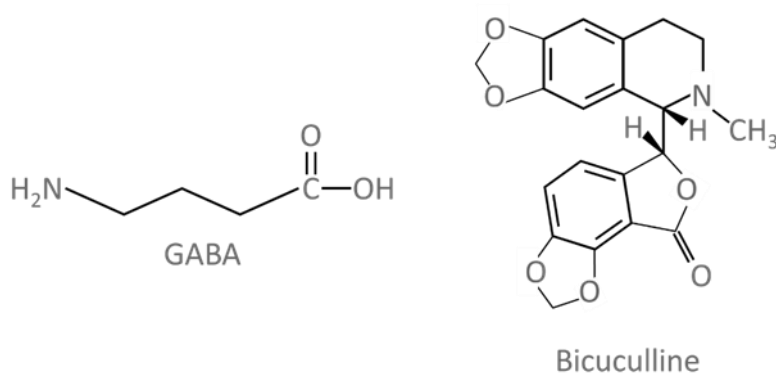
Ces données de l'expression d'ARN sont exprimées en unités arbitraires obtenues par RT-PCR quantitative (Reverse transcription polymerase chain reaction) au niveau du cerveau de rat.

La présence de fortes densités du R-GABA_B dans plusieurs régions cérébrales plaide fortement pour l'implication de ce récepteur dans un certain nombre de fonctions au niveau du SNC. Dans un chapitre ultérieur (Rôles physiologiques R-GABA_B dans le SNC ; page :), nous allons voir que l'agoniste de ce récepteur est utilisé dans le traitement de plusieurs pathologies impliquant différents centres nerveux, tels que : le système moteur (Moelle épinière) ; le traitement de l'épilepsie (Hippocampe) ; la nociception (système neurosensoriel) ; le traitement de l'addiction (circuit de récompense) ou encore la prise alimentaire (hypothalamus et tronc cérébral).

C. Pharmacologie du récepteur

1. Aperçu historique sur le récepteur GABA_B

Vingt ans après la mise en évidence du neurotransmetteur GABA dans le cerveau (Awapara et al., 1950; Roberts et Frankel, 1950), le premier antagoniste compétitif du GABA fut découvert : la bicuculline (Curtis et al. 1970, 1971). Peu de temps après, plusieurs travaux ont démontré l'existence de « médiateurs » (récepteurs) GABAergiques insensibles à la bicuculline (figure III.8) (Biscoe et al. 1972; Godfraind et al. 1970; Johnston et al. 1972; Straughan et al. 1971).



Roberts et Frankel, 1950

Figure III.8. Insensibilité du GABA à la Bicuculline

À gauche, la molécule du GABA découverte dans le cerveau par Robert et Frankel en 1950 ; à droite la structure chimique de la bicuculline antagoniste du GABA inactive sur les récepteurs GABA_B.

Au début des années soixante (1962), les laboratoires de Ciba-Geigy ont produit le baclofène racémique sous le nom de « Liorésal ». Un agoniste spécifique à un récepteur GABA atypique, puisqu'il est insensible à la bicuculline. La différenciation de ces récepteurs, appelés plus tard, GABA_B et les récepteurs classiques (GABA_A) a été effectuée la première fois par Bowery et Hill en 1981. Ils ont défini le récepteur GABA_B comme étant un récepteur du GABA insensible à la bicuculline (antagoniste du GABA_A) et pour lesquels le R-(-)-baclofène (4-amino-3-(4-chlorophenyl)-GABA) est un agoniste spécifique et le 2-hydroxy-saclofène est un antagoniste spécifique (figure III.9). Les R-GABA_B ont été classés, par les mêmes auteurs, parmi la classe C des RCPG (Bowery et al. 1981).

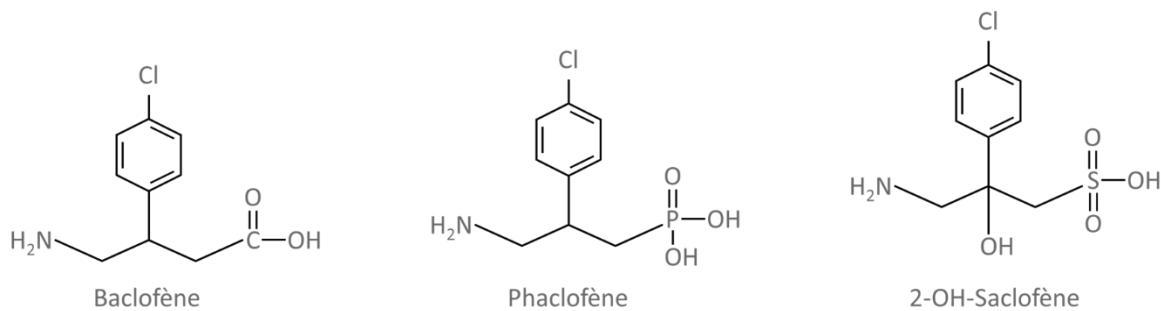
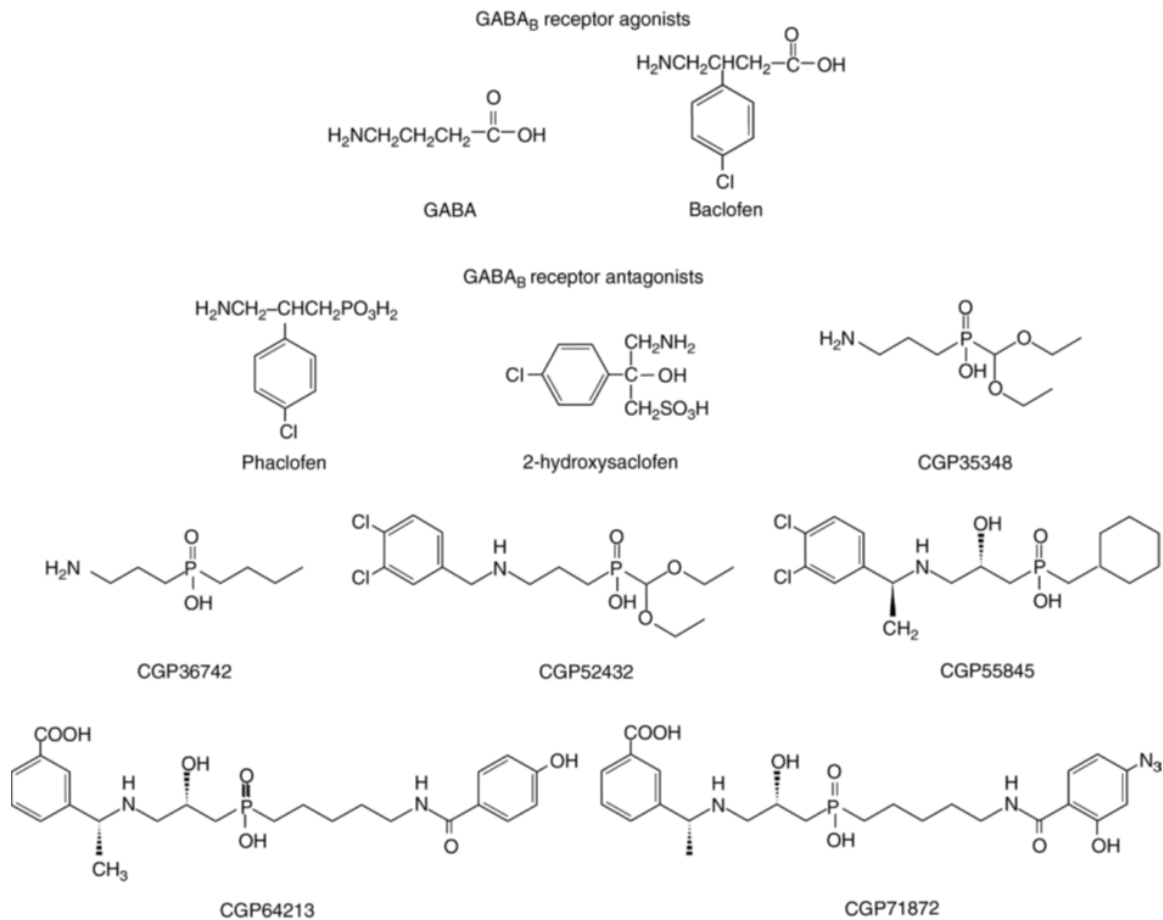


Figure III.9. L'agoniste spécifique aux RCPG GABA_B ; le baclofène et ses antagonistes (phaclofène et Saclofène)

Aujourd'hui, le RCPG GABA_B est réputé être impliqué dans plusieurs désordres psychiatriques ce qui fait de lui la cible de plusieurs médicaments. Vu leur importance, les récepteurs GABA_B ont été les sujets de plusieurs études afin de mieux comprendre leur structure, leur pharmacologie et leurs fonctions physiologiques (Pinard et al. 2010).

2. Introduction à la pharmacologie du récepteur GABA_B

Le baclofène active les récepteurs GABA_B de manière stéréospécifique, l'isomère (-) étant environ 100 fois plus puissant que l'isomère (+). En revanche, les récepteurs GABA_B ne sont pas sensibles aux agonistes classiques du récepteur GABA_A, tels que le muscimol et l'isoguvacine, ni aux modulateurs des récepteurs GABA_A, comme les benzodiazépines, les barbituriques ou encore les neurostéroïdes (Colombo 2016).



Mott et Lewis, 1994

Figure III.10. Structures de certains agonistes et antagonistes du récepteur GABA_B

La découverte d'antagonistes sélectifs du récepteur GABA_B présentant une affinité accrue pour les récepteurs et un profil pharmacocinétique amélioré a été un élément important pour établir la signification et la structure des récepteurs GABA_B (Bettler et al. 2004). Les premiers antagonistes des récepteurs GABA_B, le phaclofène et le 2-hydroxysaclofène, ont constitué une avancée majeure dans l'étude des récepteurs GABA_B, même s'ils possédaient des puissances relativement faibles. Par la suite, Froestl et ses collaborateurs (Froestl et al. 1995b) ont présenté le CGP35348, le premier antagoniste des récepteurs GABA_B capable de traverser la barrière hémato-encéphalique ; rapidement suivi par le CGP36742, le premier antagoniste du récepteur GABA_B actif par voie orale. Bien que ces composés aient présenté une puissance plutôt faible, Froestl et ses collaborateurs (Froestl et al. 1995b) ont constaté que la substitution d'un fragment dichlorobenzène à ces molécules antagonistes augmentait leurs affinités d'un facteur d'environ

10 000. Cette découverte a abouti à la production d'une multitude de composés, tels que CGP52432, CGP55845, CGP64213 et CGP71872 (figure III.10), qui avaient des affinités dans la gamme nanomolaire et même subnanomolaire. Cette série de composés a finalement conduit au développement de l'antagoniste de haute affinité radio-iodé [¹²⁵I]-CGP64213, utilisé pour cloner la sous-unité GABA_{B1}. Dans notre étude nous avons choisi d'utiliser l'antagoniste CGP54626A qui a une affinité de l'ordre du nanomolaire (4 nM) pour le récepteur GABA-B.

3. Agonistes des récepteurs GABA_B

Le baclofène, Ba-34647, a été synthétisé en septembre 1962 par Heinrich Keberle, à Bâle, en Suisse, sur la base de l'idée d'augmenter la lipophilie du GABA (Cates 1985) afin de faciliter son passage à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE) (Keberle, Faigle et Wilhelm, 1968). La lipophilie du baclofène avec un logD de - 0,96 (Leisen et al. 2003) reste insuffisante pour amener le composé dans le cerveau par diffusion passive. Cependant, le baclofène est transporté dans le cerveau par interaction avec le transporteur des grands acides aminés neutres (Audus and Borchart 1986; van Bree et al. 1988, 1991). Inversement, la distribution du baclofène dans le liquide interstitiel du cerveau est due à sa diffusion à travers la BHE régulée par un transporteur d'anions organiques (Deguchi et al. 1995).

Le baclofène possède deux énantiomères : le (*R*)-(-)-baclofène (CGP11973A) (figure III.10) et le (*S*)-(+)-baclofène (CGP11974A). Le racémique et le (*R*)-(-)-baclofène ont entraîné une diminution proportionnelle à la dose des réflexes : rotulien, fléchisseur, linguomandibulaire et H⁸ chez les chats (Olpe et al. 1978). Des études de liaison ont confirmé ces résultats : les valeurs de la concentration inhibitrice médiane (IC₅₀) du (*R*)-(-)-baclofène, du (*S*)-(+)-baclofène et du baclofène racémique pour inhiber la liaison du [³H]-baclofène aux récepteurs GABA_B du cervelet de chat sont 15 nM, 1,770 nM et 35 nM, respectivement (Froestl et al. 1995a). La structure cristalline du chlorhydrate de (*R*)-(-)-baclofène a été publiée par Chang et al. (Chang 1982).

⁸ Le réflexe H correspond au réflexe des muscles après une stimulation électrique des nerfs périphériques. Au niveau musculaire, deux ondes sont enregistrées: M puis H. L'onde H correspond à la mise en jeu du réflexe myotatique et implique les fibres sensorielles IA du fuseau neuromusculaire. L'examen de l'onde H permet d'explorer l'intégrité du réflexe myotatique ou réflexe à l'étirement.

1.1. Utilisation clinique du baclofène

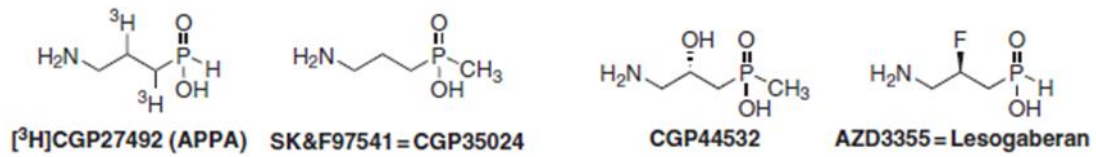


Figure III.11. Structures des agonistes des récepteurs GABA_B

Le baclofène exerce des effets cliniques bénéfiques dans de nombreuses indications, à savoir :

- En tant que myorelaxant dans la spasticité chez les patients atteints d'hémiplégie et de tétraplégie (Brogden et al. 1974), y compris la spasticité dans la sclérose en plaques (O'Brien et al. 1996), associée à la démence à corps de Lewy (DCL) (Moutoussis & Orrell 1996) et à la paralysie cérébrale chez l'enfant (Buonaguro et al. 2005; Scheinberg 2006) et les adultes (Krach 2009).
- L'administration de baclofène directement dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) via une mini-pompe implantée, c'est-à-dire un baclofène intrathécal, a constitué une avancée majeure des spasticités sévères, chroniques et diffuses d'origine médullaire. Penn et ses collègues ont obtenu des améliorations spectaculaires chez des patients, dont certains étaient alités depuis 19 ans, et qui ont retrouvé leur capacité à marcher (Kroin 1992; Penn and Kroin 1987). De nombreux neurologues éminents ont immédiatement adopté cette nouvelle méthode de traitement (Becker et al. 1997; Rawlins 1998).
- Un effet secondaire positif du traitement par le baclofène est l'amélioration marquée du fonctionnement de la vessie chez les patients présentant des lésions de la moelle épinière (Rapidi et al. 2007). Le baclofène a significativement réduit l'immunoréactivité de type peptidique liée au gène de la calcitonine (CGRP-LI) dans la vessie de cobaye (Santicioli 1991).
- Le baclofène est également un médicament efficace dans plusieurs manifestations de la douleur, comme la névralgie du trijumeau. Selon Fromm et al., le baclofène seul ou en association avec la carbamazépine ou la phénytoïne (anticonvulsants) permet de soulager considérablement la douleur (Baker et al. 1985). Fait intéressant, Fromm a observé que

le (*R*)-(-)-baclofène était 5 fois plus puissant que le baclofène racémique (Fromm and Terrence 1987; Terrence et al. 1983). Cela peut être mis en lien avec les articles de Sawynok et Dickson (Sawynok and Dickson 1984, 1985) montrant que le (*S*)-(+)-baclofène peut agir comme antagoniste des récepteurs au baclofène. Cette question n'a jamais été résolue.

- Le baclofène était efficace dans le traitement des céphalées en grappe⁹ (Hering-Hanit and Gadoth 2000, 2001) et dans la prévention de la migraine (Hering-Hanit 1999). Un article révèle la redondance génétique¹⁰ des récepteurs GABA_B dans les nocicepteurs périphériques *in vivo*, ce qui a conduit à la conclusion que les récepteurs GABA_B du système nerveux périphérique jouent un rôle moins important que ceux du SNC dans la régulation de la douleur (Gangadharan et al. 2009). En général, on pense que le baclofène exerce les propriétés analgésiques en réduisant la libération de L-glutamate, de la substance P et la CGRP (*calcitonin gene related peptide*) des terminaisons afférentes primaires (Enna and McCarson 2006).
- Le baclofène est efficace pour réduire le manque d'alcool. Des essais cliniques approfondis semblent prometteurs, même chez les patients souffrant de delirium tremens (Addolorato et al. 2009; Flannery et al. 2004; Leggio 2009). De nombreuses études précliniques sur des animaux de laboratoire ont précédé les essais cliniques (Maccioni et al. 2008; Federici et al. 2009; Colombo 2016).
- Le baclofène réduit efficacement le besoin de cocaïne. Les études cliniques ont débuté en 1998 (Haney et al. 2006). D'autres études ont été prévues pour évaluer le potentiel du baclofène en tant qu'agent de prévention des rechutes (Kahn et al., 2009) (Rotheram-Fuller et al. 2007).
- Les résultats du premier essai clinique sur le baclofène pour réduire le besoin de nicotine ont été publiés en 2009 (Franklin et al. 2009). Ils démontrent une réduction du nombre de cigarettes fumées par jour et une diminution significative du besoin de fumer. Le mécanisme d'action peut être dû à une réduction de la libération de dopamine par le baclofène (Amantea and Bowery 2004).

⁹ Les céphalées en grappe sont des maux de têtes extrêmement douloureux. Elles sont rares et se caractérisent par des douleurs qui débutent au niveau de la tempe et de l'œil et ne touchent donc qu'une partie de la face et du crâne. Ces céphalées se manifestent souvent à la même heure du jour ou de la nuit. En général, les crises surviennent en «grappes» qui durent plusieurs jours, voire plusieurs semaines, avant de disparaître souvent pendant plusieurs mois.

¹⁰ Une redondance génétique est une expression de plusieurs gènes codant pour la même protéine. Cette redondance nous informe sur l'importance de la protéine exprimée.

- Un essai clinique a montré des résultats prometteurs selon lesquels le baclofène pourrait être un nouvel agent thérapeutique contre le syndrome de sevrage des opiacés (Akhondzadeh et al. 2000). Des informations précliniques sont disponibles pour l'atténuation des signes de sevrage de la morphine (Bartoletti et al. 2007; Heinrichs et al. 2010) et pour la prévention du comportement de recherche d'héroïne (Xi and Stein 1999). Les symptômes du sevrage des benzodiazépines peuvent également être améliorés par le baclofène (File et al. 1991).
- La thérapie au baclofène pour le trouble de stress post-traumatique (TSPT) chronique a été efficace dans le traitement à la fois des symptômes du TSPT et de la dépression et de l'anxiété associés (Drake et al. 2003). Le nombre d'attaques de panique a été significativement réduit par le traitement au baclofène (Breslow et al. 1989).
- Les récepteurs GABA_B périphériques sont impliqués dans l'action du baclofène sur le reflux gastro-œsophagien. Les résultats précliniques chez le chien (Lehmann 2008, 2009) et le furet (Blackshaw et al. 1999) ont ouvert la voie aux premiers essais cliniques (van Herwaarden et al. 2002; Koek et al. 2003). Actuellement, les scientifiques d'Astra Zeneca évaluent le nouvel agoniste des récepteurs GABA_B, le AZD3355 (figure III.11).
- Le baclofène a été utilisé pour le traitement du hoquet chronique. Dans 37 cas de hoquet chronique (durée moyenne de 4,6 ans), le baclofène a entraîné une résolution complète à long terme dans 18 cas et une diminution considérable dans 10 autres cas (Guelaud et al. 1995; Turkyilmaz and Eroglu 2008; Twycross 2003).
- Le baclofène a été utilisé pour le traitement de la toux (Dicpinigaitis et al. 2000).
- Les premières études précliniques indiquent que le baclofène peut inhiber les crises audiotogènes dans un modèle murin du syndrome de l'X fragile (Pacey et al. 2009) (Pacey et al., 2009).

Ces diverses applications du baclofène, reflètent son implication et par défaut l'implication de son récepteur GABA_B dans la régulation de plusieurs activités neuronales dans le SNC.

1.2. Agonistes partiels du récepteur GABA_B

En plus du baclofène et de ses dérivés, le Phenibut (β -phényl acide gamma-aminobutyrique), la gabapentine et les acides g-aminopropyl-phosphiniques, il existe des agonistes partiels du récepteur GABA_B.

- *CGP47656*

Il y a une transition rapide des acides g-aminopropyl-méthyl-phosphiniques (CGP35024 ou SF&F97541) (figure III.12) agissant comme agoniste du récepteur GABA_B à l'homologue acide g-aminopropyl-éthyl-phosphinique (CGP36216) agissant comme un antagoniste des récepteurs GABA_B (Froestl et al. 1995a, 1995b; Ong et al. 2001). Le composé ayant un substituant de taille entre un groupe méthyle et un groupe éthyle, c'est-à-dire le dérivé difluorométhyle CGP47656 ayant une grande affinité pour les récepteurs GABA_B, est un agoniste partiel des récepteurs GABA_B (IC₅₀ = 89 nM ; inhibition de la liaison de [³H] CGP27492 aux récepteurs GABA_B du cortex de rat).

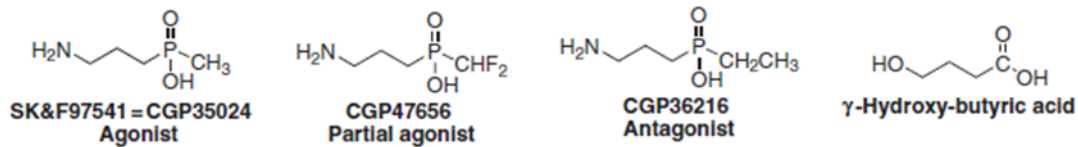


Figure III.12. Structures de deux agonistes partiels du récepteur GABA_B

- *γ-Hydroxy-Butyric Acid*

L'acide γ-hydroxy-butyrique (GHB) (figure III.12) est un métabolite mineur du GABA synthétisé par la transaminase GABA et la sémialdéhyde réductase succinique. Le GHB est également un médicament homologué (Xyrem) pour le traitement de la somnolence diurne excessive et de la cataplexie chez les patients atteints de narcolepsie (Bernasconi et al. 1999). Plus récemment, le GHB est devenu tristement célèbre en tant que « drogue du viol », induisant une euphorie, des hallucinations, une sédation et une relaxation (Wong et al. 2004). Plusieurs études ont conclu que le GHB agit comme un agoniste partiel du récepteur GABA_B ($K_i = 79-126 \mu\text{M}$) (Mathivet et al. 1997).

Des expériences sur des souris déficientes en récepteurs GABA_{B1} ont clairement montré que de nombreux effets *in vivo* du GHB étaient perdus, tels que l'hypolocomotion, l'hypothermie et l'inhibition de la libération dopaminergique striatale (Kaupmann et al., 2003), suggérant que la majorité des actions exogènes du GHB sont médiées par les récepteurs GABA_B (Crunelli et al. 2006). Cependant, les cerveaux des souris déficientes en récepteurs GABA_{B1} présentent toujours une liaison au GHB démontrant l'existence d'autres sites de liaison au GHB à haute affinité. Des

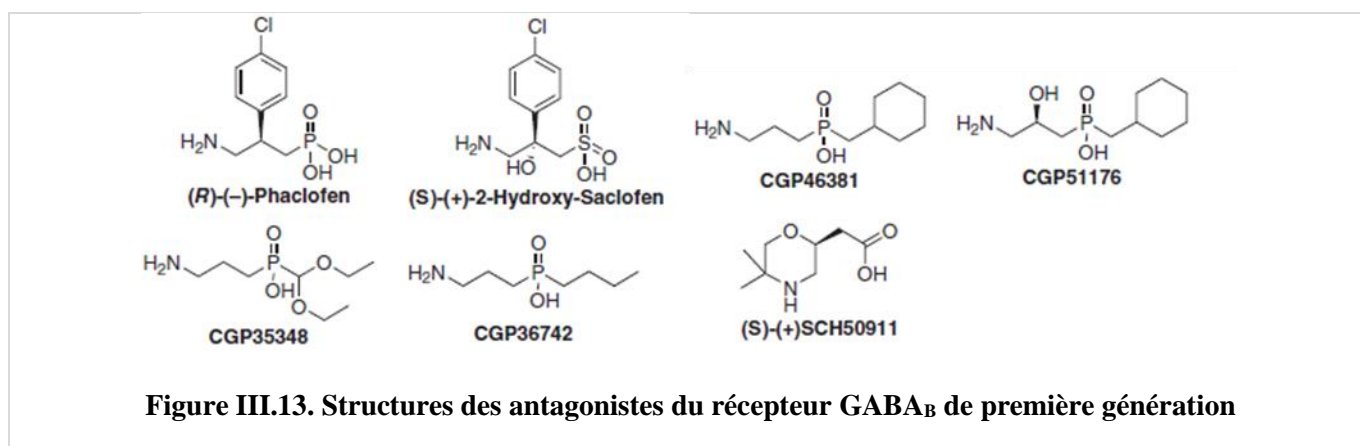
ligands sélectifs à haute affinité du GHB avec K_i jusqu'à 22 nM ont été rapportés par Wellendorph et Høg (Høg et al. 2008; Wellendorph et al. 2005). Fait intéressant, le diclofénac, un anti-inflammatoire largement utilisé, se lie aux récepteurs du GHB dans le cerveau du rat (Wellendorph et al. 2009). Cependant, l'article d'Andriamampandry (Andriamampandry et al. 2007) sur le clonage du récepteur humain présumé du GHB a été rejeté par de nombreux experts en biologie moléculaire.

4. Antagonistes des récepteurs GABA_B

1.3. Antagonistes des récepteurs GABA_B de première génération

Dans une classification simple, on peut définir les antagonistes des récepteurs GABA_B de première génération en tant que composés présentant des valeurs CI_{50} supérieures à 1 μ M.

En mars 1987, des premiers résultats ont été publiés sur les effets du phaclofène (figure III.13), un antagoniste des récepteurs GABA_B (IC_{50} = 130 μ M) (Kerr 1987). Le phaclofène a bloqué le potentiel postsynaptique inhibiteur (PPSI) lent induit par le baclofène, révélant un rôle physiologique important pour les récepteurs GABA_B (Nicoll 2004). L'énantiomère actif est le (R)-(-)-phaclofène (IC_{50} 76 μ M), tandis que le (S)-(+)-phaclofène présente une valeur CI_{50} > 1 mM (Frydenvang et al. 1994).



Le deuxième antagoniste du récepteur GABA_B, le 2-hydroxy-saclofène (IC_{50} = 11 μ M) (figure III.13), a été mis en évidence par Kerr et al. en 1988 (Kerr et al., 1988). L'énantiomère actif est le (S)-(+)-2-hydroxy-saclofène (Kerr et al., 1995).

Les premiers antagonistes du récepteur de GABA_B capables de pénétrer la BHE sont le CGP35348 (Olpe et al. 1990) (IC_{50} = 27 μ M, actif après administration intrapéritonéale

seulement), le CGP36742, le CGP46381, le CGP51176 ($IC_{50} = 38 \mu M$, $4 \mu M$ et $6 \mu M$, respectivement) (Froestl et al., 1995b), et le SCH50911, un pur (*S*)-(+)-énantiomère ($IC_{50} = 1,1 \mu M$) (figure III.13) (Bolser et al. 1995; Frydenvang et al. 1997). Les quatre derniers antagonistes du récepteur $GABA_B$ sont tous actifs après administration orale.

De nombreuses études précliniques ont été réalisées avec le CGP36742 (SGS742) (Helm et al. 2005) et ont montré que le SGS742 améliore la mémoire spatiale et réduit la liaison des protéines à l'élément de réponse à l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) dans l'hippocampe des rats. Le SGS742 peut agir en supprimant le CREB2 des voies de transcription pour le stockage de la mémoire à long terme. Il est possible que, par suppression de CREB2, l'équilibre entre le CREB1 et le CREB2 soit rétabli. Gallagher et ses collègues ont montré que, chez les rats souffrant de troubles de la mémoire, le CREB1 est significativement réduit, alors que le CREB2 ne l'est pas (Brightwell et al. 2004).

La pénétration du CGP36742 dans la BHE dans le cerveau de rat pourrait être mesurée avec un dosage de haute précision en microscopie / spectrométrie de masse (Andrén et al. 1998).

Le CGP46381 s'est avéré supérieur au CGP35348 pour supprimer les crises d'absence généralisées chez les souris modèles léthargiques, dépendante de GHB (Aizawa et al. 1997).

Le SCH50911 (figure III.13) a montré des effets anti-absence prononcés dans le modèle léthargique chez la souris (Hosford et al., 1995). Il a produit une protection marquée contre la mortalité par acide γ -hydroxybutyrique chez la souris (Carai et al. 2002, 2005). L'administration chronique de SCH50911 a conduit à une régulation positive des récepteurs $GABA_B$ (Pibiri et al. 2005). 30 mg / kg en intrapéritonéale soit de SCH50911, de CGP46381 (figure III.14) ou de CGP52432 (figure III.14) ont entraîné une stimulation significative de l'activité locomotrice chez le rat, qui pourrait être bloquée par l'halopéridol (une butyrophénone avec des propriétés antidopaminergiques), suggérant une libération accrue de dopamine par les antagonistes des récepteurs $GABA_B$. Ces résultats corroborent des études électrophysiologiques antérieures (Erhardt et al. 1999).

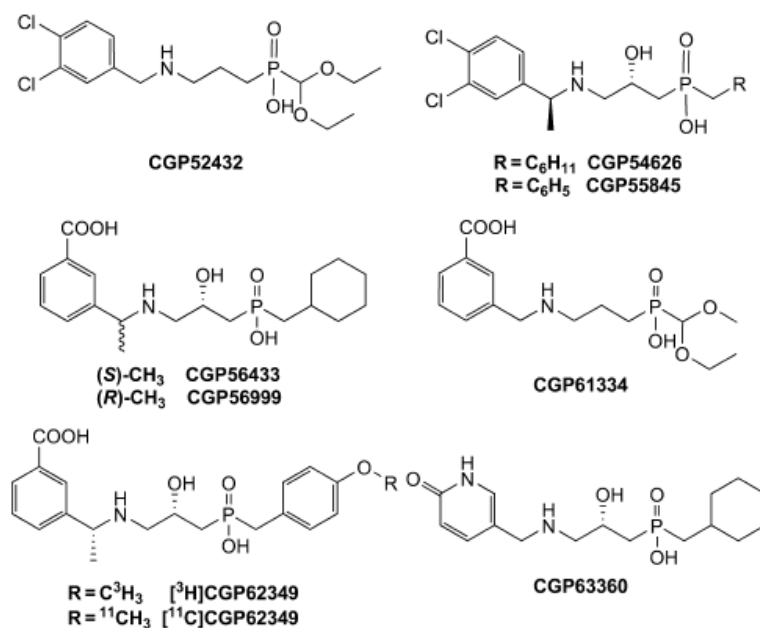
1.4. Antagonistes des récepteurs GABA_B de deuxième génération

Figure III.14. Structures d'antagonistes du récepteur GABA_B de deuxième génération

Dans une classification simple, nous définissons les antagonistes des récepteurs GABA_B de deuxième génération en tant que composés présentant des valeurs CI₅₀ de l'ordre du nanomolaire.

La grande avancée dans le domaine des antagonistes du récepteur GABA_B à affinité nanomolaire a été réalisée par Stuart J. Mickel en novembre 1990. Ce dernier a remplacé le groupe amine des acides γ-aminopropylphosphiniques par des substituants benzyle sélectionnés. Le CGP52432 affiche une CI₅₀ de 55 nM, le **CGP54626A de 4 nM** (l'antagoniste que nous avons utilisé lors de la présente étude), le CGP55845A de 6 nM, le CGP56433A de 80 nM, le CGP56999A de 2 nM, le CGP61334 de 36 nM, le CGP62349 de 2 nM et le CGP63360A de 39 nM (Froestl et al., 1996) (figure III.14).

En particulier, le CGP55845A et le CGP56433A ont été largement testés dans divers modèles *in vivo*. Il est intéressant de noter que les deux molécules présentent des puissances égales sur les synapses inhibitrices dans la région CA1 de l'hippocampe du rat (Pozza et al. 1999).

Le CGP56999A est probablement l'antagoniste du récepteur GABA_B le plus puissant qui soit synthétisé à ce jour ($K_i = 0,25$ nM) (Urwyler et al. 2005). Un traitement quotidien avec 1

mg/kg en mode intrapéritonéal a significativement atténué la diminution de la dopamine nigrostriatale induite par la 6-hydroxydopamine et augmente l'expression du BDNF dans le striatum ipsilatéral, indiquant une application pour le traitement de la maladie de Parkinson (Enna et al. 2006). L'administration intrapéritonéale du CGP56999A à 3–6 mg/kg a provoqué des convulsions cloniques retardées (Vergnes et al. 1997). Le mécanisme de l'effet proconvulsif a été étudié par Qu et al. (Qu et al. 2010). Les crises précoces entraînent une réduction durable de la transmission médiée par le récepteur GABA_B dans le gyrus denté.

Le CGP63360A (IC₅₀ = 39 nM de déplacement de liaison de l'agoniste du récepteur GABA_B [³H] CGP27492 et IC₅₀ = 9 nM de déplacement de liaison de l'antagoniste du récepteur GABA_B [¹²⁵I] CGP64213, (tous deux provenant de membranes du cortex de rat) a exposé des effets marquants sur l'apprentissage et l'amélioration de la mémoire durant des tests d'évitement actif et passif chez le rat et la souris à des doses faibles (0,1 mg / kg par voie orale). Il a augmenté le nombre d'évitements aux troisième, quatrième et cinquième jours des séances d'apprentissage, et a amélioré les résultats des test de rétention de la mémoire, au douzième jour (Getova and Dimitrova 2007). Finalement, il a supprimé également, les crises d'absence dans un modèle génétique d'épilepsie avec une dose efficace médiane (DE50) de 2 mg / kg en intrapéritonéal et 40 mg / kg par voie orale, et sans causer d'effets proconvulsifs jusqu'à 300 mg / kg par voie orale.

1.5. Antagonistes des récepteurs GABA_B de troisième génération

Les antagonistes du récepteur GABA_B de troisième génération présentent des valeurs IC₅₀ de l'ordre du nanomolaire et sont substitués par des radio-isotopes de radioactivité spécifique¹¹ très élevée dépassant 2 000 Ci / mmol, tels que ¹²⁵I.

[¹²⁵I] CGP64213 (IC₅₀ = 1,2 nM) a servi de moyen d'identification des clones d'isoformes du récepteur GABA_{B1a} et GABA_{B1b} après transfection dans des cellules COS¹² (Kaupmann et al., 1997). Le ligand de photo affinité [¹²⁵I] CGP71872 (IC₅₀ = 1 nM) a permis, pour la première fois, de déterminer les poids moléculaires élevés des récepteurs GABA_{B1a} et GABA_{B1b} de 130 et 100 kD. Ces deux bandes sont conservées dans les membranes cérébrales de l'homme, du rat, de la souris, du poulet, de la grenouille et du poisson-zèbre, mais ne sont pas retrouvées chez la drosophile et les nématodes (Bettler et al. 2004). Les synthèses des deux ligands sont décrites

¹¹Radioactivité spécifique est la quantité de radioactivité par unité de masse d'une molécule contenant le radio-isotope. Elle est normalement exprimée en mCi/mmol ou en \square Ci/ \square mol. Ci (le curie) est l'unité de mesure de la quantité de radioactivité. Elle représente le nombre de désintégrations/seconde dans un 1 g de radium.

¹²Les cellules COS, sont issues de culture cellulaire des cellules rénales de singes. Elles sont utilisées, en biologie moléculaire pour la transfection le clonage des protéines.

avec des détails expérimentaux complets dans un brevet (Kaupmann 1997). La synthèse de [¹²⁵I] CGP71872 a été décrite deux ans plus tard également par des chimistes de Merck¹³ (Belley et al. 1999).

Tableau III.2: Agonistes et antagonistes du récepteurs GABA_B

		Molécule	Concentration inhibitrice médiane (IC ₅₀)	Références
Agonistes		▪ (R)-(-)-baclofène (CGP11973A)	15 nM	Bolser et al, 1995
		▪ (S)-(+)-baclofène (CGP11974A).	1,770 nM	Froestl et al., 1995a, Froestl
		▪ baclofène racémique	35 nM	et al., 1995b
		▪ CGP47656	89 nM	Froestl et al., 1996
Antagonistes	Première génération	▪ Phaclofène	130 µM	Frydenvang et al., 1994
		▪ (R)-(-)-phaclofène	76 µM	
		▪ (S)-(+)-phaclofène	> 1 mM	Frydenvang et al., 1997
		▪ 2-hydroxy-saclofène	11 µM	
		▪ CGP35348	27 µM	Getova et al., 2007
		▪ CGP36742	38 µM	
		▪ CGP46381	4 µM	
	Deuxième génération	▪ CGP51176	6 µM	Kaupmann et al., 1997a ;
		▪ SCH50911	1,1 µM	
		▪ CGP52432	55 nM	Kaupmann et al., 1997b
▪ CGP54626A		4 nM		
▪ CGP55845A		6 nM	Kerr et al., 1995 ;	
▪ CGP56433A	80 nM			
Troisième génération	▪ CGP56999A	2 nM	Kerr et al., 1987	
	▪ CGP61334	36 nM		
	▪ CGP62349	2 nM	Lingenhoehl et al., 1999	
▪ CGP63360A	39 nM			
	▪ [³ H] CGP27492	9 nM	Olpe et al., 1990	
	▪ [¹²⁵ I] CGP64213	1,2 nM		
	▪ [¹²⁵ I] CGP71872	1 nM		

¹³ Grande Compagnie industrielle pharmaceutique allemande.

D. Les effecteurs

Les récepteurs GABA_B sont des récepteurs couplés aux protéines G, qui agissent sur un certain nombre d'effecteurs, y compris l'adénylyl cyclase, les canaux calciques potentiel-dépendants et les canaux potassiques à rectification entrante (KIR). Ces différents effecteurs permettent aux récepteurs GABA_B de produire non seulement une inhibition, mais aussi une diversité d'effets sur la fonction neuronale (figure III.15).

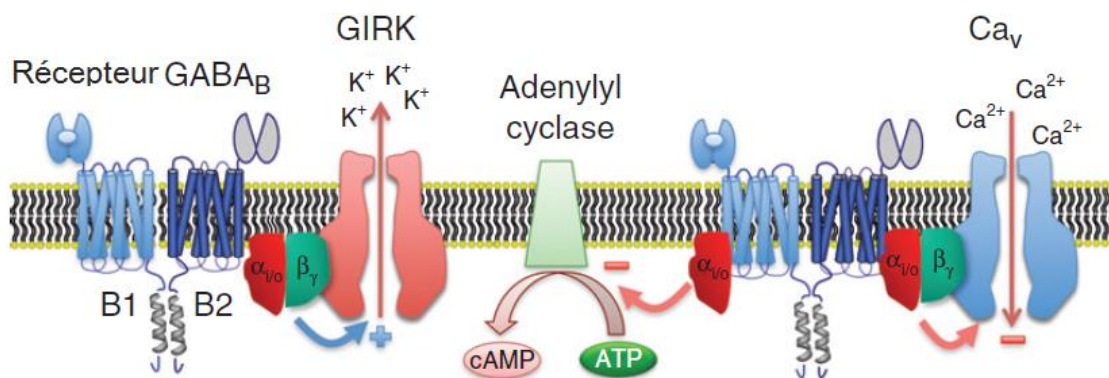


Figure III.15. Le récepteur GABA_B module plusieurs effecteurs

Le récepteur GABA_B recrute les sous-unités de la protéine G pour ses effecteurs. L'enzyme adénylyl cyclase est inhibée par la sous-unité $G\alpha$. Les canaux calciques sont inhibés par le complexe $G\beta\gamma$ ainsi que les canaux KIR qui sont activés par le même complexe.

1. Protéines G

Les effecteurs des récepteurs GABA_B sont nombreux et sont modulés par l'activation des deux sous-unités $G\alpha$ et $G\beta\gamma$ de la protéine G (figure III.15).

La fixation du ligand par le R-GABA_B induit une association du récepteur à la protéine hétérotrimérique G (composées des sous-unités α , β , et γ). En conséquence, la sous-unité $G\alpha$ effectue une substitution de la molécule GDP par la molécule GTP. Puis, le nouveau complexe $G\alpha$ -GTP se dissocie du dimère $G\beta\gamma$. Ces deux protéines sont capables de déclencher, chacun, une cascade de signalisation via l'activation des effecteurs, dont des canaux ioniques et enzymes. En fin de réaction, la sous-unité $G\alpha$ hydrolyse le GTP en GDP à l'aide d'une GTPase intrinsèque ce qui favorise une nouvelle réassociation de la G-protéine au RCPG (figure III.16).

Il existe deux catégories de protéines G, selon leur sensibilité à la toxine pertussis (*Pertussis toxin* (PTX)). Les protéines avec la sous-unité $G_{\alpha i}$, qui subissent une ADP-ribosylation par la PTX. L'échange du GDP en GTP est donc impossible, ce qui bloque la dissociation du hétérotrimère.

Les R-GABA_B, en particulier ceux qui sont sensibles au 2-hydroxy-saclofen, se couplent au deux systèmes (Sekiguchi et al. 1990). Le premier induit l'activation de l'AC via l'intermédiaire des protéines G sensibles à la PTX. Le deuxième conduit à une fermeture des canaux Ca²⁺ voltage-dépendants et/ou une ouverture des canaux potassium via des protéines G insensibles à la PTX.

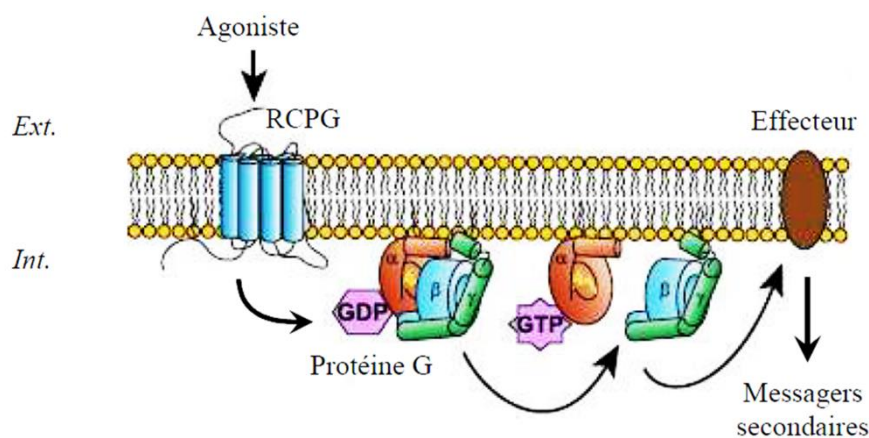


Figure III.16. Vue schématique des étapes membranaires de transduction du signal par les RCPG après activation par un ligand agoniste.

2. Adénylyl cyclase

Le premier effecteur qui a été caractérisé pour les R-GABA_B, était l'enzyme adénylyl cyclase (AC). L'AC catalyse la conversion de l'ATP en AMPc. Le R-GABA_B active la protéine $G_{\alpha i}$, celle-ci se lie à l'AC. Il en résulte l'inhibition de la formation du second messager l'AMPc. Pourtant, cette voie est moins détaillée dans la littérature (Holopainen et al. 1992) et les effets physiologiques de cette modulation restent inconnus.

3. Canaux calciques potentiel dépendants

Le couplage des récepteurs GABA_B aux canaux Ca²⁺ diminue la conductance de ceux-ci ; ce qui induit un dérèglement du système d'exocytose et une inhibition de la libération des neurotransmetteurs au niveau présynaptique.

Il existe six types de canaux calciques potentiel dépendants (Cav): L-, T-, N-, P-, Q-, et R. Les canaux Cav de type T- sont activés à des valeurs de potentiel assez basses (bas seuil) ; les autres types sont activés à des valeurs de potentiel plus élevées (haut seuil). Le récepteur GABA_B active les protéines G qui se lient spécifiquement aux canaux Cav à haut seuil P-, Q-, et N- (Mintz & Bean, 1993; Guyon & Leresche, 1995; Huston et al., 1995; Harayama et al., 1998; Li & Stern, 2004; Vigot et al., 2006). L'activation du récepteur GABA_B stimule la protéine G (Dolphin et al., 1993; Obrietan & van den Pol, 1999) ce qui libère la protéine Gβγ et inhibe le canal Cav (Dolphin 2003). Présynaptiquement, l'inhibition du courant Cav via le récepteur GABA_B réduit la libération des neurotransmetteurs.

4. KIR3, canal potassique rectifiant entrant

Postsynaptiquement, le récepteur GABA_B active les canaux KIR3 à l'aide du dimère Gβγ. Ce qui augmente la perméabilité des canaux potassiques aux ions K⁺ en provoquant une inhibition lente et prolongée.

Les canaux KIR3 appartiennent à la famille des canaux potassiques rectifiant entrants « *Potassium (K⁺) inward rectifier*, en anglais, ou Kir). Ils sont appelés également « *G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channels* » (*GIRKs*).

Chez l'Homme, la famille des canaux Kir comporte 17 membres répartis dans sept sous-familles, de Kir1.1 à Kir7.1 (Reimann & Ashcroft, 1999). Les liens évolutifs entre ces diverses sous-familles sont illustrés par l'arbre phylogénétique présenté en figure III.17, ci-dessous.

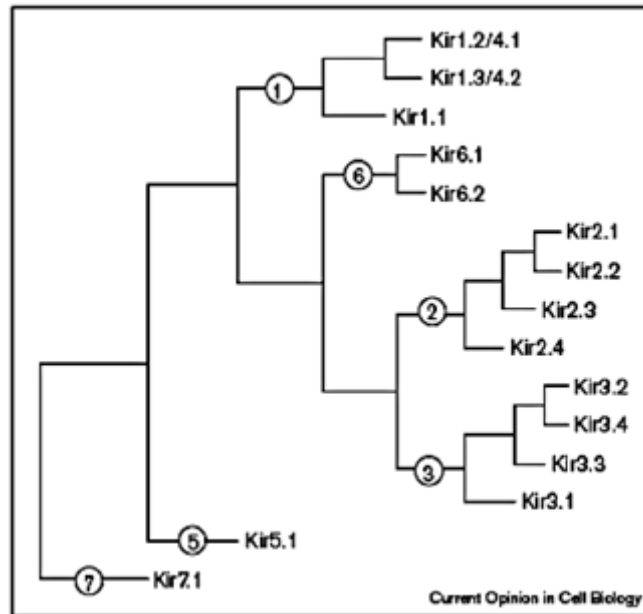


Figure III.17. Arbre phylogénétique représentant les sous-familles des canaux Kir

Chaque sous-famille est composée de membres partageant entre 50 et 60 % d'identité de séquence génétique, et les différentes sous-familles présentent entre 30 et 40 % d'identité entre elles (d'après Reimann et Ashcroft, 1999).

Les canaux Kir remplissent deux principaux rôles physiologiques : ils stabilisent le potentiel membranaire de repos proche du potentiel d'équilibre du potassium ($E_K = -90\text{mV}$) (Doupnik et al., 1995; Nichols & Lopatin, 1997). Les différents membres de cette famille de canaux sont caractérisés par des localisations tissulaires et des tâches différentes.

Les canaux Kir3.x forme une famille de canaux activés par des protéines G et contrôle les effets des récepteurs couplés aux protéines G sur l'activité du cœur, des nerfs et des cellules neurosécrétrices (Yamada et al. 1998).

1.1. Rectification

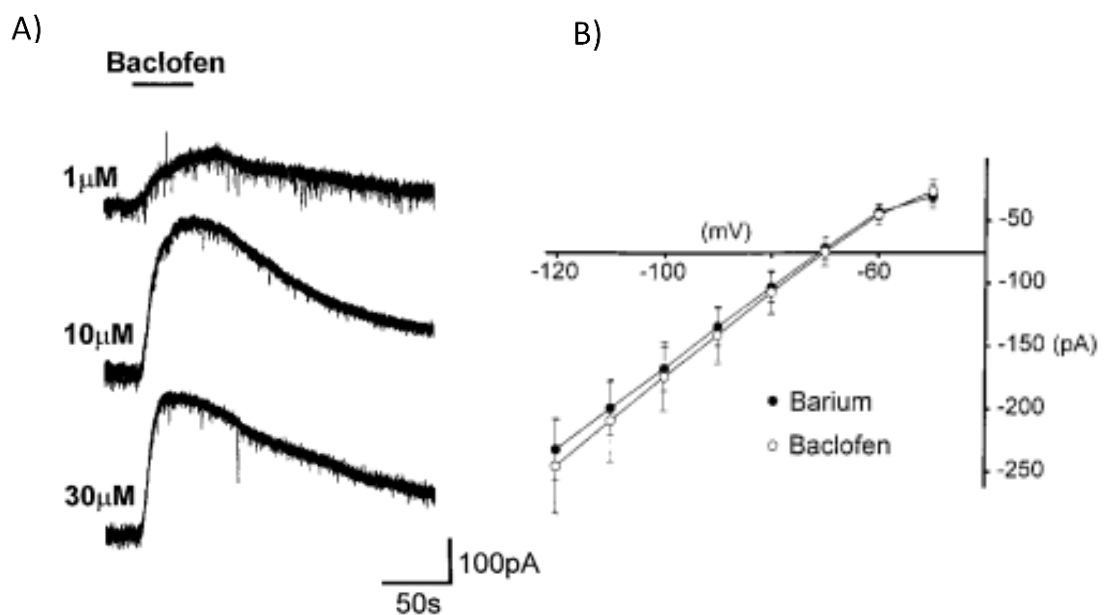
Les canaux Kir sont dits à rectification entrante, c'est-à-dire qu'ils favorisent l'entrée d'ions par rapport à leur sortie. Autrement, ils conduisent plus le courant quand le potentiel de membrane est hyperpolarisé que quand il est dépolarisé (Doupnik et al., 1995; Nichols & Lopatin, 1997).

1.2. Modulation

Les cations non présents dans le liquide extracellulaire, comme le Ba^{2+} et Cs^+ , bloquent les canaux K^+ à rectification entrante en agissant sur face interne ou externe du canal et constituent donc des antagonistes compétitifs des Kir. Alors que les cations normalement présents dans le liquide extracellulaire, comme le Ca^{2+} et Mg^{2+} , bloquent les Kir en inactivant l'hyperpolarisation (Owen et al. 1999) (figure III.18).

Le blocage des Kir peut être réalisé également par l'application du TEA au milieu extra ou intracellulaire. A noter que le TEA est un bloquant non spécifique qui bloque plusieurs potassiques.

Alors que l'activation de ces canaux dépend du couplage aux sous-unités de la protéine G. Il s'est avéré aussi que des alcools comme l'éthanol et le propanol-1 favorisent l'ouverture des canaux Kir.



Browning et al., 2001 (modifiée)

Figure III.18. Les KIR3 sont activés par le baclofène et bloqués par le barium

A; En potentiel imposé $-50mV$, l'activation des canaux KIR3 avec le baclofène à plusieurs concentrations, induit des courants sortant dans les neurones DMNX. B; L'effet du baclofène est supprimé par le barium (2mM) qui bloque les KIR3.

E. Rôles physiologiques du GABA_B et ses implications cliniques

À l'heure actuelle, le seul agent thérapeutique actuellement utilisé, connu pour exercer ses effets via le récepteur GABA_B, est le baclofène. Ce composé est largement utilisé comme myorelaxant. Mais, il a été démontré cliniquement qu'il exerce des effets supplémentaires, y compris l'analgésie, la suppression de la toxicomanie et l'arrêt de la toux chronique. Les recherches menées indiquent également qu'il peut exister de nombreuses autres applications, non seulement pour les agonistes, mais également pour les antagonistes du récepteur GABA_B.

Les récepteurs GABA_B ont été impliqués dans le traitement neuronal dans de nombreuses régions du cerveau et leur implication pathologique dans diverses maladies du système nerveux central, telles que l'épilepsie, la dépression et l'étiologie de la dépendance à la nicotine chez l'homme. De nouvelles entités chimiques seront sûrement la clé pour exploiter ce récepteur. À l'heure actuelle, le baclofène produit fréquemment des effets secondaires indésirables, ce qui limite clairement son utilisation.

Lorsque l'activation du récepteur se produit, il n'est pas surprenant qu'une variété d'effets puisse survenir en raison de l'inhibition de la libération du neurotransmetteur et/ou de l'hyperpolarisation neuronale postsynaptique. Avoir un agoniste sélectif du récepteur, ainsi que des informations provenant de souris « knock-out » présentant une hyperalgésie, des convulsions, une hyper locomotion, une altération de l'apprentissage, une perte de réponse au baclofène et un manque de sites de liaison GABA_B dans le cerveau (Thuault et al., 2004), fournit la base de beaucoup de spéculations sur les avantages thérapeutiques potentiels des agonistes et des antagonistes pour ce récepteur.

1. Importance thérapeutique potentielle des ligands des récepteurs GABA_B

Les propriétés myorelaxantes du baclofène à médiation centrale sont bien établies dans la pratique clinique depuis plus de 20 ans. En fait, c'est le médicament de choix dans la spasticité associée à la paralysie cérébrale, à la sclérose en plaques, au syndrome de l'homme raide et au tétanos (Becker et al. 2000, 1995; Ochs et al. 1999). Cependant, les effets secondaires de ce médicament, notamment les convulsions, la nausée, la somnolence, les vertiges, l'hypotension, la faiblesse musculaire, les hallucinations et la confusion mentale, sont souvent mal tolérés par les patients. Cela est dû en partie à la nécessité d'administrer des doses élevées en raison de la faible pénétration au niveau du cerveau.

Ce problème a été résolu avec succès par l'introduction de l'administration intrathécale. Il y a eu de nombreux rapports cliniques dans lesquels une application intrathécale à partir d'une pompe insérée dans l'abdomen s'est révélée efficace sur une longue période (des années) sans effets secondaires ou désensibilisation de la réponse à l'agoniste (Krach 2001; Ochs et al. 1999; Penn et al. 1989). Cette forme d'administration, directement sur le site d'action de la moelle épinière, ne nécessite probablement que des concentrations locales trop faibles pour apparaître dans la circulation systémique, évitant ainsi la production d'effets indésirables. De plus, le niveau extracellulaire réduit de l'agoniste diminue la possibilité de désensibilisation du récepteur. La réponse à l'administration systémique de baclofène est réduite après un traitement chronique, mais cela ne semble pas être le cas avec la perfusion intrathécale. La diminution a été attribuée à une désensibilisation du récepteur, mais le mécanisme exact sous-jacent à ce phénomène n'est pas clair. Mais, quelle qu'en soit la cause, cela pourrait expliquer pourquoi le baclofène n'a que des utilisations limitées, par exemple comme analgésique.

2. Nociception

L'action antinociceptive du baclofène administré par voie systémique a été décrite pour la première fois chez des animaux de laboratoire, et ce, il y a plus de trois décennies (Cutting et Jordan, 1975). Cela a ensuite été confirmé par différentes recherches. Le baclofène a une activité nociceptive dans les modèles de douleur aiguë, tels que les tests de « *flick tail* » et « *hot plate* » chez les rongeurs à des doses inférieures au seuil de relaxation musculaire (Przesmycki et al. 1998; Thomas et al. 1996). Ainsi, une altération de l'activité locomotrice peut être exclue comme raison confondante de l'effet. L'action antinociceptive du baclofène dans la douleur aiguë résulte en partie de la réduction de la libération d'émetteurs nociceptifs par les fibres afférentes primaires dans la corne dorsale de la moelle épinière (Ataka et al. 2000; Riley et al. 2001).

En outre, une contribution à une action dans les centres supérieurs, en particulier le thalamus, se produit également (Potes et al. 2006). L'activation des récepteurs GABA_B dans les tranches de la moelle épinière inhibe la libération de la substance P, du glutamate (Malcangio & Bowerly 1996). Chacune de ces substances a été associée à la transmission d'impulsions nociceptives dans la moelle épinière.

Malgré le grand nombre de données précliniques actuellement disponibles, l'utilisation du baclofène en tant qu'analgésique chez l'homme a été très limitée, probablement en raison, en partie, de la tolérance rapide et des effets indésirables consécutifs à l'administration systémique. La névralgie du trijumeau (Terrence et al. 1985; Fromm, 1992) est peut-être le seul type de

douleur pour lequel le baclofène a été utilisé systématiquement. Cependant, lorsqu'il est administré par voie intrathécale de la même manière que pour le traitement de la spasticité, le baclofène est capable de produire une analgésie centrale, telle que celle résultant d'un accident vasculaire cérébral (Loubser and Akman 1996; Taira et al. 1995). Dans ces conditions, la tolérance aux effets du baclofène n'a pas été rapportée.

Les récepteurs GABA_B de la moelle épinière ont également été impliqués dans l'action antinoceptive des agonistes muscariniques administrés par voie spinale (Chen and Pan 2004) et des agonistes des cannabinoïdes CB1 (Naderi et al. 2005).

Contrairement aux modèles de douleur inflammatoire, l'induction d'une douleur neuropathique chez les rongeurs ne provoque pas d'augmentation des taux de GABA dans la moelle épinière. Cependant, le baclofène produit un effet antinociceptif dans les modèles de neuropathie chronique (Franek et al. 2004; Smith et al. 1994). De plus, il a été rapporté que la gabapentine, un médicament fréquemment utilisé pour le traitement clinique de la douleur neuropathique, est réputée être un agoniste des récepteurs GABA_B (Ng et al. 2001). Cependant, cette action agoniste de la gabapentine n'a pas été confirmée par d'autres recherches, ce qui rend le lien potentiel entre l'activation des récepteurs GABA_B et la thérapie neuropathique plutôt ténu.

L'appui à un rôle pour les récepteurs GABA_B dans les mécanismes de la douleur provient également d'une série d'études « knock-out » développementales réalisées chez la souris (Gassmann et al. 2004; Prosser et al. 2001; Schuler et al. 2001). Chez ces souris, des R-GABA_B fonctionnels ne sont pas formés, car les souris sont déficientes dans l'une ou l'autre des sous-unités GABA_{B1} ou GABA_{B2} individuelles. Dans les deux formes de souris, l'hyperalgésie a été mise en évidence dans les tests nociceptifs aigus. Ce qui suggère que les récepteurs GABA_B hétéromères fonctionnels sont nécessaires pour maintenir les seuils de douleur.

3. Cognition

Le baclofène supprime le comportement cognitif chez les animaux (Arolfo et al. 1998). En général, la suppression cognitive produite par le baclofène est similaire à celle produite par l'antagoniste muscarinique, la scopolamine, mais alors que les antagonistes de GABA_B inversent sélectivement le déficit cognitif induit par GABA_B, mais pas celui de la scopolamine. L'effet du baclofène a bien sûr peu d'incidence sur la médecine clinique, mais il est possible que les antagonistes de GABA_B offrent une nouvelle possibilité de traiter les troubles cognitifs chez l'homme. Une amélioration de l'apprentissage et de la rétention de la mémoire dans divers modèles animaux a été établie (Helm et al. 2005). Ce qui a conduit au premier essai clinique d'un

antagoniste de GABA_B, SGS742, pour une déficience cognitive légère (Froestl et al. 2004). En comparaison avec un groupe traité par placebo, des améliorations significatives de tous ces paramètres ont été observées, sans effets indésirables graves.

Les chercheurs suggèrent que le site d'action des antagonistes de GABA_B en relation avec la cognition pourrait être l'hippocampe où une augmentation de la potentialisation à long terme a été impliquée (Olpe et al. 1990; Mott & Lewis 1991), mais la nature de cette modification semble dépendre de la fréquence de stimulation.

4. Toxicomanie

La toxicomanie est un problème mondial sans cesse croissant, de sorte que le traitement thérapeutique adéquat de la dépendance aux drogues constitue toujours une cible clinique majeure. Même le traitement de la dépendance aux produits liés au tabac nécessite une attention. Un certain nombre de sites ont été suggérés, y compris les récepteurs de la dopamine et du glutamate, comme cibles thérapeutiques potentielles pour supprimer le besoin et les rechutes.

L'activation du récepteur GABA_B peut fournir une approche appropriée. Il a été montré, pour la première fois en 1997 par Roberts et Andrews, que le baclofène peut réduire les effets renforçant de la cocaïne chez le rat à des doses qui n'affectent pas la locomotion (Roberts & Andrews 1997). Il est vite devenu évident que d'autres drogues, y compris la nicotine, les agents liés à la morphine et l'éthanol, étaient également sensibles aux agonistes du GABA_B (Corrigall et al. 2000). Aussi, le baclofène administré de manière centrale ou périphérique peut même augmenter l'apport alimentaire chez les rats non privés (Ebenezer and Patel 2004). Cependant, lorsque les rats ont accès à des aliments gras, le baclofène provoque des crises de boulimie. Dans ces conditions, le baclofène peut inhiber de manière significative la consommation d'aliments (Buda-Levin et al. 2005).

La conclusion selon laquelle le baclofène réduit le besoin de substances addictives non apparentées, notamment l'héroïne, l'alcool et la nicotine, suggère qu'il pourrait exister un mécanisme sous-jacent commun à l'agoniste GABA_B dans tous les cas. Le centre de récompense dans le système mésolimbique, probablement la zone tegmentale ventrale, serait le centre de cette action où le contrôle de la libération / action de la dopamine est impliqué. Le baclofène agit comme un mimétique du neurotransmetteur naturel GABA, de sorte que si le niveau de GABA endogène est élevé dans cette région du cerveau, il aurait le même effet (Ashby et al. 1999).

La modulation allostérique des récepteurs GABA_B a été décrite pour la première fois en 2001 par Urwyler et ses collaborateurs (Urwyler et al. 2001). Des études ultérieures ont ensuite montré que la localisation du site de modulation semble se situer dans le domaine heptahélique de la sous-unité GABA_{B2} (Binet et al. 2004). Bien que la sous-unité GABA_{B1} ait le domaine de liaison agoniste, elle n'a pas de site allostérique, alors que l'inverse semble être vrai pour GABA_{B2}. Deux composés ont été initialement rapportés par Urwyler et ses collègues en tant que modulateurs positifs, le CGP7930 et le GS39783 (Urwyler et al. 2001). Ces composés ont été examinés dans des modèles de dépendance chez le rat et les deux modulateurs ont réduit l'auto-administration de cocaïne et ont supprimé l'acquisition de comportements de consommation chez les rats sans alcool, sans avoir à administrer un agoniste des récepteurs à action directe. Ces données suggèrent que la modulation allostérique positive pourrait constituer un traitement efficace pour traiter la dépendance aux médicaments, tout en évitant les éventuels effets indésirables d'un agoniste, comme le baclofène.

5. Absences épileptiques

Les crises d'absence sont principalement associées aux juvéniles, mais elles disparaissent fréquemment à la fin de l'adolescence, bien qu'elles puissent être conservées dans les dernières années de vie. Les crises ne provoquent pas de comportement convulsif, mais présentent une forme d'électroencéphalogramme caractéristique d'un signal pointes-ondes¹⁴ d'une fréquence de 3 Hz, provenant de décharges dans les noyaux thalamiques. On pense depuis de nombreuses années que le thalamus est le site d'origine de ces décharges, bien qu'un réseau thalamocortical intact soit nécessaire pour générer des pics et des décharges en vagues. L'origine de ces décharges semble se situer à l'extérieur du thalamus. Les études ont montré dans un modèle génétique de rat ayant des absences épileptiques que le site d'origine est situé dans la région périorale du cortex somatosensoriel (Meeren et al. 2005). Puis, ces décharges se propagent rapidement à travers le cortex et initie une cascade corticothalamique. L'injection d'un agoniste de GABA_B dans le thalamus ventrobasal ou le noyau réticulaire d'un rat GAERS¹⁵, atténue la fréquence des crises d'absence (Marescaux et al. 1992). En revanche, l'injection d'un antagoniste GABA_B dans les mêmes régions supprime les décharges en vagues (Manning et al. 2003). Un résultat similaire est produit si l'antagoniste GABA_B est administré par voie systémique. Cela pourrait indiquer que l'interférence avec l'innervation GABAergique du noyau réticulaire perturbe le réseau

¹⁴Les pointes-ondes (*spike-and-wave* en anglais) est un motif d'oscillation de l'EEG qui apparaît en général pendant les crises d'épilepsie chez l'homme ou chez l'animal.

¹⁵GAERS (*Genetic Absence Epilepsy Rat from Strasbourg*) est une lignée de rats reconnue comme un modèle animal de l'absence épileptique.

thalamocortical. Cependant, la micro-injection des mêmes antagonistes sélectifs dans le cortex somatosensoriel peut également supprimer l'activité de crise indiquant l'implication des mécanismes GABAergiques à ce niveau également (Manning et al. 2003).

6. Prise alimentaire

Au niveau de l'hypothalamus et de ses noyaux qui constituent un centre de régulation de la majorité des comportements physiologiques dont la prise alimentaire, le système GABAergique central est connu pour posséder des inputs vers les noyaux paraventriculaires qui sont impliqués dans la régulation de la prise alimentaire (Mokhtarpouriani et al. 2016). Le GABA a un effet stimulateur de la prise alimentaire chez les oiseaux et les mammifères. Ainsi, le récepteur-canal du GABA, le GABA_A est connu pour augmenter la prise alimentaire chez le poussin (Jonaidi et al. 2012). De même, il a été montré que le GABA endogène agit également via les récepteurs métabotropes aussi, i.e. les R-GABA_B centraux pour réguler la prise alimentaire (Patel and Ebenezer 2004). Chez le poussin, le baclofène inhibe l'effet de la leptine dans les neurones du noyau arqué hypothalamique. Il est intéressant de noter dans ce sens que les récepteurs GABA_B semblent jouer un rôle important dans la modulation de l'effet de la leptine dans les neurones du noyau arqué (Bogatyrev et al. 2017).

Il a été démontré également que l'administration intrapéritonéale du baclofène augmente la prise alimentaire chez des rats à accès *ad libitum* à la nourriture, alors que celle de l'acide 3-aminopropylphosphinique (3-APA ; *3-aminopropylphosphinic acid*), un agoniste du R-GABA_B qui ne franchit pas la BHE, n'a aucun effet. Ceci indique que les R-GABA_B périphériques ne sont pas impliqués dans le phénomène hyperphagique induit par le baclofène (Ebenezer and Patel 2004).

L'ensemble de ces données mentionnées ci-dessus indiqueraient que le baclofène a un effet orexigène (Mokhtarpouriani et al. 2016) et que le récepteur GABA_B stimule la prise alimentaire.

7. Dépression et anxiété

Un lien possible entre les récepteurs GABA_B et la dépression fonctionnelle a été proposé il y a plus de 20 ans par Lloyd et collaborateurs (Pilc and Lloyd 1984). Ces auteurs ont démontré qu'une régulation à la hausse dans les sites de liaison GABA_B se produit dans le cortex frontal du rat après administration chronique de divers antidépresseurs et après un traitement par

électrochocs. Bien que ces résultats aient été contestés (Cross and Horton 1987), il semble désormais évident que les mécanismes liés au R-GABA_B peuvent être associés à la dépression. L'antagonisme des récepteurs GABA_B produit un renversement du comportement dépressif chez les modèles animaux (Cryan et Kaupmann 2005). Par exemple, après quatre semaines de traitement avec l'antagoniste de GABA_B, le CGP51176, un comportement clairement dépressif a été renversé (Bittiger et al. 1996). Des renversements similaires ont été observés dans le test de nage forcée chez les rongeurs et dans les modèles de dépression fondés sur l'impuissance. Il a été observé que les souris dépourvues de sous-unités des récepteurs GABA_{B1} ou GABA_{B2} présentent un comportement antidépresseur, mais elles semblent plus anxieuses. Il a été proposé que l'activation du récepteur GABA_B produise une activité anxiolytique, tandis qu'une perte ou un blocage de la fonction du récepteur GABA_B produit des effets de type antidépresseur (Mombereau et al. 2005).

8. Autres actions

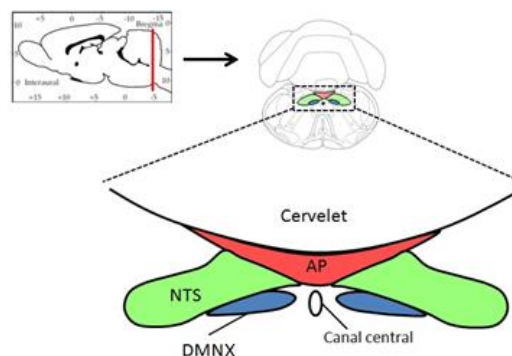
L'activation du récepteur GABA_B produit une variété d'effets qui ont ou peuvent avoir une signification clinique. Par exemple, le baclofène a des effets antitussifs qui découlent, en partie, d'une action dans le tronc cérébral contrôlant le réflexe de la toux (Dicpinigaitis et al. 2000). Le baclofène est également efficace dans le traitement du hoquet chronique (Krahn & Penner 1994; Marino 1998). Les agonistes des R-GABA_B exercent également une action antibronchioconstricteur (antiasthme) en activant les récepteurs présynaptiques sur les terminaisons nerveuses parasympathiques pour supprimer la libération d'acétylcholine (Chapman et al. 1993b, 1993a). De plus, une réduction de la bronchoconstriction non adrénergique non cholinergique se produit dans les poumons (Belvisi et al. 1989). Les agonistes de GABA_B inhibent également les relaxations transitoires du sphincter œsophagien inférieur chez le chien, qui présente une application clinique potentielle (Lehmann et al. 2005). Un effet intéressant de l'activation du récepteur GABA_B a récemment été signalé dans les neutrophiles, où il semble agir comme récepteur chimioattractant et jouer un rôle important dans la réponse inflammatoire (Rane et al. 2005).

IV. COMPLEXE VAGAL DORSAL

Mon étude a été conduite dans le complexe vagal dorsal (CVD) qui est présenté brièvement dans ce chapitre, et particulièrement au niveau du canal central.

Le CVD est situé dans la région dorsocaudale du tronc cérébral et comprend trois structures à savoir le noyau du tractus solitaire (NTS), le noyau dorsal moteur du nerf vague (DMNX) et l'area postrema (AP) (figure IV.1).

Le CVD est un centre intégrateur des signaux périphériques, relaie ces informations *via* les afférences vagales et projette vers l'hypothalamus ainsi que d'autres régions impliquées dans le contrôle central de l'homéostasie énergétique.



<https://www.researchgate.net/figure/Organisation-du-complexe-vagal-dorsal>

Figure IV.1: Organisation du complexe vagal dorsal

Représentation schématique d'une coupe coronale du complexe vagal dorsal, situé dans le tronc cérébral en continuité de la moelle épinière, et est composé de l'area postrema (AP ; rouge), du noyau du tractus solitaire (NTS ; vert) qui s'étend de chaque côté du canal central et du noyau dorsal moteur du nerf vague (DMNX ; bleu) qui est situé au niveau ventral du NTS.

Le noyau du tractus solitaire joue un rôle important dans la régulation de la prise alimentaire (PA). Il constitue en ce sens un centre intégrateur des signalisations d'origine vagale, qui transmettent des informations sur la distension gastrique, le contenu nutritionnel et la production des peptides gastro-intestinaux (Travagli et al. 2006). Le NTS reçoit également des signaux des projections descendantes des neurones anorexigènes à pro-opio-mélanocortine (POMC) du noyau arqué de l'hypothalamus qui sont des noyaux importants dans la régulation du PA. Le NTS traite ces informations grâce aux récepteurs MC4R, de l'hormone alpha stimulant les mélanocytes (α -MSH ; α -Melanocyte-stimulating hormone), qui sont exprimés en densité élevée dans le NTS ; l'activation de ces récepteurs induit un effet anorexigène. (Kishi et al. 2003).

De plus l'activité des neurones NTS peut être modulée par la leptine et le NPY (Grill et al. 2002; Schwartz and Moran 2002).

Le noyau dorsal moteur du nerf vague, contient la majorité des somas des neurones pré-ganglionnaires vagues. Il reçoit des projections directes des afférences sensorielles vagues et de centres supérieures tels que le noyau paraventriculaire (noyau à action anorexigène situé dans l'hypothalamus), ou indirectes via le NTS (Luckman and Lawrence, 2003).

L'area postrema, est un organe circumventriculaire qui se trouve à proximité du 4^{ème} ventricule et de nombreux vaisseaux sanguins dépourvus de la BHE. L'AP a été longtemps décrite pour son rôle dans le contrôle des vomissements (Miller and Leslie 1994), mais elle intervient également dans des fonctions immunitaires, dans la régulation cardiovasculaire et l'homéostasie énergétique. La variabilité des actions de l'AP est due à l'expression de récepteurs qui lui permettent de détecter de nombreux facteurs circulants comme la leptine (une hormone sécrétée par le tissu adipeux). Les neurones de l'AP projettent vers l'hypothalamus et le NTS (Smith et al. 2016).

En conclusion, le CVD est considéré comme un des sièges majeurs de la régulation de la prise alimentaire et ayant un rôle aussi important que l'hypothalamus, l'autre site classique et majeur impliqué dans cette régulation.

V. MATÉRIELS ET MÉTHODES

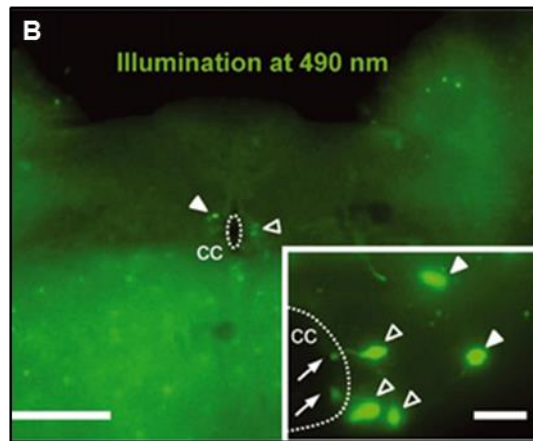
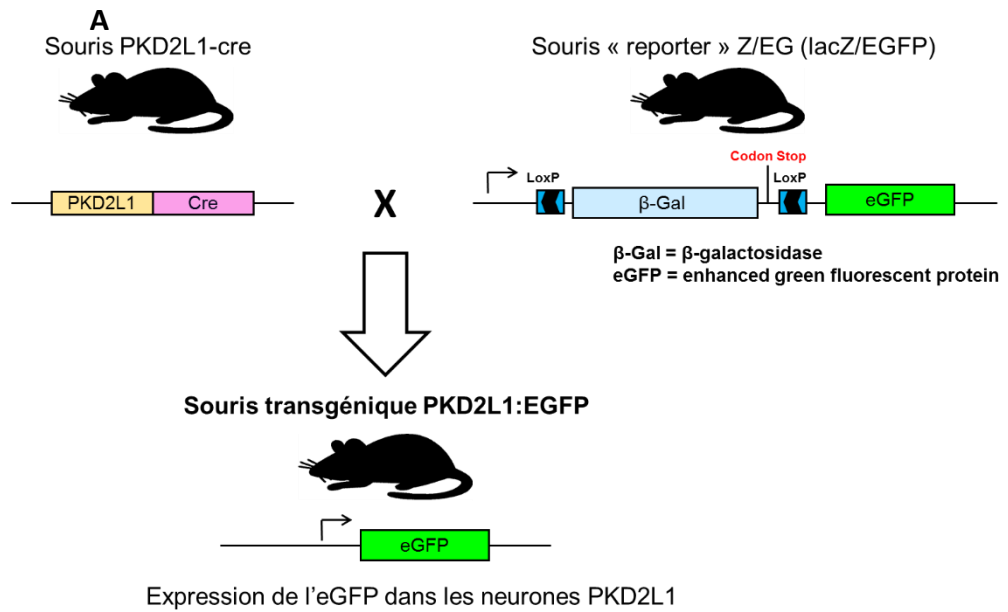
A. Animaux

Les expériences suivantes ont été réalisées dans le respect des consignes de la directive européenne (2010/63/UE) et de la Direction Départementale de la Protection des Populations des Bouches-du- Rhône (DDPP13).

Deux lignées de souris sauvages (B16C57) ou transgéniques PKD2L1:EGFP, âgées de 8-18 semaines, appartenant aux deux sexes ont été utilisées. Ces souris ont été logées dans des cages de 5 souris maximum dans une pièce où la température a été maintenue à 20°C. Elles avaient accès *ad libitum* à l'eau et à la nourriture sous un cycle d'éclairage réglé 12h jour/12h nuit.

Les souris PKD2L1:EGFP :

Dans ce modèle de souris, les cellules qui expriment le canal PKD2L1 deviennent fluorescentes, grâce à la protéine «*green fluorescent protein*» (GFP ou EGFP pour *enhanced green fluorescent protein*). L'insertion du gène de la EGFP à celui du PKD2L1 est obtenu à partir du croisement de deux lignées: la lignée PKD2L1-IRES-CRE (fournie par Pr. Zuker, Hughes Medical Institute, University of California, La Jolla, USA) où le gène IRES-CRE est inséré en aval du gène codant pour le canal PKD2L1 afin d'exprimer la protéine CRE recombinase dans les cellules PKD2L1 positif avec la lignée lacZ/EGFP (fournie par Dr P. Durbec, IBDML, Aix-Marseille Université, Marseille, France) utilisée comme système rapporteur permettant ainsi l'expression spécifique de la EGFP dans les cellules PKD2L1 après l'ablation CRE-dépendante du codon stop situé en amont du gène de la GFP (figure V.1).



Orts-Del'Immagine et al., 2012 (modifiée)

Figure V.1. Production des souris PKD2L1: EGFP

A ; les souris PKD2L1:EGFP sont générées à partir d'un croisement entre les souris PKD2L1-CRE et les souris LacZ-EGFP. B ; NcLCR autour du canal central (CC) sur une tranche du complexe vagal dorsal chez une souris PKD2L1:EGFP visualisés par épifluorescence (adaptée de Orts-Del'immagine et al.2012).

B. Immunohistofluorescence:

En immunohistofluorescence, les deux sous unités du récepteurs GABA_B ont été ciblées via des doubles marquages : le premier marquage étant le PKD2L1 ou EGFP pour l'identification des NcLCR, l'autre spécifique à l'une des sous unités GABA_{B1} ou GABA_{B2} (tableau V.1).

1. Protocole des doubles immunomarquage GABA_{B1}/PKD2L1 et GABA_{B2}/EGFP:

Tableau V.1. Les anticorps utilisés lors de la double immunohistofluorescence afin de localiser les sous-unités GABA_{B1} et GABA_{B2} dans les NcLCR :

	Fournisser	Référence	Type	Réactivité	Hôte	Anticorps secondaire	Fluorescence
Anti-Récepteur GABA-B1	Abcam	ab55051	Monoclonal	Humain, Rat et souris	Souris	Goat anti-Mouse Alexa 594 (Life Technologies , ref A11032)	Rouge
Anti-PKD2L1	Emd Millipore	Ab9084	Polyclonal	Souris	Lapin	Goat anti-Rabbit Alexa 488 (Life Technologies , ref A11034)	Vert
Anti-Récepteur GABA-B2	Abcam	ab52248	Polyclonal	Humain, Rat et souris	Lapin	Goat anti-Rabbit Alexa 594 (Life Technologies , ref A11037)	Rouge
Anti-EGFP	Abcam	Ab38689	Monoclonal	Souris	Souris	Goat anti-Mouse Alexa 488 (Life Technologies , ref A11029)	Vert

Pour nos expériences nous avons utilisé des animaux de la lignée PKD2L1:EGFP, mâles et femelles de 15-18 semaines d'âge.

Au préalable, ces souris ont été anesthésiées en mode intrapéritonéal par un mélange (kétamine 15mg/Kg et Xylazine 100mg/Kg) puis perfusées par voie intracardiaque au PBS (0,1M) suivi d'une solution de paraformaldéhyde à 4%. Le cerveau et la moelle épinière ont été extraits puis gardés 30 min à 1h dans du paraformaldéhyde à 4% et à température ambiante pour une meilleure post fixation des tissus. Ensuite les tissus sont rincés une nuitée au PBS à 4°C. Le lendemain, les tissus sont transférés dans du saccharose 30% à 4°C. Après 48h à 72h de cryoprotection, le cerveau et la moelle sont récupérés du saccharose pour être congelés (congélation rapide) en isopentane liquide (-40°C). Finalement, les tissus sont conservés à -20°C jusqu'au moment de la coupe.

Ultérieurement des coupes coronales de 40 µm d'épaisseur sont réalisées à l'aide du cryostat (Leica CM3050) au niveau de la moelle épinière cervicale et du tronc cérébral.

Enfin, les coupes sont récupérées dans une plaque 12 puits rincées au PBS 0,1 M puis traitées pendant 1h avec une solution de perméabilisation et de blocage constituée du Triton 0,3% - BSA 1% - NDS 2% : Le triton est un détergent permettant de perméabiliser les membranes cellulaires ce qui facilite l'accès des anticorps. Le BSA (*en anglais: Bovine Serum Albumin*) et le NDS (*en anglais : Normal Donkey Serum*), assurent le blocage et la saturation des sites de fixation non spécifiques. Cette étape se déroule sous agitation permanente et à température ambiante. Par la suite, ces coupes sont incubées dans une solution contenant en plus de la BSA 1% - et du NDS 2%, un des deux anticorps primaires, soit l'anti-PKD2L1 ou l'anti-GABA_{B1}. Les conditions d'incubation sont indiquées dans le tableau 5. Après, les coupes sont rincées 3 fois (15 min) au PBS puis incubées avec les anticorps secondaires (Goat anti-Rabbit 488 ou Goat anti-Mouse 594) (tableau V.2).

Le tableau suivant résume le protocole qui a servi à réaliser le double marquage PKD2L1/GABA_{B1} :

Tableau V.2. Protocole d'immunomarquage PKD2L1/GABA_{B1} :

Anticorps	Concentration	Temps d'incubation	Température d'incubation	Témoin négatif
Anticorps primaire anti-PKD2L1	1/700	Une nuitée (18h)	4°C	Sans Anticorps primaire
Anticorps primaire anti-GABA-B1	1/100	24 h	Température ambiante	Sans Anticorps primaire
Anticorps secondaire Goat anti-Rabbit 488	1/400	2h	Température ambiante	1/400
Anticorps secondaire Goat anti-Mouse 594	1/1000	1h30min	Température ambiante	1/1000

Finalement, les coupes sont rincées à plusieurs reprises au PBS, montées sur des lames gélatinées (4 %) puis, laissées à sécher avant d'être couvertes de lamelles dans un milieu de montage anti-blanchiment (moviol) et stockées dans le noir à 4 °C.

2. Acquisition des images:

L'acquisition des images a été réalisée à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser (Zeiss LSM700) équipé d'un laser argon (488 nm) pour la fluorescence EGFP et d'un laser He/Ne (543 nm, 633 nm) pour la fluorescence Alexa 594. Les objectifs utilisés sont l'objectif 20x (ouverture numérique de 0,8 ; épaisseur optique de $\approx 2 \mu\text{m}$), et l'objectif à immersion dans l'huile, 63x (ouverture numérique 1,4 ; épaisseur optique de $\approx 0,8 \mu\text{m}$). L'acquisition est effectuée en plusieurs plans suivant l'axe Z. Le traitement des images a été effectué par les logiciels ZEN 2009 light Edition et ImageJ.

C. Electrophysiologie:

1. Préparation des solutions:

Une manipulation du patch clamp commence tout d'abord par la préparation des solutions. D'abord une solution de coupe (appelée également : «*Slicing solution*» ou la solution saccharose), ayant pour rôle de ralentir le métabolisme cellulaire et de garder les cellules en vie le plus longtemps possible.

En plus qu'elle est maintenue à une basse température (0-4°C) et oxygénée (95% O₂+5% CO₂). Cette solution est riche en saccharose et en glucose pour une meilleure conservation du tissu. Elle est faiblement concentrée en sodium et en calcium et est riche en magnésium (connu par son blocage des récepteurs NMDA du glutamate) afin de réduire le taux d'excitabilité et la neurotransmission au sein du tissu nerveux (tableau V.3).

Puis une deuxième solution est préparée ; il s'agit de la solution de récupération et d'enregistrement dont la composition est semblable à celle du liquide céphalo rachidien d'où son appellation de **liquide cérébrospinal artificiel** ou de **liquide céphalo rachidien artificiel** (LCSa, LCRa ou « *ACSF : Artificial cerebrospinal fluid* ») (tableau V.4). Sa composition permet une récupération de l'activité métabolique du tissu nerveux. Elle est moins riche en magnésium, ne contient pas de saccharose et est riche en sodium et en calcium.

Tableau V.3. Composition de la solution de coupe

Composés	Concentration (mM)	Osmolarité théorique (mosm/l)
NaCl	75	150
NaH ₂ PO ₄	1,25	2,5
NaHCO ₃	33	66
KCl	3	6
MgCl ₂	7	21
Saccharose	58	58
Glucose	15	15
Acide ascorbique	2	2
Na-Pyruvate	2	4
Myo-Inositol	3	3
CaCl ₂	0,5	1,5
pH (0-4°C) ≈7,41		
Osmolarité théorique (calculée)=329 mosm/l ; Osmolalité expérimentale (mesurée par l'osmomètre) ≈319 mosm/kg		

Tableau V.4. Composition de la solution d'enregistrement et récupération

Composés	Concentration (mM)	Osmolarité (mosm/l)
NaCl	115	230
NaH ₂ PO ₄	1,25	2,5
NaHCO ₃	23	46
KCl	3	6
MgCl ₂	2	6
Glucose	15	15
Acide ascorbique	2	2
Na-Pyruvate	2	4
Myo-Inositol	3	6
CaCl ₂	2	6
pH (Ta) ≈7,42		
Osmolarité théorique=323,5 mosm/l ; Osmolalité expérimentale=304 mosm/kg		

2. Préparation des tranches:

Les tranches coronales d'une épaisseur de 250 μ m, sont coupées au vibratome au niveau du tronc cérébral (de la partie caudale jusqu'au 4^{ème} ventricule) des souris mâles et femelles âgées entre 8-12 semaines.

La souris est anesthésiée par un mélange de Kétamine (15mg/Kg) et de Xylazine (100mg/Kg) et une fois la souris endormie (vérification par pincement des pattes) **et** toujours en vie (vérification des battements du cœur), elle est euthanasiée par décapitation ; la tête est plongée immédiatement dans la solution de coupe oxygénée (95% O₂-5% CO₂) à 0-4°C. L'extraction du cerveau se réalise dans des conditions de froid (bacs et blocs de glace, solution de coupe à **0-4°C** où le tissu sera trempé régulièrement durant toute l'opération). Ensuite, le cerveau est coupé en deux transversalement, la moitié caudale (comportant le tronc cérébral) recueillie dans un bécher contenant la solution de coupe oxygénée (95% O₂-5% CO₂) maintenue à une température proche de 0 °C. Après, le tissu cérébral est débarassé des méninges sous loupe binoculaire. Finalement, le tissu est collé sur le porte objet du vibratome, en appuyant le côté dorsal sur un bloc d'agar afin de le maintenir bien fixe (voir figures V.2 et V.3).

Remarque : *l'extraction du cerveau doit être réalisée avec un rythme, minutieux, délicat et assez rapide dans le but de conserver au mieux la qualité du tissu et la survie des cellules.*

Le porte objet est vissé sur la chambre du vibratome remplie de la solution de coupe froide oxygénée continuellement. Des coupes d'épaisseur 250 μ m ont été réalisés par vibratome (*Leica VT1000S*, avec une vitesse faible et une fréquence de vibration élevée).

En définitive, les tranches de cerveau sont transférées successivement depuis la chambre du vibratome à la chambre de récupération remplie de LCRA oxygéné et maintenu à une température de ~35°C grâce à un bain marie où les coupes sont incubées 30 minutes environ.

Après 1h à 1h30 de repos dans du LCRA à température ambiante, une tranche sera transférée à la chambre du microscope du poste de patch clamp pour commencer l'enregistrement.

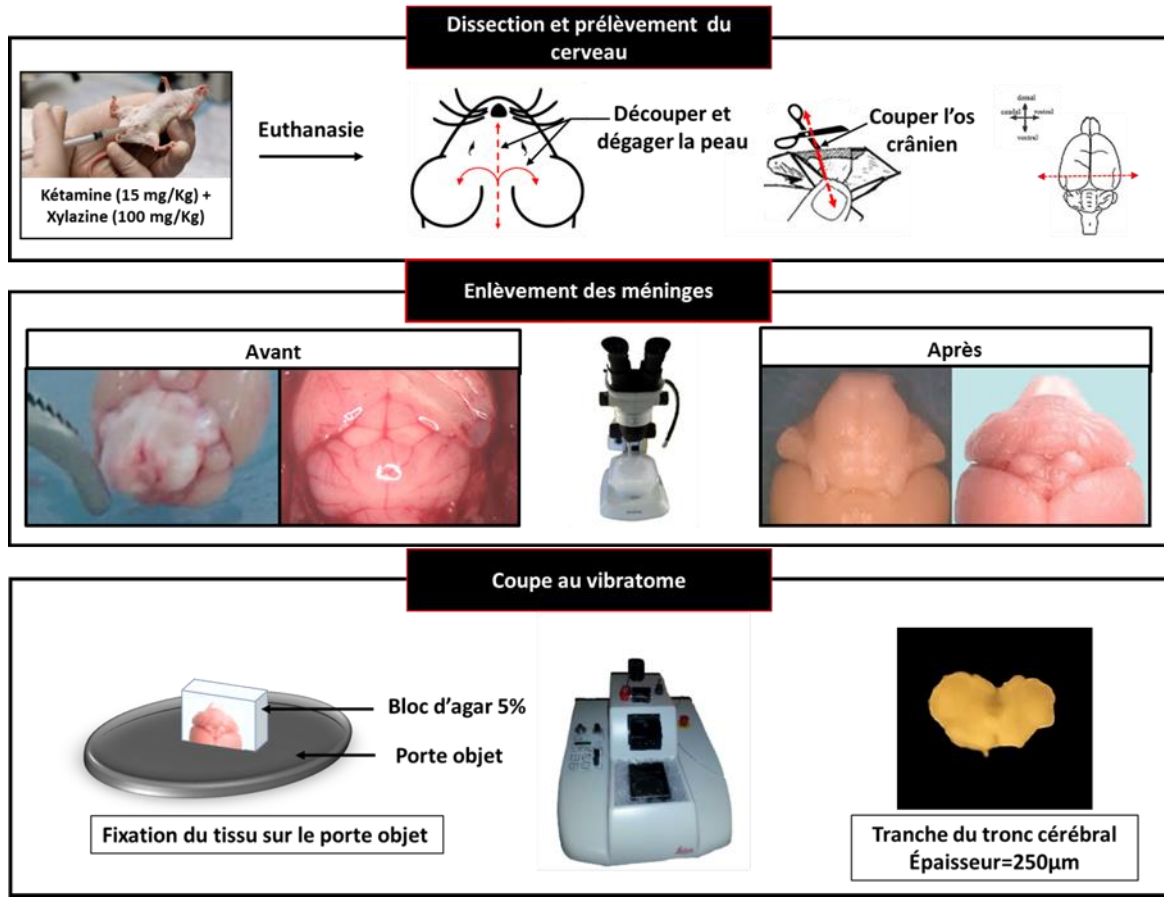


Figure V.2. Etapes de préparation des tranches pour l'étude électrophysiologique.

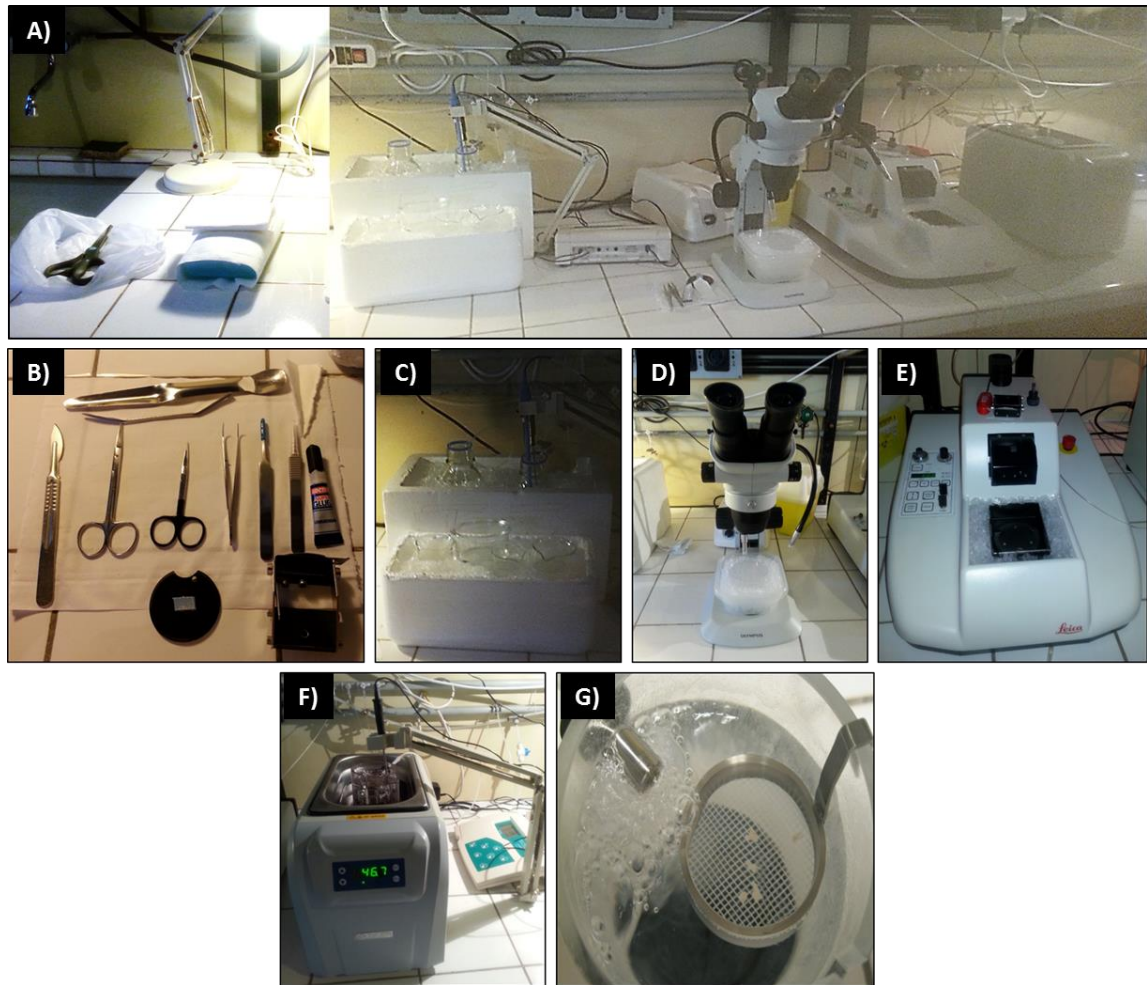


Figure V.3. Matériels utilisés lors de la préparation des tranches

A ; plan de travail pour la préparation des tranches ; B ; outils de chirurgie utilisés lors de l'extraction du cerveau, enlèvement de méninge et fixation du tissu sur le vibratome ; C ; bacs de glace permettant de garder la solution de coupe froide ; D ; la loupe binoculaire à lumière froide ; E ; le vibratome *Leica*; F ; bain marie maintient la solution de récupération à une température de 35 °C environ ; G ; chambre de récupération des tranches.

3. Patch clamp

Erwin Neher et Bert Sakmann ont inventé la technique électrophysiologique « le patch clamp », en 1976, afin d'étudier les propriétés biophysiques et biomoléculaires des canaux ioniques. Cette nouvelle méthode leur a permis d'observer directement le courant passant au travers des canaux isolés et de mesurer des courants globaux ou unitaires. Plus tard, cette invention a été récompensée par un prix Nobel de médecine en 1993.

1.1. Principe de la technique

La technique du patch clamp est basée sur l'usage d'une micropipette en verre borosilicaté dont la résistance pipette est entre 4 et 5 M Ω .

Cette pipette est remplie avec un milieu intracellulaire correspondant à l'expérimentation souhaitée (tableau V.5).

Tableau V.5. Composition des solutions intra pipette

Composés	Concentration (mM)	
	Solution Intracellulaire Césium de Chlorure	Solution Intracellulaire du Potassium Gluconate
CsCl	130	-
K-Gluconate	-	140
NaCl	4	4
MgCl ₂	2	2
HEPES	1,1	5
Na ₂ -Phosphocréatine	5	5
Na ₂ -ATP	2	2
EGTA	1,1	1,1
Na ₃ -GTP	0,6	0,6
Lidocaïne N-ethyl-Cl	5	-
pH (à Température ambiante)	7,35 (Ajusté par le CsOH)	7,35 (Ajusté par le KOH)
Osmolalité (mesurée) (mosmole/Kg)	285	285

Ensuite la micropipette est mise en contact avec la cellule. Une légère aspiration est appliquée dans la pipette ; afin d'obtenir une fermeture hermétique (scellement, joint, «*seal*») entre les parois de la pipette et la bicouche lipidique.

Par conséquent, les petites variations de potentiel, dues à l'ouverture et à la fermeture des canaux présents dans le morceau de membrane isolé sous la pipette de patch, peuvent être enregistrées grâce à un système d'amplification.

Il existe différentes configurations de patch clamp (figure V.4).

Parmi ces configurations, la configuration 'Cellule entière' (en anglais : *whole cell*). Elle est de loin la configuration de patch clamp la plus utilisée pour la caractérisation des neurones. Lors de cette configuration, la membrane est rompue, ce qui crée une communication directe entre le contenu de la micropipette et le cytoplasme entraînant la diffusion de la solution intra pipette à l'intérieur de la cellule. Cette configuration permet l'étude macroscopique de l'activité de tous les canaux de la cellule.

Dans nos travaux, la configuration « whole cell » a été utilisée car étant la plus appropriée pour l'étude des récepteurs GABA_B dans les NcLCR.

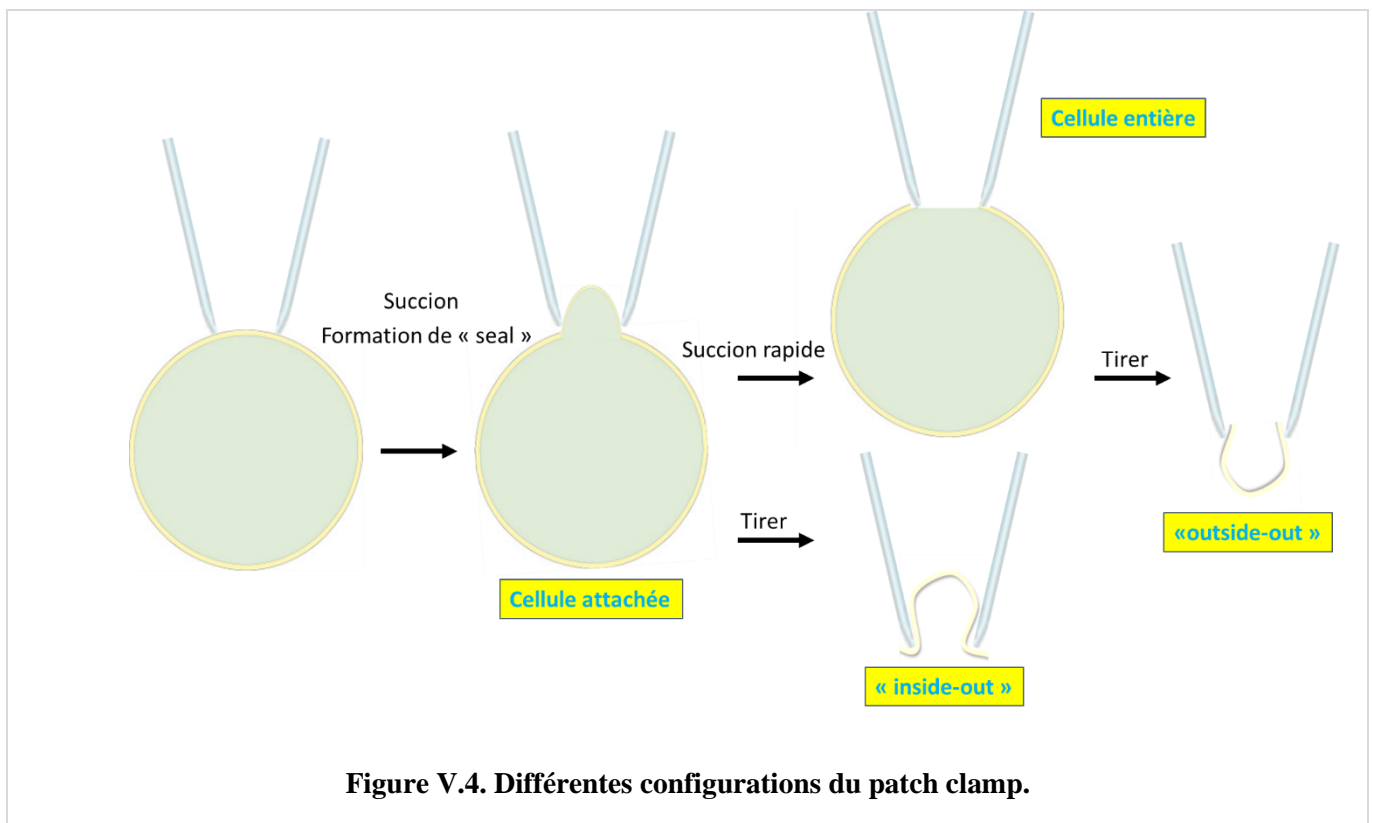


Figure V.4. Différentes configurations du patch clamp.

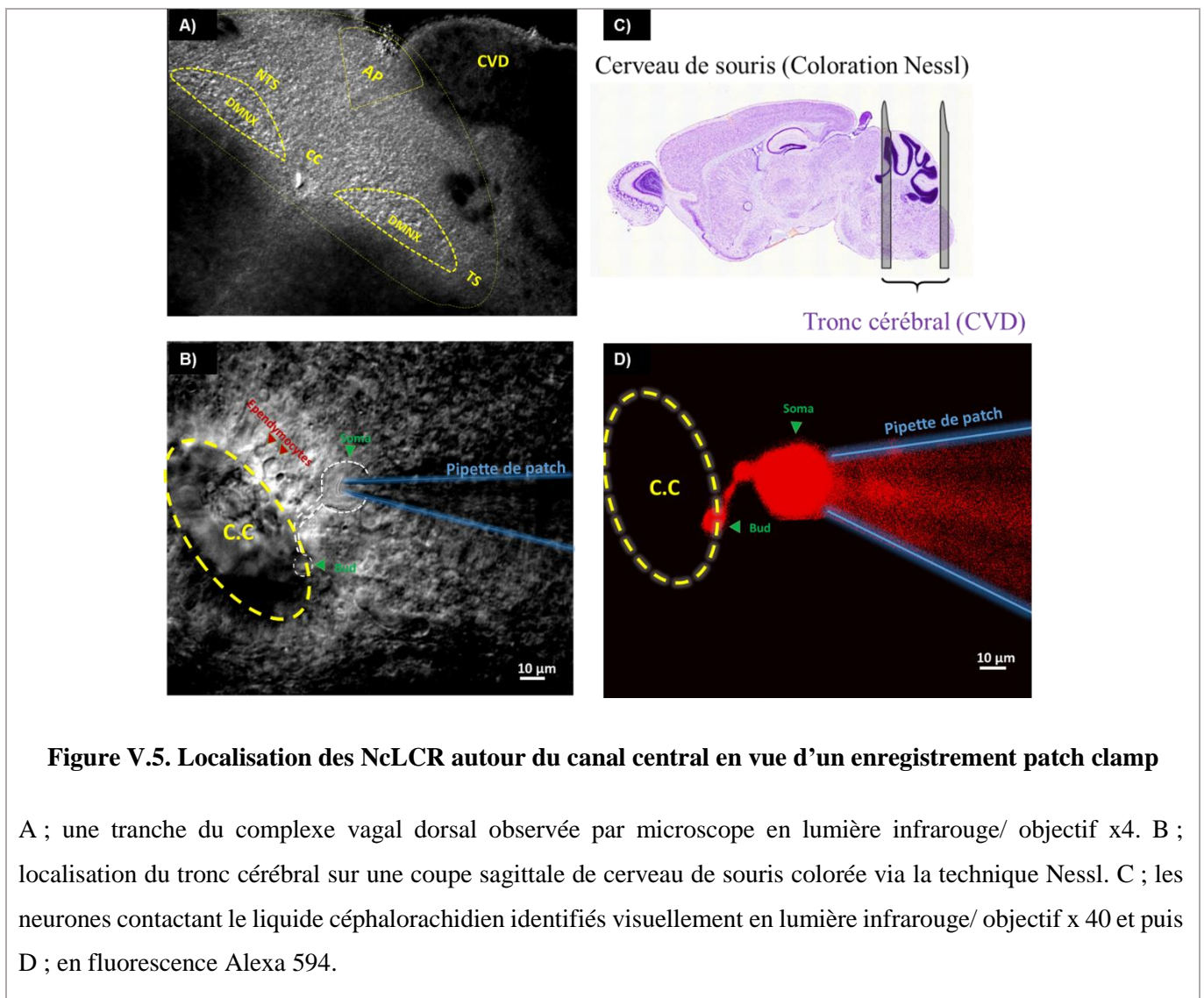
La technique du patch clamp nous permet également d'étudier les cellules suivant deux modes différents : le courant imposé et le potentiel imposé.

La technique du potentiel imposé (Voltage clamp= Voltage holding=Vh) consiste à maintenir le potentiel de membrane à une valeur constante. Une fois couplée à la configuration cellule entière,

elle permet de mesurer des courants totaux ou macroscopiques (la somme des courants unitaires traversant plusieurs centaines de canaux). Tandis que le courant imposé permet de mesurer le potentiel membranaire après l'injection d'une intensité de courant choisie par l'expérimentateur.

1.2. Enregistrement patch clamp:

Durant cette étude la structure d'intérêt est le tronc cérébral. Les cellules enregistrées, via la technique de patch clamp, se situent plus exactement dans le complexe vagal dorsal (CVD) et étaient obligatoirement identifiées comme étant NcLCR (figure V.5). Tous les enregistrements ont été effectués en configuration cellule entière et en mode potentiel imposé et/ou courant imposé (amplificateur Axopatch 200A).



4. Déroulement des expérimentations:

Une première tranche est transférée depuis la chambre de récupération vers la chambre du microscope inversé (Scientifica) où elle sera stabilisée à l'aide d'une harpe en platine de l'ordre de 1 cm de diamètre. Cette chambre est équipée d'une perfusion permanente de solution d'enregistrement oxygénée à un débit de 1,5 à 2 ml/min, une aspiration par une pompe à vide assurant le renouvellement de la solution et une masse (figure V.6). Les tranches sont éclairées par une lumière infra-rouge. Au départ, l'objectif (x4) facilite le repérage du canal central. Ensuite, un plus fort grossissement est exigé, d'où l'usage de l'objectif (x40) qui est un objectif à immersion dans l'eau. Les enregistrements se déroulent à une température ambiante (~20°C).

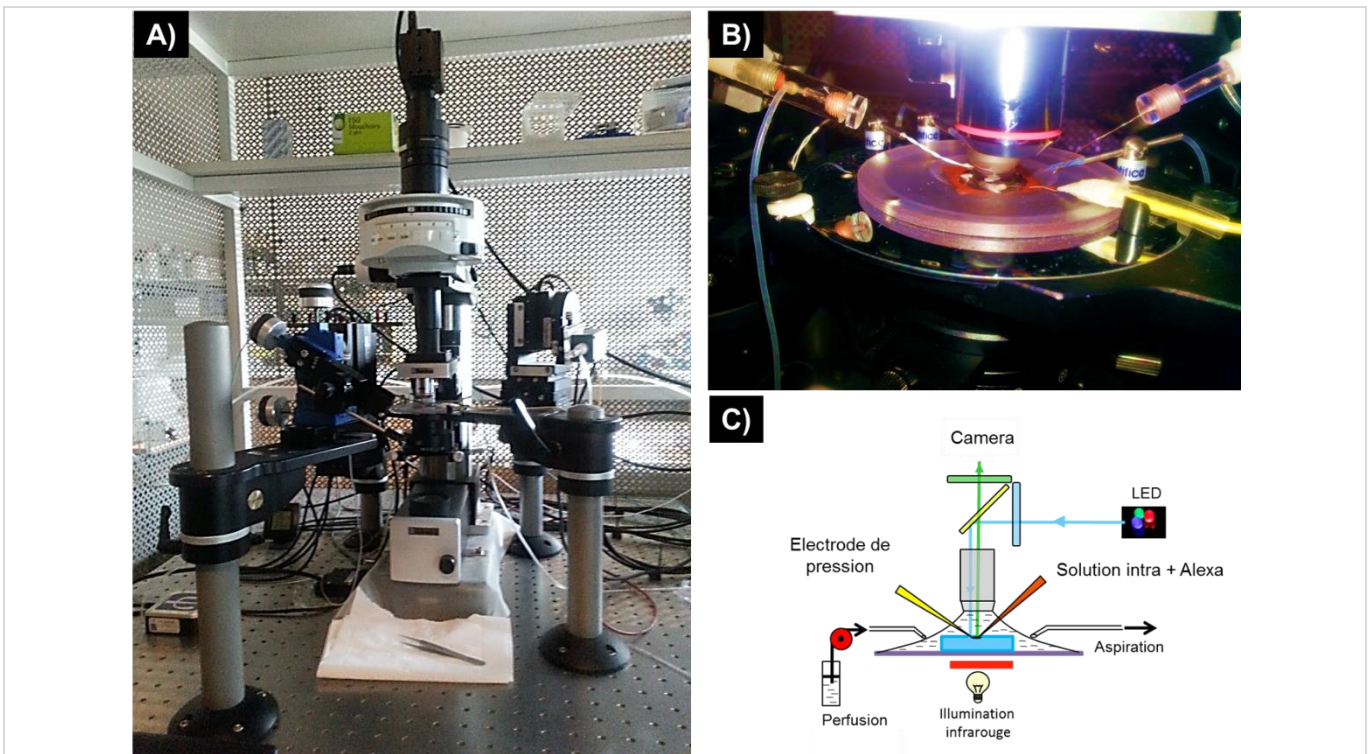


Figure V.6. Dispositif de microscopie relié à la technique du « patch clamp »

A ; le microscope *Scientifica* fixé sur une table antivibratoire (support en dessous) afin d'amortir les vibrations et isolé des nuisances électriques et électromagnétiques externes grâce à une cage de *Faraday*. B ; la chambre du microscope alimentée par un tube de perfusion plus une aspiration afin d'assurer la circulation et le renouvellement permanent du LCRa. C ; schéma explicatif du dispositif microscopique *Scientifica*.

5. Mesure des propriétés passives des NcLCR

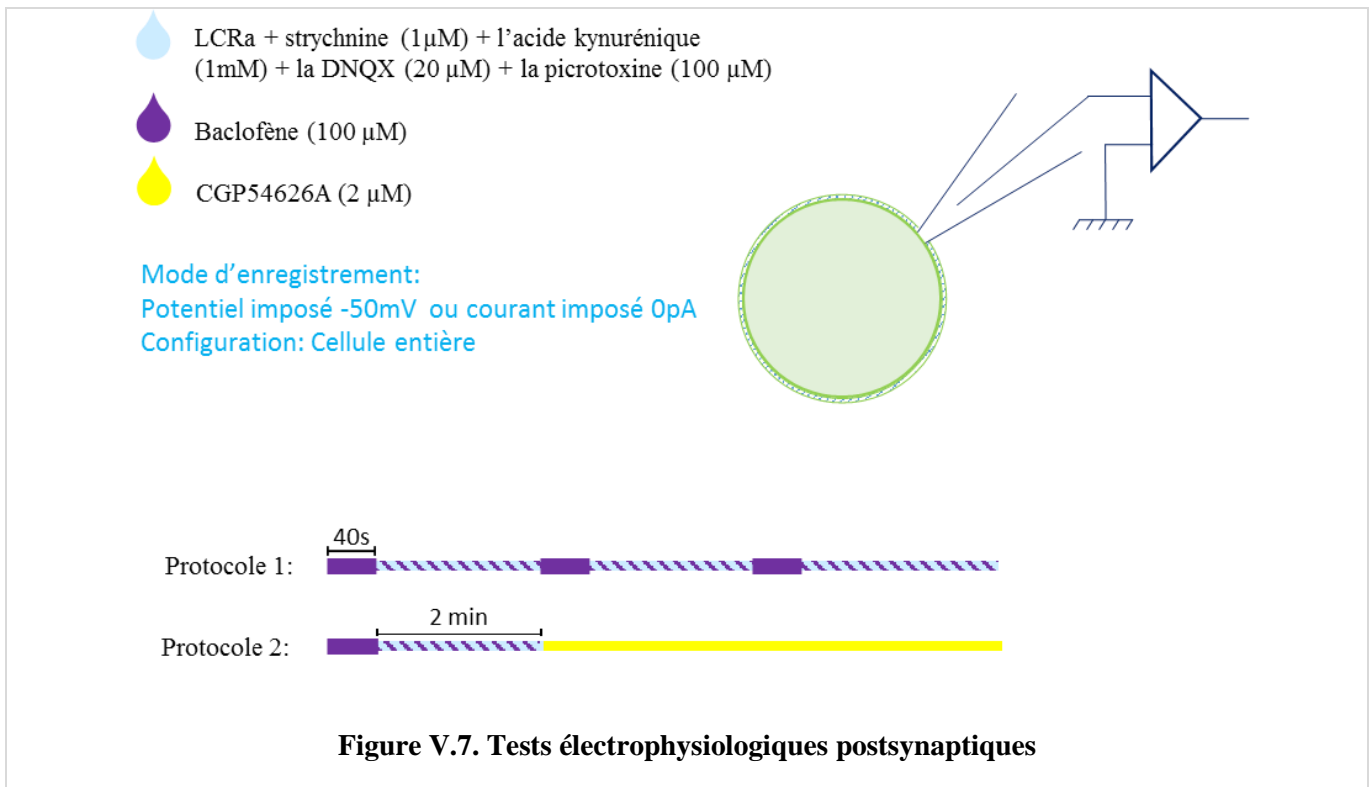
Avant chaque enregistrement, une mesure des propriétés passives des neurones est effectuée en commençant par noter les valeurs expérimentales de la résistance série et la capacité membranaire prélevées directement de l'amplificateur, puis par un enregistrement immédiat des capacités membranaires et le potentiel membranaire en mode courant imposé, $I=0$ pA. Ensuite nous appliquons des sauts de potentiel « Voltage steps » de -20 mV afin d'induire un courant capacitif et résistif. Ces différentes mesures permettent de déterminer les propriétés passives de la cellule enregistrée.

6. Enregistrement des canaux potassiques à rectification entrante (GIRK/KIR3) dans les NcLCR :

La caractérisation postsynaptique du R-GABA_B peut se réaliser à travers l'enregistrement du courant portée par les canaux KIR3. Cet enregistrement s'est effectué à l'aide d'une intrapipette remplie du milieu K-Gluconate (tableau V.5) en présence des antagonistes de la glycine, des récepteurs AMPA/ kainate du glutamate et des récepteurs GABA_A dilués dans du LCRA, qui sont respectivement la strychnine (1 μ M), l'acide kynurénique (1 mM) **ou** la DNQX (20 μ M) et la picrotoxine (100 μ M) **ou** la gabazine (10 μ M) afin d'isoler la réponse KIR3.

En potentiel imposé $V_h = -50$ mV. Le baclofène (100 μ M) est appliqué pendant 40 secondes, soit par pression (à l'aide d'une micropipette) soit par bain. La durée des enregistrements était de 2min. Ensuite d'autres enregistrements ont été réalisés où le baclofène a été appliqué suivi par une application CGP54626A (2 μ M) par bain jusqu'à la disparition totale de l'effet présumé du récepteur GABA_B sur le canal KIR3.

En mode courant imposé, le même protocole a été effectué, c'est-à-dire une application du baclofène (100 μ M) pendant 40 s, suivie d'une application du CGP54626A (2 μ M). En injectant cette fois-ci un courant $I = 0$ pA (figure V.7).



7. Enregistrement des courants synaptiques dans les NcLCR :

Le but de cette étude est de mettre en évidence la modulation des NcLCR via les récepteurs GABA_B présynaptiques d'où l'usage de la technique des évoqués électriques. Cette technique consiste en la stimulation des éléments présynaptiques par le biais d'une électrode de stimulation placée dans la zone médullaire (autour du cc) à quelques micromètres (50 à 100 μ m) de la cellule enregistrée (figure V.8A). Cette électrode est liée à un boîtier stimulateur (de l'anglais : « *stimulus isolator* ») qui génère des sauts de potentiel allant de 0 à 90 V et des injections de courants de 0 à 10 mA.

En potentiel imposé ($V_m = -60$ mV), le manipulateur choisit une valeur de potentiel et lance la stimulation. Puis le baclofène (100 μ M) est appliqué par bain et la réponse est enregistrée avec une micropipette remplie d'un milieu CsCl (tableau V.5).

L'effet observé est bloqué par l'application du CGP54626A (2 μ m) par bain. Ensuite nous avons appliqué de la picrotoxine (100 μ M) (ou la gabazine 10 μ M) afin de vérifier l'effet sur les récepteurs GABA_A.

La solution d'enregistrement était composée de LCRA auquel il a été ajouté de la strychnine (1 μ M), l'acide kynurénique (1 mM) ou la DNQX (20 μ M).

Une technique supplémentaire appelée « *Paired-pulse* », a été sollicitée. Elle consiste à effectuer deux stimulations simultanées qui durent 100 μ s chacune et qui sont séparées par une pause de 70 ms à une fréquence de 0,1 Hz. Ce protocole nous permet de déterminer le potentiel de libération des neurotransmetteurs via le calcul du « Paired-pulse ratio » (PPR) qui constitue le rapport entre les amplitudes des deux réponses évoquées électriquement (figure V.9B).

Dans le cas de la « Facilitation » la synapse a un faible pouvoir de libération des neurotransmetteurs. Dans le cas de la « Depression » la synapse a un fort pouvoir de libération des neurotransmetteurs.

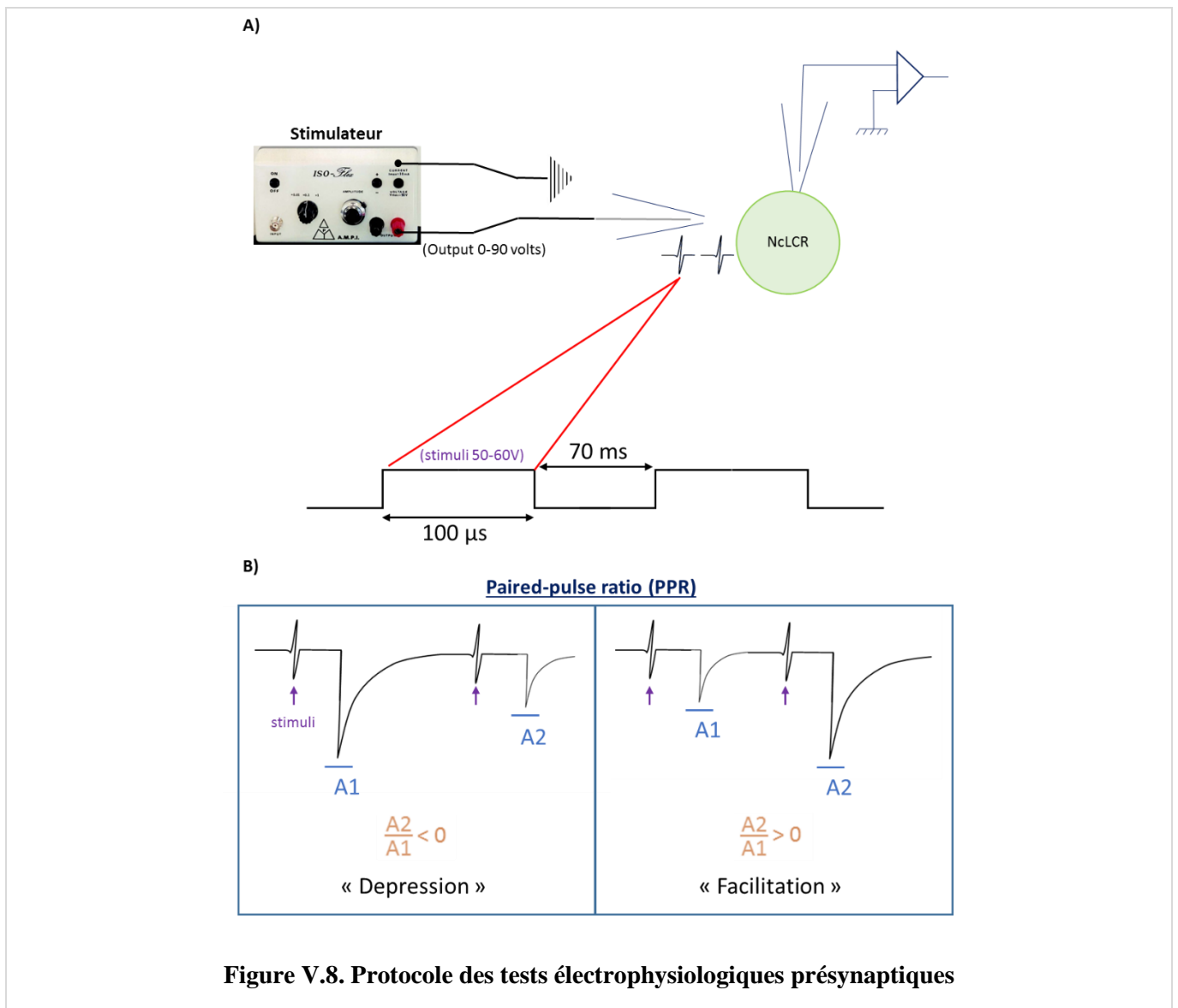


Figure V.8. Protocole des tests électrophysiologiques présynaptiques

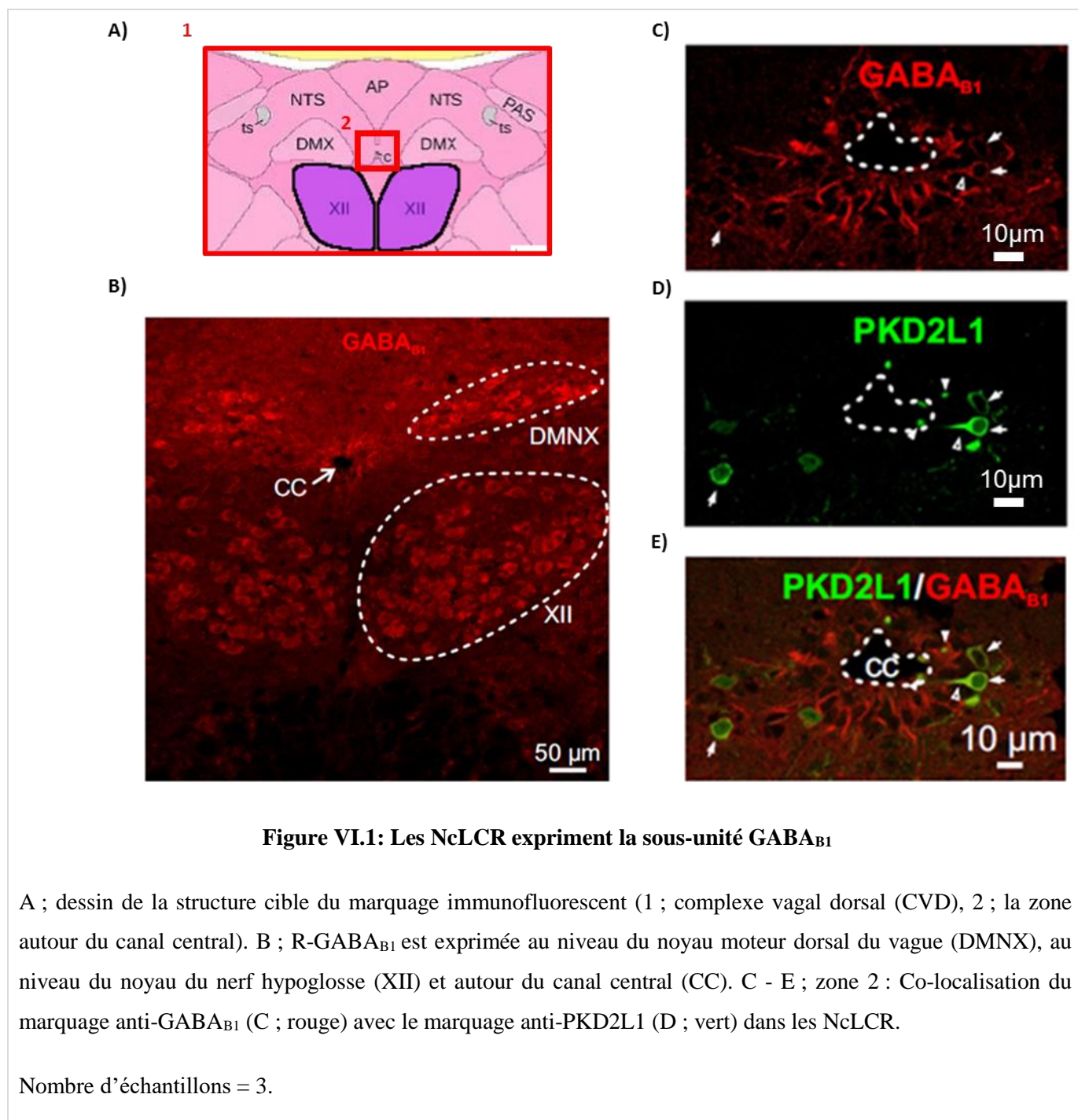
VI. RESULTATS

Notre étude de la caractérisation électrophysiologique du récepteur GABA_B dans les NcLCR a été initiée par la localisation des récepteurs GABA_B sur la membrane de ces cellules, suivie d'une étude de la réponse des R-GABA_B postsynaptiques médiée par les canaux potassiques à rectification entrante de type 3 (KIR3) et une étude du rôle des R-GABA_B présynaptiques dans la modulation des NcLCR.

Localisation des R-GABA_B dans les NcLCR

Le récepteur GABA_B est composé de deux sous-unités : GABA_{B1} et GABA_{B2}. La sous-unité GABA_{B1} a été identifiée dans les NcLCR chez le rat depuis 1999 (Margeta-Mitrovic et al. 1999b) (figure II.17 ; page 32). Afin de confirmer l'expression de cette sous-unité dans les NcLCR chez la souris, nous avons utilisé la double immunofluorescence PKD2L1/GABA_{B1} sur des coupes de tronc cérébral. L'anticorps anti-PKD2L1 cible les canaux PKD2L1 spécifiques aux NcLCR.

Nos résultats révèlent un immunomarquage anti-GABA_{B1} au niveau des corps cellulaires de plusieurs populations neuronales du complexe vagal dorsal (une structure du tronc cérébral) : dont le noyau moteur dorsal du vague (DMNX), le noyau du nerf hypoglosse (XII) et autour du canal central (CC) (figure VI.1 ; B). En effectuant un fort grossissement autour du canal central, nous avons observé un immunomarquage anti-GABA_{B1} dans les somas (flèches) de petites cellules autour du canal central et qui projettent une extension dendritique vers celui-ci (figure VI.1 ; C). Ce marquage a été co-localisé avec l'immunomarquage anti-PKD2L1 spécifique aux NcLCR (figure VI.1 ; D ; E). Il faut noter également qu'un très faible marquage anti-GABA_{B1} a été observé au niveau du bud de ces neurones. Ces résultats, indiquent que les NcLCR expriment la sous-unité GABA_{B1}.



Il faut savoir que le récepteur GABA_B ne peut être fonctionnel qu'en présence de ces deux sous-unités GABA_{B1} et GABA_{B2}. Nous avons donc essayé de localiser la sous-unité GABA_{B2} dans les NcLCR, en utilisant le double immunomarquage EGFP/GABA_{B2}, réalisé sur des souris EGFP : PKD2L1. Malheureusement, après maints essais nous n'avons pas pu mettre au point le protocole adéquat pour mettre en évidence l'expression de la sous-unité GABA_{B2} au niveau du tronc cérébral, bien que plusieurs études aient rapporté l'expression du récepteur dans cette structure. Cette absence de marquage est n'est pas due à la qualité de l'anticorps anti-GABA_{B2},

vu que le même anticorps a permis de localiser la sous-unité GABA_{B2} dans l'hippocampe (figure VI.2).

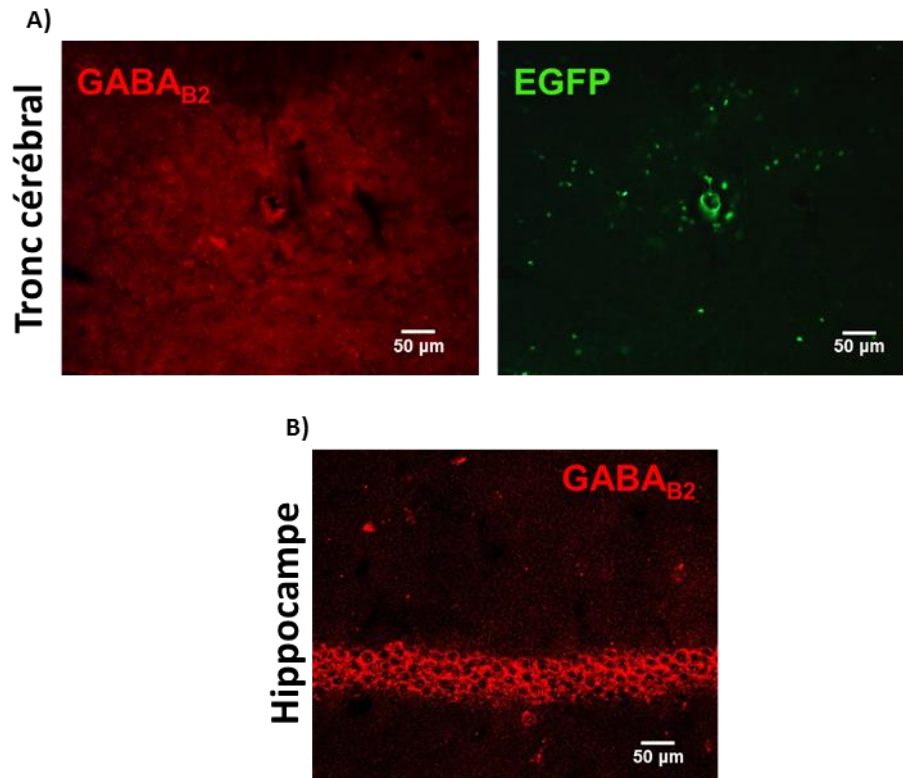


Figure VI.2: Expression de la sous-unité GABA_{B2} dans les NcLCR

A ; au niveau du tronc cérébral, aucun marquage GABA_{B2} n'a été repéré, aussi un marquage non spécifique de la EGFP est exprimé. B ; l'anticorps anti-GABA_{B2} révèle l'expression de la sous-unité GABA_{B2} dans l'hippocampe.

Exploration de la voie du couplage des R-GABA_B et des canaux KIR3

L'activation des R-GABA_B postsynaptiques, dans différents neurones du SNC, induit des courants médiés par les canaux potassiques à rectification entrante de type 3 (KIR3). Afin de vérifier l'existence d'une réponse similaire dans les NcLCR, nous avons enregistré ces neurones en configuration cellule entière (*whole-cell*) du patch clamp. Ensuite nous avons appliqué du baclofène (100 µM), un agoniste spécifique du R-GABA_B, par pression pour une durée de 40 secondes.

En mode courant imposé ou en mode potentiel imposé, le baclofène n'induit aucun effet dans les NcLCR (figure VI.3 ; A-C). De plus, le baclofène n'apporte pas de modification aux

propriétés électrophysiologiques des NcLCR (tableau VI.1), ni aux propriétés des potentiels d'action (PA), déclenchés par un potentiel imposé de -50 mV (figure VI.3 ; tableau VI.1).

Durant cette étude, les neurones DMNX ont été considérés comme contrôle interne au sein des mêmes tranches, du tronc cérébral, utilisées pour l'enregistrement des NcLCR. Les DMNX expriment les R-GABA_B (figure VI.1 ; B) et des études précédentes ont confirmé l'activation de la voie KIR3 dans ces neurones (Browning and Travagli 2001).

En mode courant imposé, l'application du baclofène (100 μ M, 40s) génère une hyperpolarisation de $9,45 \pm 4,12$ mV dans les neurones DMNX et un courant sortant d'une amplitude de $23,67 \pm 25,21$ pA en mode potentiel imposé (figure VI.3 ; D-E). Ces deux réponses ont été totalement inhibées en présence de la CGP54626A, un antagoniste spécifique des R-GABA_B (figure VI.3 ; D-E). Ces résultats montrent que les récepteurs GABA_B activent les canaux KIR3 dans les DMNX mais pas dans les NcLCR.

Tableau VI.1: Effet du baclofène sur les propriétés électrophysiologiques des NcLCR

	Contrôle	Baclofène	Valeur de P
Potentiel de repos (mV)	$-57,08 \pm 7,39$ (n=12)	$-53,08 \pm 6,70$ (n=11)	0,1079
Potentiel de seuil (mV)	$-37,41 \pm 4,37$ (n=8)	$-35,54 \pm 4,92$ (n=7)	0,4290
Amplitude du PA (mV)	$102,30 \pm 7,74$ (n=8)	$98,73 \pm 8,58$ (n=7)	0,2183
Fréquence des PA (Hz)	$17,68 \pm 5,89$ (n=8)	$19,67 \pm 5,80$ (n=7)	0,7345

+ Gabazine 10 μ M, Strychnine 1 μ M, DNQX 20 μ M

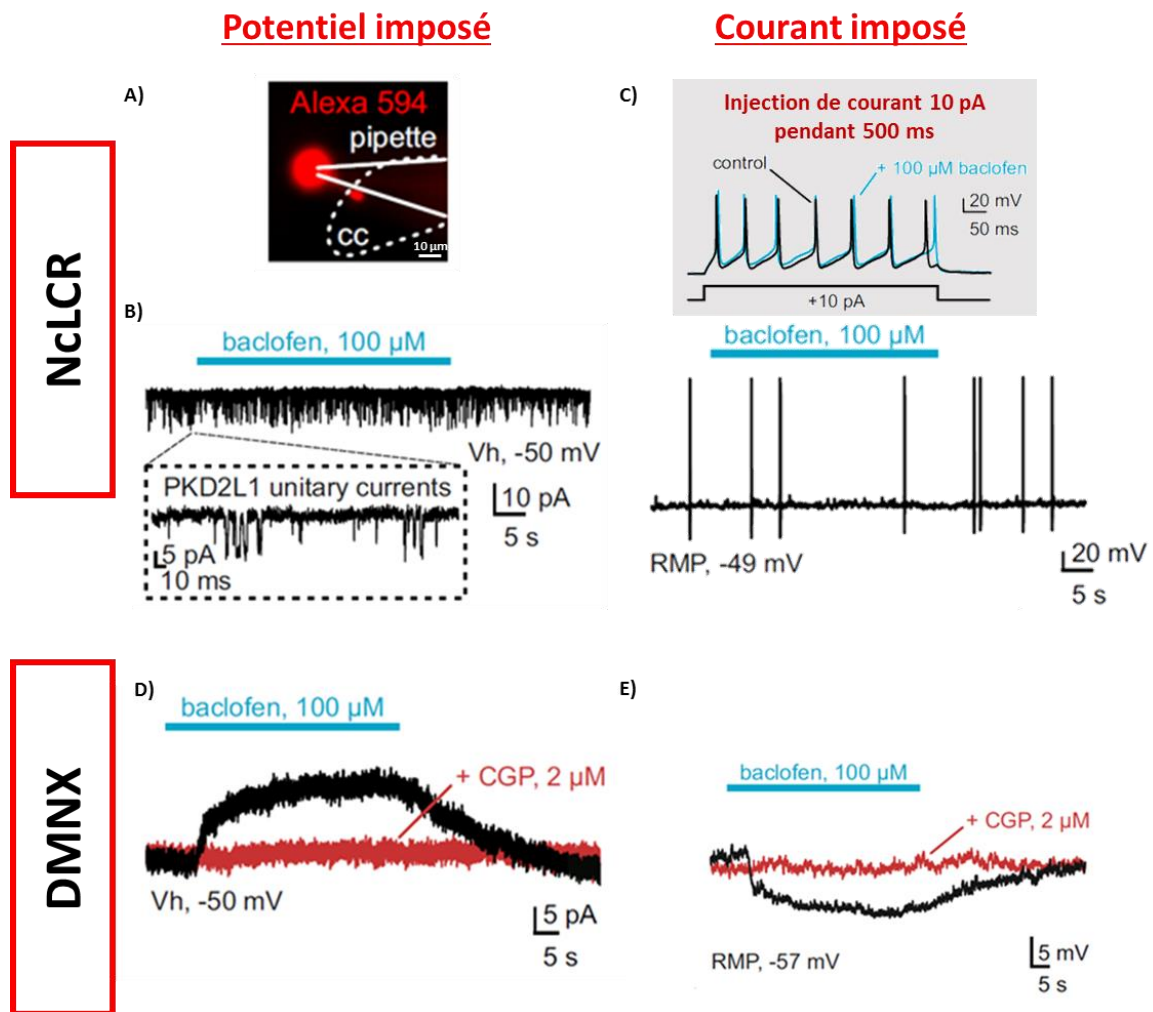


Figure VI.3: Effet du baclofène sur les NcLCR et les DMNX

A ; image d'un NcLCR rempli d'Alexa 594 (10 μ M ; rouge) révélé en lumière infra-rouge, après un enregistrement patch clamp en configuration cellule entière. B ; en potentiel imposé -50 mV, l'application du baclofène (100 μ M ; barre bleue) par pression pendant 40s n'induit aucune réponse dans les NcLCR. Une activité du canal PKD2L1 spécifique de ces neurones a été enregistré. C ; en haut : les potentiels d'action évoqués par des injections de courant 10 pA dans les NcLCR ont les mêmes propriétés en contrôle (tracé noir) ou en présence du baclofène (100 μ M, tracé bleu). En bas : en courant imposé, le baclofène (100 μ M ; barre bleue) appliqué par pression n'a aucun effet sur les NcLCR enregistrés. D ; en potentiel imposé -50 mV, l'application du baclofène

Les R-GABA_B inhibent les courants postsynaptiques inhibiteurs évoqués dans les NcLCR

Les récepteurs GABA_B inhibent les transmissions synaptiques en agissant sur les canaux calciques potentiel-dépendants (Ca_v) sur l'élément présynaptique. Nous avons donc étudié l'effet du baclofène sur les courants postsynaptiques inhibiteurs (CPSI) évoqués dans les NcLCR via des stimulations électriques.

Des travaux précédents de notre équipe ont confirmé que les NcLCR reçoivent des transmissions synaptiques inhibitrices spontanées (Orts-Del'immagine et al. 2012) mais les CPSI évoqués électriquement n'ont jamais été enregistrés auparavant dans les NcLCR. Par conséquent, nous avons caractérisé les CPSI évoqués via des stimulations électriques de 50 à 60 mV, appliquées pendant 100 µs, à une fréquence de 0,1 Hz. Ces stimulations génèrent des courants postsynaptiques entrants dans les NcLCR enregistrés en potentiel imposé à -60 mV, en présence du DNQX (20 µM), un antagoniste spécifique aux récepteurs glutamatergiques et de la strychnine (1 µM), antagoniste spécifique aux récepteurs glycinergiques (figure VI.4 ; A).

Ces courants postsynaptiques entrants dans les NcLCR, ont été réduits après l'application de la gabazine (GBZ, 10 µM) ou de la picrotoxine (10 µM) qui sont deux antagonistes spécifiques aux récepteurs GABA_A. Ces deux antagonistes se fixent sur deux sites distincts du récepteur GABA_A et ont eu le même effet sur les CPSI (figure VI.4 ; A-E). De plus, l'évaluation des amplitudes de courants en fonction de différents potentiels de maintien (-60 à +40 mV) révèle que le potentiel de réversion ($E_{rév}$) des CPSI est égal à $+9,75 \pm 3,15$ mV qui est relativement proche au potentiel d'équilibre de chlore (calculé) (+3,2 mV) (figure VI.4 ; F-G). Ces résultats indiquent que les CPSI évoqués dans les NcLCR sont médiés par les récepteurs GABA_A.

Ensuite nous avons testé l'effet du baclofène sur les CPSI évoqués. L'application du baclofène (100 µM) par bain inhibe les CPSI enregistrés dans les NcLCR (figure VI.4 ; H-J), cet effet est complètement supprimé après l'application de la CGP (2 µM), un antagoniste spécifique des R-GABA_B (figure VI.4 ; H-J). Nos résultats montrent que les R-GABA_B inhibent les CPSI médiés par les R-GABA_A dans les NcLCR.

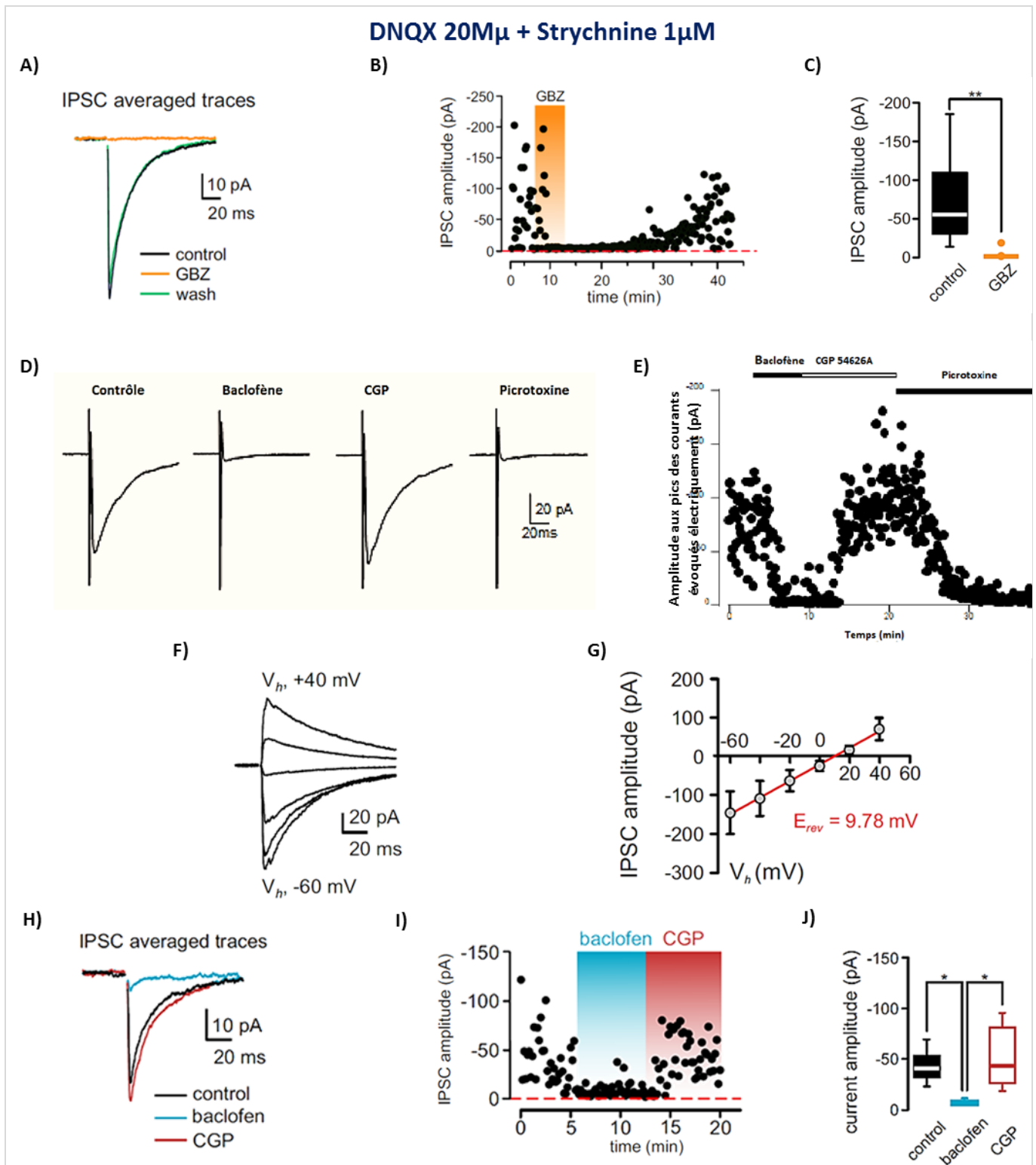


Figure VI.4: Effet du baclofène sur les CPSI évoqués dans les NcLCR

A ; courbes moyennes et B ; étude en fonction du temps des amplitudes des CPSI évoqués dans les NcLCR avant (noir) pendant (vert) et après (orange) l'application de la gabazine (10 μ M). C ; la boîte à moustaches des amplitudes des CPSI avant et après l'application de la gabazine. La gabazine a un effet inhibiteur significatif sur les amplitudes des CPSI : $-71,39 \pm 58,04$ pA dans les contrôles (noir) et $-1,84 \pm 5,60$ pA en présence de la gabazine

Figure VI.4: Effet du baclofène sur les CPSI évoqués dans les NcLCR (suite) : (orange) ; n=10 ; **P < 0,01 (Test des rangs signés de Wilcoxon). D ; à partir de la gauche, des courbes moyennes des CPSI évoqués dans les NcLCR dans les contrôles, après l'application du baclofène (100 μ M), après l'application de la CGP (2 μ M) et en présence de la picrotoxine (100 μ M). E ; les amplitudes des CPSI en fonction du temps avant, pendant et après l'application de la picrotoxine (100 μ M). F ; traces moyennes des CPSI en réponse à l'application des sauts de potentiel partant de -60 mV à +40 mV avec un écart de 20 mV. G ; la moyenne des pics des amplitudes des CPSI en fonction du potentiel de maintien. E_{rev} est indiqué par le point d'intersection de cette courbe avec l'axe des abscisses. H-I ; courbes moyennes (H) et amplitudes en fonction du temps (I) des CPSI évoqués dans NcLCR (contrôle ; noir), après l'application du baclofène (100 μ M ; bleu) et après l'application de la CGP (2 μ M ; rouge). J ; la boîte à moustaches des amplitudes des CPSI avant et après l'application du baclofène et de la CGP. Le baclofène réduit significativement les amplitudes des CPSI et cet effet a été complètement supprimé en présence de la CGP (contrôle : $-42,82 \pm 15,82$ pA ; baclofène : $-6,38 \pm 1,97$ pA ; CGP : $-50,78 \pm 30,12$ pA ; n=6 ; *P < 0,05 ; « Friedman/ Dunn post hoc multiple comparison test »).

Les R-GABA_B inhibent les courants postsynaptiques excitateurs évoqués dans les NcLCR

La présente étude s'est intéressée également à la caractérisation des courants postsynaptiques excitateurs (CPSE) évoqués dans les NcLCR. Nous rappelons que nos travaux précédents confirment que les NcLCR expriment les récepteurs AMPA/ Kainate du glutamate (des récepteurs ionotropiques) et que ces neurones ne reçoivent pas de terminaisons synaptiques excitatrices (Orts-Del'Imagine et al. 2016).

L'usage de la technique des stimulations électriques en présence de la gabazine (10 μ M), antagoniste spécifique des récepteurs GABA_A, et de la strychnine (1 μ M), antagoniste spécifique des récepteurs de la glycine, a induit des CPSE dans tous les NcLCR enregistré (figure VI.5 ; A). Ces courants ont été inhibés après l'application du DNQX (20 μ M) un antagoniste spécifiques des récepteurs AMPA/ Kainate du glutamate (figure VI.5 ; A-C). Aussi le potentiel de réversion est égal à $0,60 \pm 7,10$ mV (figure VI.5 ; D-E) ce qui est en adéquation avec le statut des récepteurs AMPA/ Kainate perméables à plusieurs cations. Ces informations démontrent que les CPSE évoqués électriquement dans les NcLCR, sont médiés par les récepteurs AMPA/ Kainate du glutamate.

L'application du baclofène (100 μ M) par bain réduit l'amplitude des CPSE évoqués dans les NcLCR enregistrés en potentiel imposé -60 mV. Cet effet est supprimé après l'application de la CGP ; l'agoniste spécifique des R-GABA_B (figure VI.5 ; F-H). Les résultats obtenus

démontrent pour la première fois que les NcLCR reçoivent des terminaisons excitatrices de type glutamatergique et que les R-GABA_B ont un effet inhibiteur sur la transmission synaptique excitatrice dans ces neurones.

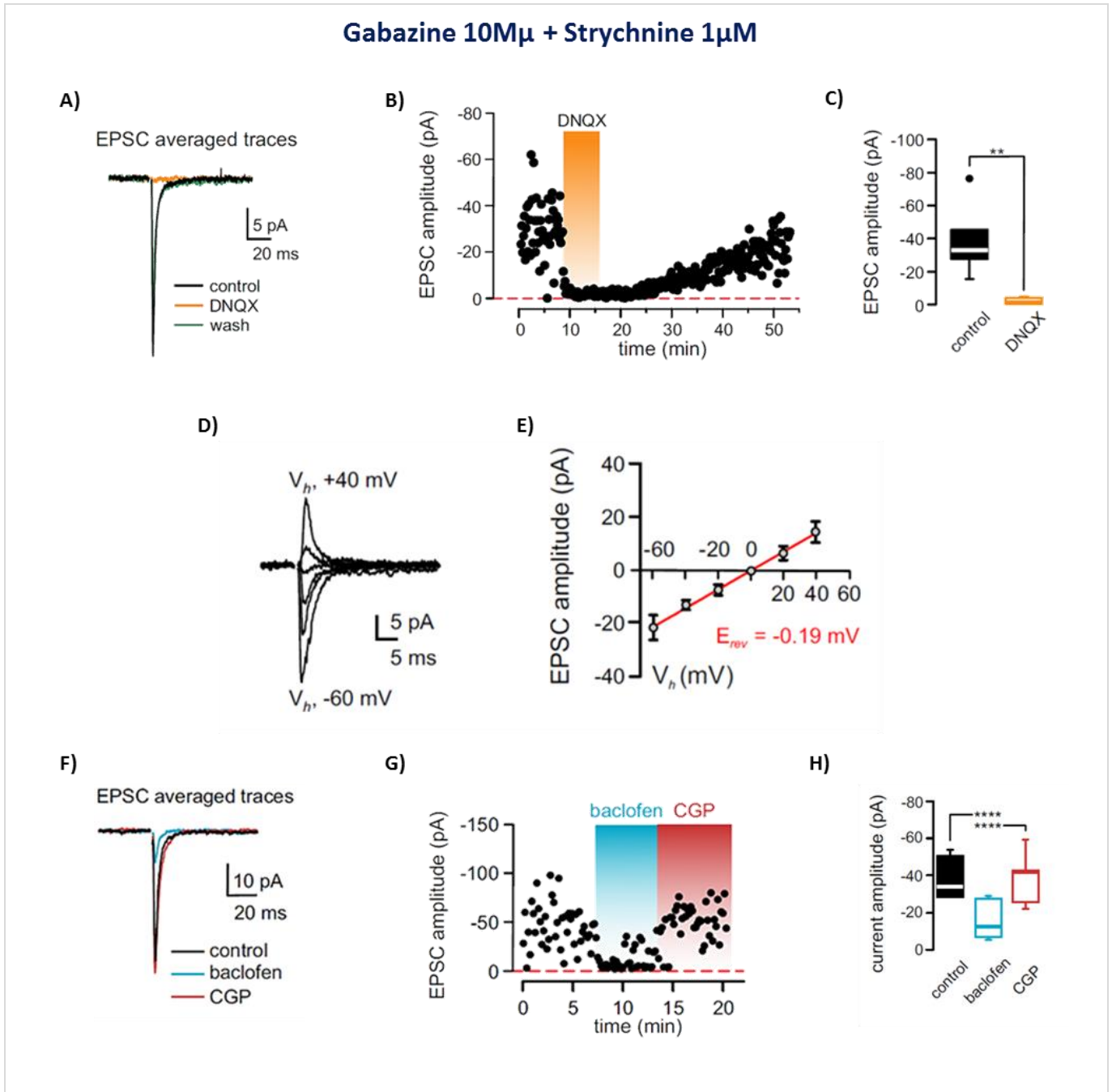


Figure VI.5: Effet du baclofène sur les CPSE évoqués dans les NcLCR

A ; courbes moyennes et B ; amplitudes en fonction du temps des CPSE évoqués dans NcLCR avant (noir) pendant (vert) et après (orange) l’application du DNQX (10 μ M). C ; la boîte à moustaches des amplitudes des CPSE avant et après l’application du DNQX. DNQX a un effet inhibiteur significatif sur les amplitudes des CPSE : $-38,43 \pm 19,51$ pA dans les contrôles (noir) et $-1,57 \pm 1,91$ pA en présence du DNQX (orange) ; n=7 ; **P < 0,01 (Test t de

Figure VI.6: Effet du baclofène sur les CPSE évoqués dans les NcLCR (suite) : Student pour deux échantillons appariés). D ; traces moyennes des CPSE en réponse à l'application des sauts de potentiel partant de -60 mV à +40 mV avec un écart de 20 mV. E; la moyenne des pic des amplitudes des CPSE en fonction du potentiel de maintien. E_{rev} est indiqué par le point d'intersection de cette courbe avec l'axe des abscisses. F-G ; courbes moyennes (F) et amplitudes en fonction du temps (G) des CPSE évoqués dans NcLCR (contrôle ; noir), après l'application du baclofène (100 μ M ; bleu) et après l'application de la CGP (2 μ M ; rouge). J ; la boîte à moustaches des amplitudes des CPSE avant et après l'application du baclofène et de la CGP. Le baclofène réduit significativement les amplitudes des CPSE et cet effet a été complètement supprimé en présence de la CGP (contrôle : $-37,96 \pm 10,64$ pA ; baclofène : $-14,86 \pm 9,79$ pA ; CGP : $-37,59 \pm 12,99$ pA ; n=7 ; *P < 0,0001 ; « repeated measures ANOVA/ Tukey post hoc multiple comparison test »).

Implication des R-GABA_B présynaptiques dans l'inhibition des transmissions synaptiques inhibitrices et excitatrices

Nous avons localisé la position des récepteurs R-GABA_B impliqués dans l'inhibition des CPSI et CPSE évoqués dans les NcLCR. Dans ce but, nous avons utilisé le protocole « paired-pulse » (figure V.8 ; B ; page 98) qui consiste à effectuer deux stimulations de 50 à 60 V d'une durée de 100 μ s chacune. Les deux stimulations séparées par 70 ms.

Ensuite, nous avons comparé le rapport « paired-pulse ratio » (PPR) avant, pendant et après l'application du baclofène et de la CGP. Le PPR est calculé à partir de l'amplitude du deuxième courant postsynaptique / sur l'amplitude du premier courant postsynaptique.

En potentiel imposé -60 mV, le baclofène (20 μ M) appliqué par bain augmente significativement le PPR dans le cas des CPSI et CPSE. La CGP (2 μ M) supprime l'effet du baclofène sur les CPSI et les CPSE (figure VI.6).

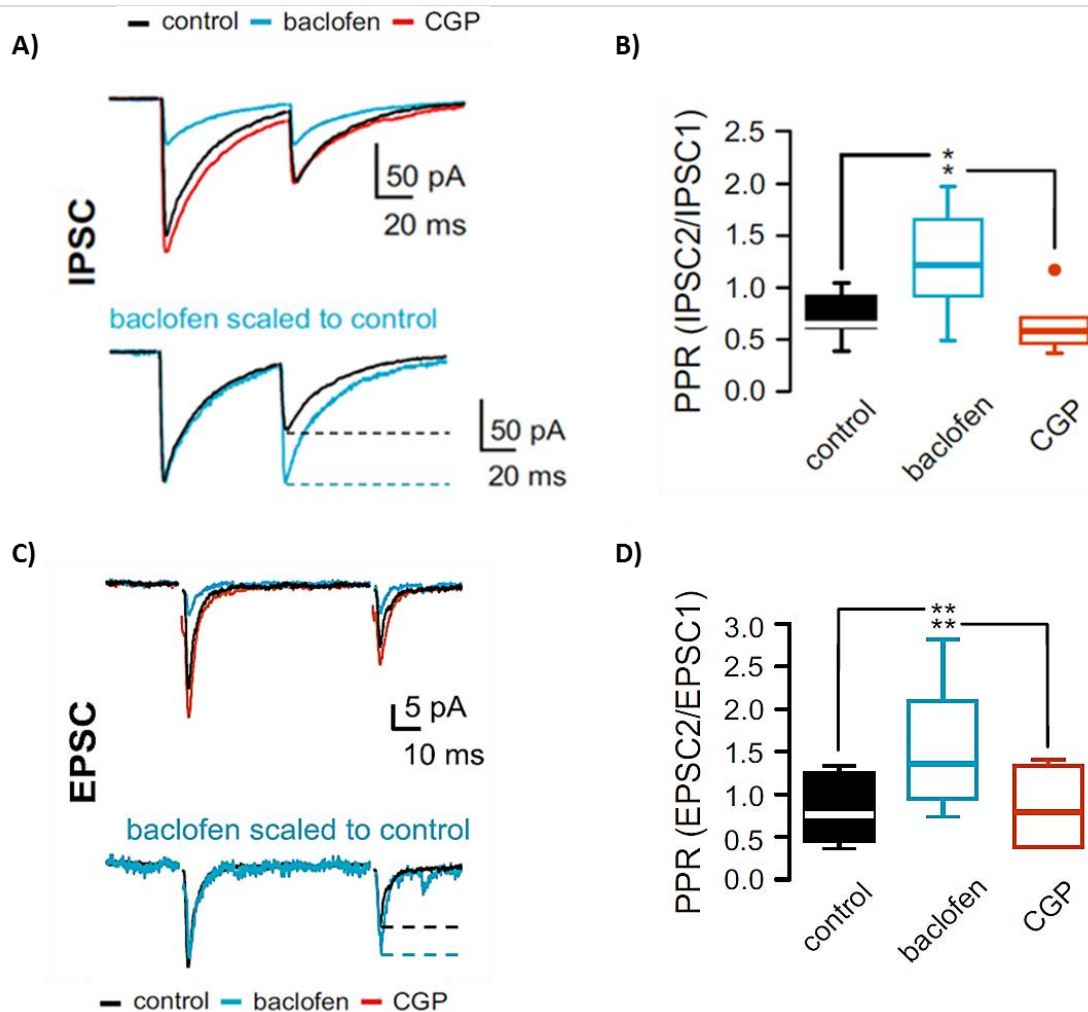


Figure VI.6 Baclofène augmente le PPR dans les CPSI et CPSE

A ; En haut, courbe moyenne des CPSI évoqués par deux stimulations paired-pulse séparés de 70 ms, avant (noir) et après l'application du baclofène (20 μ M ; bleu) ou le CGP (2 μ M ; rouge). Ces CPSI ont été enregistrés dans des NcLCR en potentiel imposé -60 mV, en présence du DNQX (20 μ M) et de la strychnine (1 μ M). En bas, des CPSI évoqués en absence (noir) et en présence du baclofène (20 μ M ; bleu) qui ont été mis à l'échelle de la première réponse. B ; une boîte à moustaches qui montre que le baclofène augmente le PPR dans les CPSI et son effet est inhibé par la CGP (contrôle : $0,72 \pm 0,23$, n=7 ; baclofène : $1,22 \pm 0,50$, n=5 ; CGP : $0,65 \pm 0,26$; n=7 ; *P< 0,05 ; « repeated measures ANOVA/ Tukey post hoc multiple comparison test »). C ; En haut, courbe moyenne des CPSE évoqués par deux stimulations paired-pulse séparés de 70 ms, avant (noir) et après l'application du baclofène (20 μ M ; bleu) ou le CGP (2 μ M ; rouge). Ces CPSE ont été enregistrés dans des NcLCR en potentiel imposé -60 mV, en présence de la gabazine (10 μ M) et de la strychnine (1 μ M). En bas, des CPSE évoqués en absence (noir) et en présence du baclofène (20 μ M ; bleu) qui ont été mis à l'échelle de la première réponse. D ; une boîte à moustaches qui montre que le baclofène augmente le PPR dans les CPSE et son effet est inhibé par la CGP (contrôle : $0,85 \pm 0,40$, n=7 ; baclofène : $1,52 \pm 0,73$, n=7 ; CGP : $0,86 \pm 0,43$; n=7 ; *P< 0,01 ; « repeated measures ANOVA/ Tukey post hoc multiple comparison test »).

Afin de s'assurer que l'inhibition est médiée par des R-GABA_B présynaptiques, nous avons étudié l'effet du baclofène sur la cinétique des CPSI et CPSE, induits respectivement par les récepteurs GABA_A et AMPA/ Kainate postsynaptiques. Les résultats montrent que le baclofène (20 μ M) n'a aucun effet sur le temps de déclin (*decay time*) ou 10 - 90% le temps de remontée (10 - 90% *rise time*) des CPSI (figure VI.8 ; A-B) et des CPSE (figure VI.8 ; C-D). En conclusion, nos résultats confirment que les transmissions synaptiques inhibitrices et excitatrices sont inhibées via des récepteurs GABA_B présynaptiques.

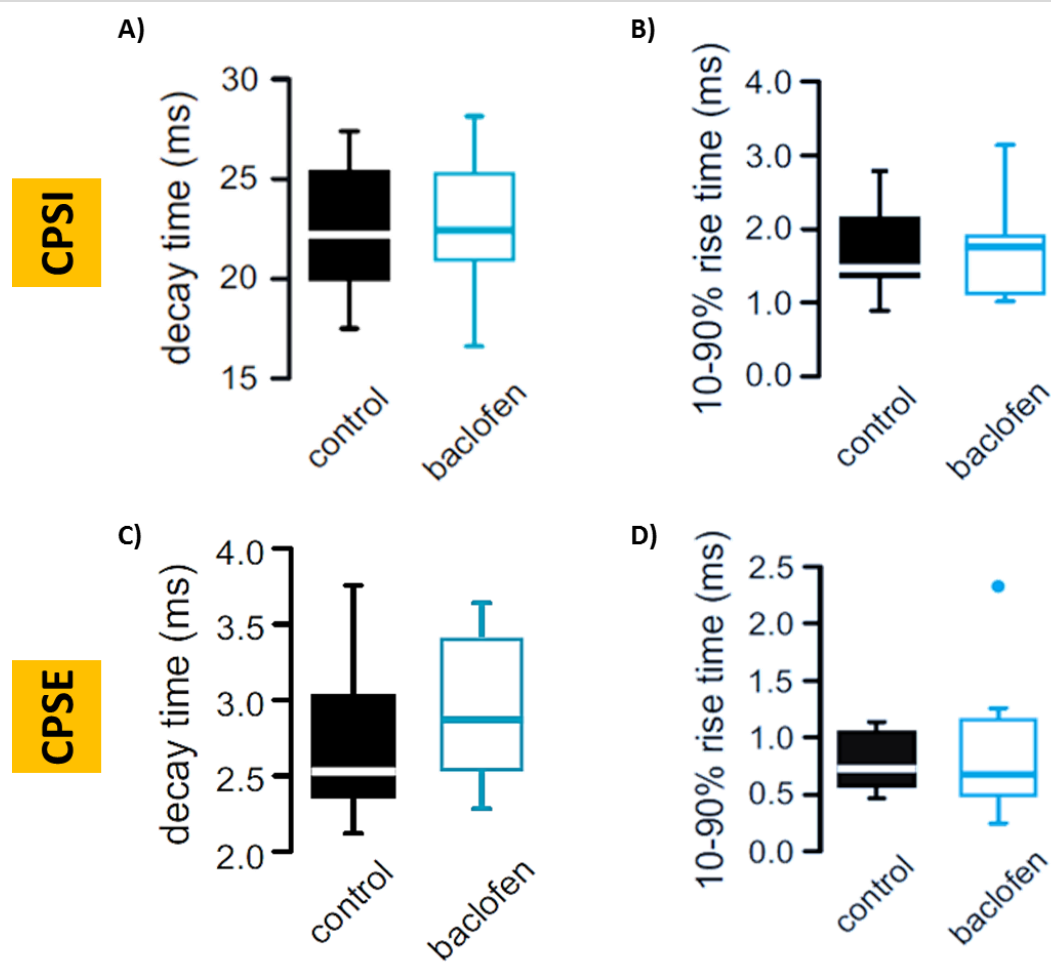


Figure VI.7 Effet du baclofène sur la cinétique des CPSI et CPSE

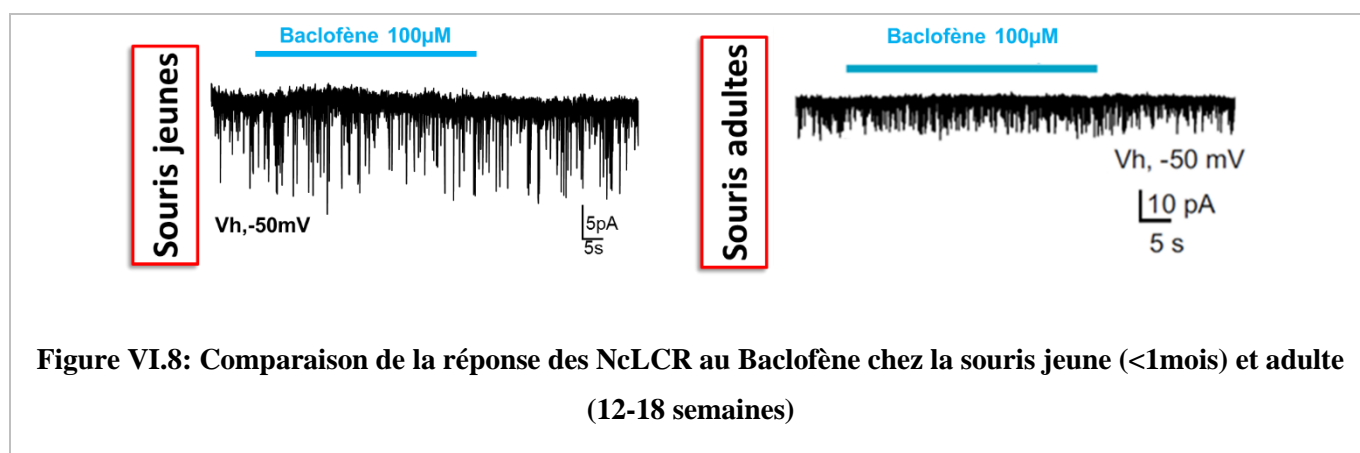
A – B ; les boîtes à moustaches de l'effet du baclofène sur la cinétique des CPSI. A ; le baclofène n'a aucun effet sur le temps de déclin des CPSI (contrôle : $22,35 \pm 3,01$ ms, n=11 ; baclofène 20 μ M : $23,07 \pm 3,26$ ms ; P= 0,5305 ; Test t de Student pour deux échantillons appariés). B ; le baclofène n'a pas d'effet significatif sur 10-90% le temps de remontée des CPSI (contrôle : $1,68 \pm 0,55$ ms, n=11 ; baclofène 20 μ M : $1,68 \pm 0,63$ ms, n=11 ; P= 0,9810 ; Test t de Student pour deux échantillons appariés). C ; le baclofène n'a aucun effet sur le temps de déclin des CPSE (contrôle : $2,71 \pm 0,50$ ms, n=9 ; baclofène 20 μ M : $2,82 \pm 0,48$ ms, n=9 ; P= 0,6106 ; Test t de Student pour deux échantillons appariés). D ; le baclofène n'a pas d'effet significatif sur 10-90% le temps de remontée des CPSE (contrôle : $0,79 \pm 0,25$ ms, n=9 ; baclofène 20 μ M : $0,89 \pm 0,63$ ms, n=9 ; P= 0,6065 ; Test t de Student pour deux échantillons appariés)

Mise en évidence de différences fonctionnelles dans les neurones de contact chez la souris jeune et âgée

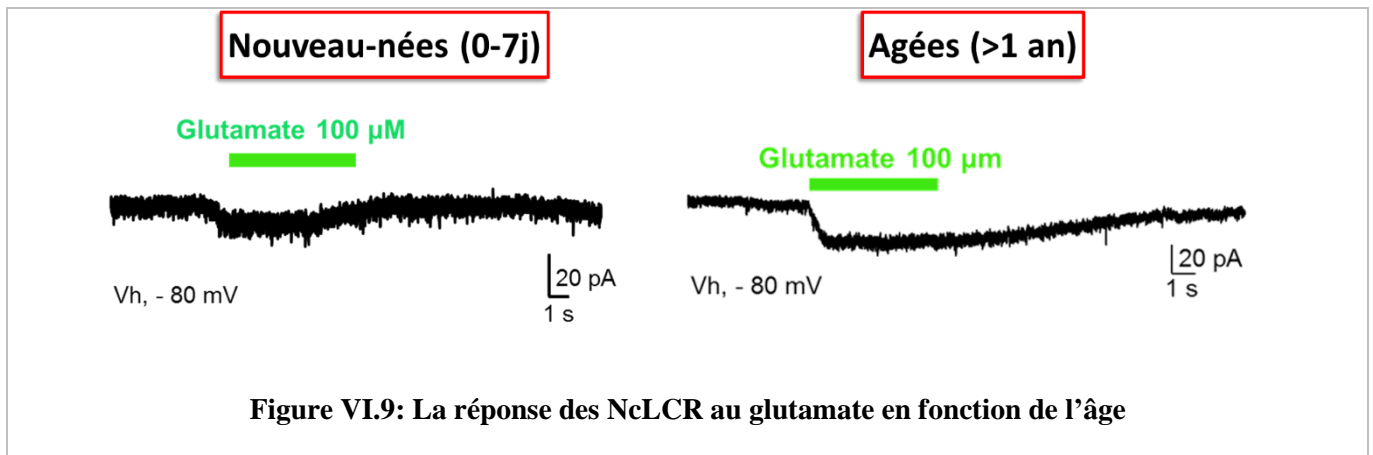
De plus des résultats cités ci-dessus, nous avons étudié quelques propriétés fonctionnelles des NcLCR chez des souris de différents âges.

Dans les mêmes conditions que chez la souris adultes (8 à 12 semaines), nous avons appliqué du baclofène 100 μ M en potentiel de maintien -50 mV afin de mesurer la réponse des NcLCR au baclofène chez des souris jeunes de moins d'un mois.

Les résultats présentés dans la figure ci-après (figure IV.8), montrent que le baclofène n'a aucun effet sur les NcLCR chez la souris jeune. A conclure que le baclofène n'active pas la voie KIR3 chez les souris jeunes comme chez les adultes.



Les NcLCR expriment également les récepteurs AMPA/Kainate du glutamate (récepteurs ionotropes). Chez la souris adulte, l'application du glutamate 100 μ M induit un courant entrant, en mode potentiel imposé -80 mV (figure II.18 ; page : 33). Afin de vérifier l'effet de l'âge sur la réponse au glutamate (100 μ M), nous avons utilisé des souris nouveaux-nés (0 à 7 jours) et des souris âgées de plus d'un an (figure VI.9).



Comme dans le cas du baclofène, la réponse équivalente du glutamate chez les souris jeunes et âgées. Ces résultats indiquent que l'âge n'a aucun effet sur les propriétés fonctionnelles des NcLCR.

VII. DISCUSSION GENERALE DES RESULTATS

La thématique développée dans cette thèse s'insère dans le cadre d'un projet de recherche portant sur la caractérisation fonctionnelle des NcLCR bulbo-spinaux assuré par le laboratoire « Physiologie et physiopathologie du système nerveux somatomoteur et neurovégétatif » (PPSN) à Marseille. La structure de recherche a pour thématique principale la régulation de la prise alimentaire. Il faut rappeler dans ce sens, que cette régulation se fait via deux structures cérébrales aussi importantes l'une que l'autre. Il s'agit tout d'abord de l'hypothalamus, première structure cérébrale identifiée comme tel depuis les années 1950. Ce contrôle implique des neurones du premier ordre localisés principalement au niveau du noyau arqué d'autres neurones localisés dans les noyaux paraventriculaire et ventromédian, voire au niveau de l'aire latérale. Les neurones du noyau arqué par leur position anatomique au niveau ventral de l'hypothalamus sont sensibles aux taux circulants de l'insuline et de la leptine atteignant l'éminence médiane. L'hypothalamus est impliqué principalement dans la régulation à long terme de la prise alimentaire et est donc impliqué dans la régulation du poids corporel. Des études ultérieures ont pointé ensuite le rôle joué par le tronc cérébral et plus précisément par le complexe vagal dorsal situé au niveau du bulbe rachidien, qui possède des afférences vagues le renseignant sur le bol alimentaire. Il est impliqué essentiellement dans la régulation à court terme de la prise alimentaire (faim-satiété). Les travaux du laboratoire PPSN ont considérablement contribué à la compréhension du fonctionnement du CVD dans le cadre de la régulation de la prise alimentaire à travers l'élucidation des mécanismes sous tendant ladite régulation. Ces dernières années, le laboratoire s'est attelé à étudier des composantes neuronales spéciales présentes au niveau du CVD pour asseoir leur rôle éventuel dans cette régulation. Il s'agit des NcLCR situés particulièrement au niveau du canal central. C'est dans ce cadre précis, que s'insère le sujet de cette thèse.

Des travaux précédents du laboratoire ont étudié différents modulateurs ionotropiques des NcLCR et ont montré que l'excitabilité dans les NcLCR est régulée par les canaux PKD2L1 et ASIC, alors que l'inhibition implique des récepteurs ionotropiques GABA_A et glycinergiques (Orts-Del'immagine et al. 2012; Orts-Del'immagine et al. 2016). Ainsi, si le rôle inhibiteur du GABA s'exerçant à travers son action via le complexe récepteur GABA_A, aucune étude ne s'est intéressée à la régulation par la voie métabotrope impliquant les récepteurs GABA_B du GABA, en dépit de son éventuelle implication dans la régulation de la prise alimentaire. Il s'agit donc de l'essentiel de mon travail de thèse qui vise à étudier pour la première fois, l'implication d'une voie de modulation métabotrope des NcLCR. En analysant la contribution des

récepteurs métabotropiques GABA_B dans la régulation des NcLCR, nous avons tout d'abord pu montrer l'expression des R-GABA_B fonctionnels sur la membrane des NcLCR, pour la première fois chez la souris. Dans les NcLCR, les récepteurs GABA_B n'activent pas les canaux KIR3 mais, ayant utilisé des approches électrophysiologiques, notre étude montre également, que les récepteurs GABA_B présynaptiques sont situés sur les terminaisons GABAergique et glutamatergique et inhibent la libération du GABA et du glutamate vers les NcLCR.

Les NcLCR expriment le récepteur GABA_B fonctionnel

Nos résultats obtenus en immunofluorescence confirment que les NcLCR expriment la sous-unité GABA_{B1} des R-GABA_B. Il est bien documenté que les récepteurs GABA_B sont hétérodimères et ne sont fonctionnels qu'en présence des deux sous-unités (Bettler et al. 2004; Robbins et al. 2001). Il serait donc important de démontrer que les NcLCR expriment également la sous-unité GABA_{B2}. En fait, nous avons tenté de démontrer cette existence en immunofluorescence en utilisant un anticorps anti GABA_{B2} dans les NcLCR-GFP+. Malheureusement cette approche est difficile à réaliser techniquement car après maints essais nous n'avons pas pu mettre au point le protocole adéquat pour réussir un double marquage GABA_{B2}/EGFP au niveau du tronc cérébral.

Toutefois, les R-GABA_B des NcLCR sont fonctionnels suggérant leur existence sous forme d'hétérodimère. En effet, des travaux dans notre laboratoire ont prouvé l'existence d'un couplage entre les récepteurs GABA_B et les canaux Ca²⁺ de type N (Cav2.2) présents dans les NcLCR (voir Jurčić et al., 2018 page 105). Ceci implique que les R-GABA_B présents sur la membrane des NcLCR sont fonctionnels et implicitement sont sous forme d'hétérodimères : composé des deux sous-unités GABA_{B1} et GABA_{B2}.

Les récepteurs GABA_B ne sont pas couplés aux KIR3 dans les NcLCR

Nos résultats montrent la présence d'une propriété atypique des récepteurs GABA_B dans la mesure où la technique d'immunofluorescence a fait état de la présence de ce type de récepteurs sur les membranes des NcLCR, mais par la technique de patch clamp, il n'a pas été possible de mettre en évidence la présence de couplage entre le récepteur GABA_B et les canaux KIR3 dans les NcLCR.

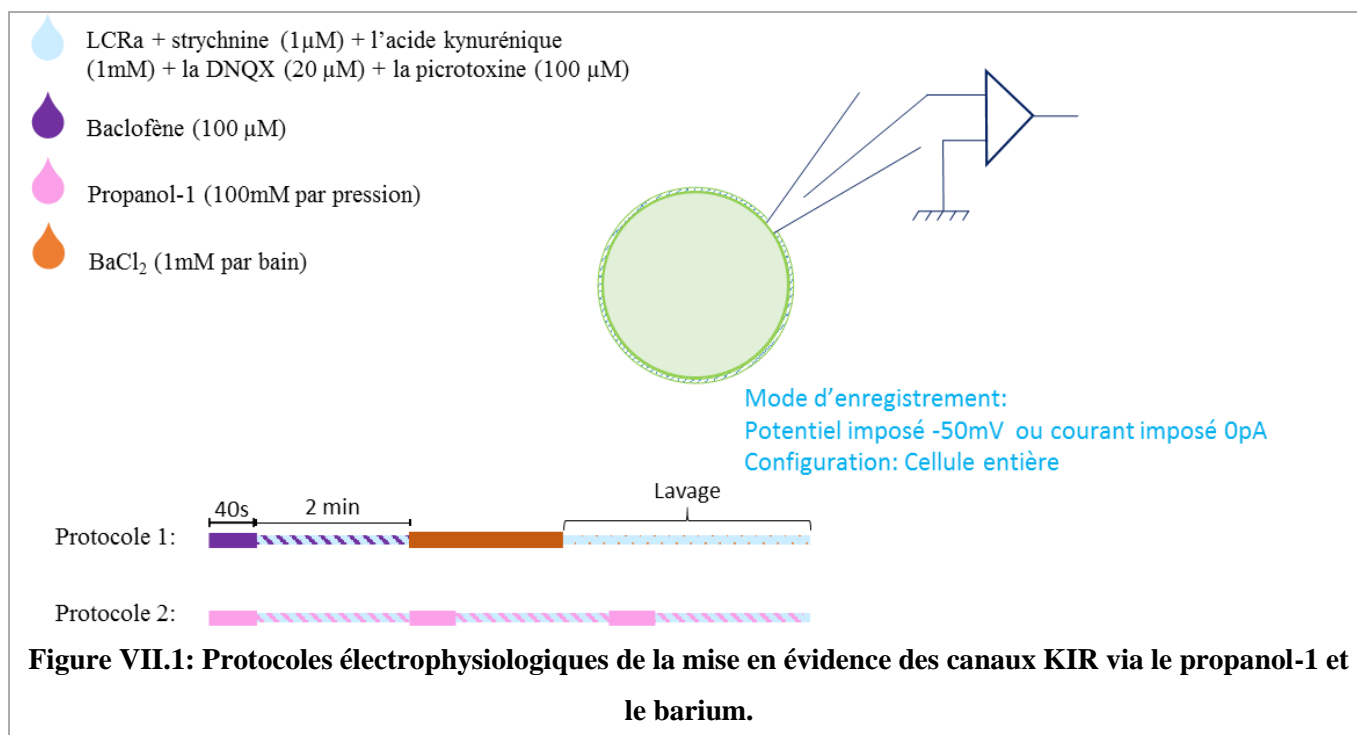
Il est maintenant bien établi que les récepteurs GABA_B postsynaptiques génèrent une inhibition lente en activant les canaux KIR3 (Fernández-Alacid et al. 2009; Liu et al. 2012). Cependant, la technique du patch-clamp a révélé que l'application du baclofène, un agoniste du récepteur GABA_B, n'a eu aucun effet sur les NcLCR enregistrés. Alors que dans d'autres

neurones du tronc cérébral, tels que les neurones du noyau dorso-médian du vague : DMNX, au niveau du complexe vagal dorsal, nous avons observé une réponse typique des R-GABA_B telle qu'elle est décrite dans la littérature (Browning et Travagli 2001). En mode potentiel imposé, le baclofène induit des courants sortants tandis qu'en mode courant imposé, il induit une hyperpolarisation. Ces réponses sont dues à l'activation des canaux KIR3 par le R-GABA_B. Ce contrôle réalisé sur les neurones du noyau DMNX, nous a permis de vérifier la rigueur de nos enregistrements en patch clamp.

Il faut préciser également que tous ces enregistrements ont été réalisés dans des conditions favorisant l'enregistrement des courants de potassium. En présence de strychnine et de DNQX respectivement inhibiteurs des récepteurs de la glycine et AMPA / kainate du glutamate.

Ces données impliquent que les R-GABA_B présents sur la membrane des NcLCR sont fonctionnels mais n'activent pas la voie de signalisation dépendante de l'effecteur KIR.

L'absence du couplage entre le GABA_B et KIR3 peut être expliquée par l'absence des canaux KIR3 dans ces neurones. Cela pourrait être vérifié par immunohistofluorescence mais cette voie reste complexe à réaliser vu la diversité des canaux KIR 3 (KIR 3.1 ; KIR 3.2 ; KIR 3.3). En patch clamp, nous pouvons appliquer des alcools comme l'éthanol ou encore le propanol-1 qui favorisent l'ouverture des canaux KIR et/ou le barium conduit à leur blocage (Browning and Travagli 2001). Nous avons conçu le protocole illustré dans la figure suivante (figure V.1).



Des résultats préliminaires de l'application du barium (1 mM) confirment l'hypothèse de l'absence des canaux KIR3 dans les NcLCR.

Les R-GABA_B postsynaptiques sont exprimés dans le cerveau à la naissance mais ils n'activent pas les canaux GIRK pendant les premiers jours de la vie (Gaiarsa et Porcher 2013). Chez les rongeurs, la voie de signalisation dépendante des canaux GIRK n'est établie qu'après la première semaine postnatale (Luhmann et Prince 1991; Gaiarsa et al. 1995) voire plus tard entre la troisième et la cinquième semaine postnatale (Nurse et Lacaille 1999; Lei et McBain 2003).

Nos expériences ont été menées chez des souris adultes âgées de 8 à 12 semaines. A ce stade de développement, nous pourrions nous attendre à un système neuronal mature où devraient s'exprimer à la fois KIR3 et une voie régulation G protéine dépendante complète. Les récepteurs GABA-B sont fonctionnels puisqu'ils induisent une inhibition des courants calciques via une protéine G. Il est donc probable qu'à ce stade adulte, l'expression de KIR3 soit faible, ce qui reste surprenant. Cependant, il a été démontré que les NcLCR présentent un état de maturité très particulier. Ces neurones sont matures et immatures à la fois, et seraient donc en état de « stand-by » (Marichal et al. 2009). En effet, les NcLCR expriment les marqueurs de maturité mais ils continuent également à exprimer des marqueurs d'immaturité tels que la double cortine ou des protéines Nkx6.1 (Petracca et al. 2016). D'autres critères électrophysiologiques confirment l'état de maturité dans les NcLCR, tels que leur potentiel de repos assez élevé (-50 mV) et leur forte

résistance d'entrée (3 à 6 G Ω) (Orts-Del'immagine et al. 2012, 2014; Orts-Del'Immagine et al. 2017).

Il a été démontré que l'inhibition des GIRK réapparaît dans les neurones matures (Gonzalez et al. 2018; Mongiat et al. 2009). Nous pouvons donc, déduire que la persistance d'un état d'imaturité dans les NcLCR pourrait expliquer fortement l'absence d'une réponse médiée par les canaux GIRK dans ces neurones. A savoir que les conditions physiologiques ainsi que les mécanismes impliqués dans le développement des NcLCR restent ambigus. Pourtant, si il a été démontré que l'expression de la maturité complète des NcLCR, est concomitante avec l'inhibition médiée par les canaux GIRK, cela peut entraîner des modifications considérables aux propriétés d'excitabilité de ces neurones (Mongiat et al. 2009). Curieusement, dans les régions cérébrales en développement où il a été démontré que les R-GABA_B ne modulent pas l'excitabilité des neurones via la voie GIRK, il a été prouvé que ces récepteurs activent des voies de signalisation impliquées dans les processus du développement neuronal (Bony et al. 2013; Gaiarsa et Porcher 2013; Giachino et al. 2014). Nous pouvons donc suggérer que les R-GABA_B pourraient être impliqués dans les processus de maturité des NcLCR, mais d'autres études plus approfondies sont nécessaires afin de tester cette hypothèse.

Enfin, il faut noter que les NcLCR spinaux issus de jeunes rats postnataux génèrent des réponses GABA_A dépolarisantes (Marichal et al. 2009), ce qui renforce l'idée que les NcLCR conservent une immaturité fonctionnelle dans leur système de signalisation GABAergique. Cependant, nous ignorons si l'effet dépolarisant des récepteurs GABA_A persiste dans les NcLCR chez les animaux adultes.

Les récepteurs GABA_B bloquent la libération du GABA et du glutamate sur les NcLCR.

Les résultats obtenus montrent que l'activation des récepteurs GABA_B inhibe la transmission GABAergique. Les courants postsynaptiques inhibiteurs (CPSI) évoqués électriquement, sont inhibés par le baclofène. Cet effet est supprimé par une application du CGP, confirmant que l'inhibition est due à une activation des R-GABA_B. Deux hypothèses non exclusives : effet du baclofène est soit post-synaptique soit présynaptique soit les deux.

En utilisant le protocole « paired-pulse », l'application du baclofène (agoniste spécifique du GABA_B) augmente le rapport des amplitudes de deux stimulations successives évoquées électriquement (PPR) (voir figure IV.8, page 98). Un PPR plus élevé, signifie que l'amplitude de la deuxième réponse évoquée est plus grande que la première. Et inversement le taux de libération

du neurotransmetteur est affaibli. Ceci rejoint les données rapportées par plusieurs études similaires concernant une multitude de neurotransmetteurs. Ainsi, lorsque la deuxième réponse évoquée dans un neurone est d'une grande amplitude par rapport à la première, nous avons une « facilitation » ce qui signifie une diminution de la probabilité de libération des neurotransmetteurs (Manabe et al. 1993; Wilcox et Dichter 1994; Fioravante et Regehr 2011).

Cette modification du PPR, nous informe également que le site d'action du baclofène est situé présynaptiquement. Donc, cet effet inhibiteur sur la transmission synaptique dans les NcLCR est très probablement dû à l'activation des R-GABA_B situés au niveau présynaptique. Ces récepteurs engendrent une altération du mécanisme de libération des neurotransmetteurs dans plusieurs régions cérébrales (Pinard et al. 2010). Les R-GABA_B sont connus pour inhiber l'entrée du Ca²⁺ impliqué dans le phénomène de l'exocytose.

Les NcLCR reçoivent des courants synaptiques inhibiteurs de type GABAergique et glycinergique (Orts-Del'Immagine et al. 2012). L'ensemble de nos enregistrements ont été réalisés en présence de strychnine. Nous admettons donc que les CPSI enregistrés sont GABAergiques, ceci a été confirmé via une application de la picrotoxine, un antagoniste du récepteur GABA_A.

En résumé, nos résultats approuvent que les GABA_B bloquent la libération du neurotransmetteur GABA au niveau présynaptique des NcLCR.

Les R-GABA_B ne sont pas que des autorécepteurs, des études antérieures ont montré que le baclofène réduit la libération de différents neurotransmetteurs dont le glutamate (Enna and McCarson 2006). Des études réalisées dans le laboratoire de Marseille, ont par ailleurs examiné ceci dans les NcLCR. Ils ont démontré que les R-GABA_B inhibent les courants postsynaptiques excitateurs (CPSE) glutamatergiques et bloquent également sa libération (Jurčić et al., 2018 (voir Annexes)). Cette réponse est inhibée en présence du DNQX, antagoniste des récepteur AMPA / kaïnate préalablement identifiés dans les NcLCR (Orts-Del'Immagine et al. 2016).

En conclusion, les récepteurs GABA_B présynaptiques sont situés sur les terminaisons GABAergiques et glutamatergiques et leur activation inhibe la libération du GABA et du glutamate vers les NcLCR. Ceci implique que les R-GABA_B présynaptiques sont fonctionnels et participent à la modulation de l'activité synaptique des NcLCR.

Caractérisation postsynaptique des récepteurs NPY dans les NcLCR

L'étude du GABA_B a été la première étape dans la caractérisation métabotrope des NcLCR car nous avons en perspective d'étudier d'autres récepteurs métabotropiques dont les récepteurs neuropeptide Y (NPY). Le neuropeptide Y, NPY est un neurotransmetteur peptidique connu par son rôle orexigène dans la régulation de la prise alimentaire. En plus d'autres implications du NPY ont été citées dans la littérature telles que son rôle dans la dépression, le stress, la nociception ou encore l'addiction. Il est intéressant de noter dans ce sens que la présence du NPY circulant dans le LCRA a été rapportée auparavant (tableau I.2., page 11), et nous suggérons donc que les NcLCR peuvent être sensibles au NPY. Une lignée de souris transgéniques Y1-EGFP (*référence gensat: Tg(Npy1r-EGFP)EK65Gsat*) a été générée et où les NcLCR expriment fortement le récepteur Y1 du NPY (voir <http://www.gensat.org/imagenavigator.jsp?imageID=34966>).

Ainsi comme les NcLCR expriment au moins un des récepteurs du NPY, il reste donc à savoir s'ils sont fonctionnels. Il faut noter aussi que les récepteurs du NPY et du R-GABA_B ont le même mode d'action. Ils font partie des récepteurs couplés à une protéine Gi/o (à la fois activatrice et inhibitrice). Ils sont des récepteurs à rectification entrante pour le canal potassium, ils activent le canal potassium et inhibent le canal calcique.

Par conséquent, nous avons conservé le même protocole du patch-clamp, et nous avons appliqué un agoniste du NPY à spectre large afin de cibler tous les récepteurs du NPY.

Les résultats préliminaires au niveau postsynaptique, ont révélé soit une faible réponse ou une absence totale de réponse au NPY!! Cette réponse ne s'était pas améliorée même en ajoutant du GTP au milieu intracellulaire (figure VII.2).

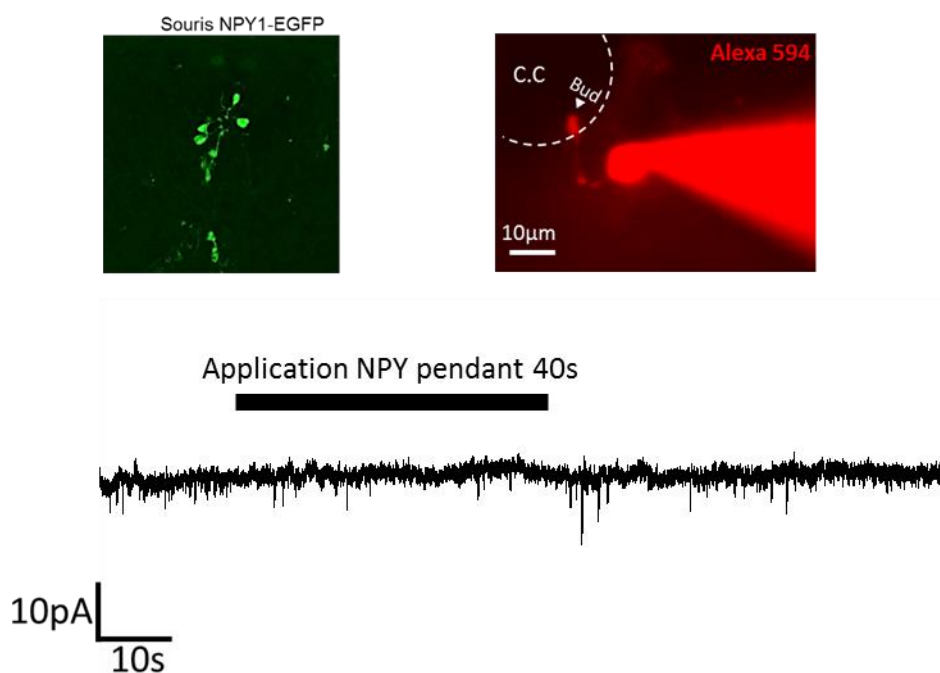


Figure VIIV.VII.2: Résultat préliminaires de la caractérisation postsynaptique des récepteurs NPY

Le NPY n'a pas d'effet sur les neurones contactant le LCR. ($V_h = -50\text{mV}$; NPY à $100\ \mu\text{M}$)

Il va falloir reproduire les tests au niveau postsynaptique, afin d'augmenter le nombre d'échantillons. Il faudra également évaluer l'existence d'un effet du NPY au niveau présynaptique des NcLCR, en effectuant des potentiels électriques évoqués. Ensuite, il faudra affiner le mode opératoire en visant chacun des récepteurs du NPY, respectivement, pour identifier lesquels sont présents sur les NcLCR et/ou impliqués dans leur modulation.

En définitive, si nous vérifions l'existence d'un effet du NPY sur les NcLCR nous pouvons admettre l'hypothèse d'un éventuel rôle des NcLCR dans la régulation de la prise alimentaire.

VIII. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Nos résultats montrent que les NcLCR, possèdent des récepteurs GABA_B fonctionnels, bien que n'activant pas les canaux KIR3, comme dans le cas d'autres populations neuronales dans le tronc cérébral. De plus, des expériences menées dans notre laboratoire (PPSN) à Marseille, au niveau postsynaptique, ont montré l'inhibition des canaux calciques par le R-GABA_B. Présynaptiquement, le récepteur GABA_B est impliqué dans la modulation de la libération du GABA et du glutamate au niveau du NcLCR.

Il reste à savoir si le récepteur GABA_B joue un rôle physiologique dans les NcLCR.

La découverte des NcLCR dans le CVD, a ouvert un débat sur un rôle probable de ces neurones dans la régulation des fonctions autonomes et les pathologies qui y seraient associées. La position de ces neurones en contact avec le LCR ainsi que la fonction sensorielle qui leur a été attribuée font d'eux des candidats idéaux pour la détection des peptides gastro-intestinaux impliqués dans l'homéostasie énergétique (Orts-Del'immagine et al. 2012; Travagli 2012).

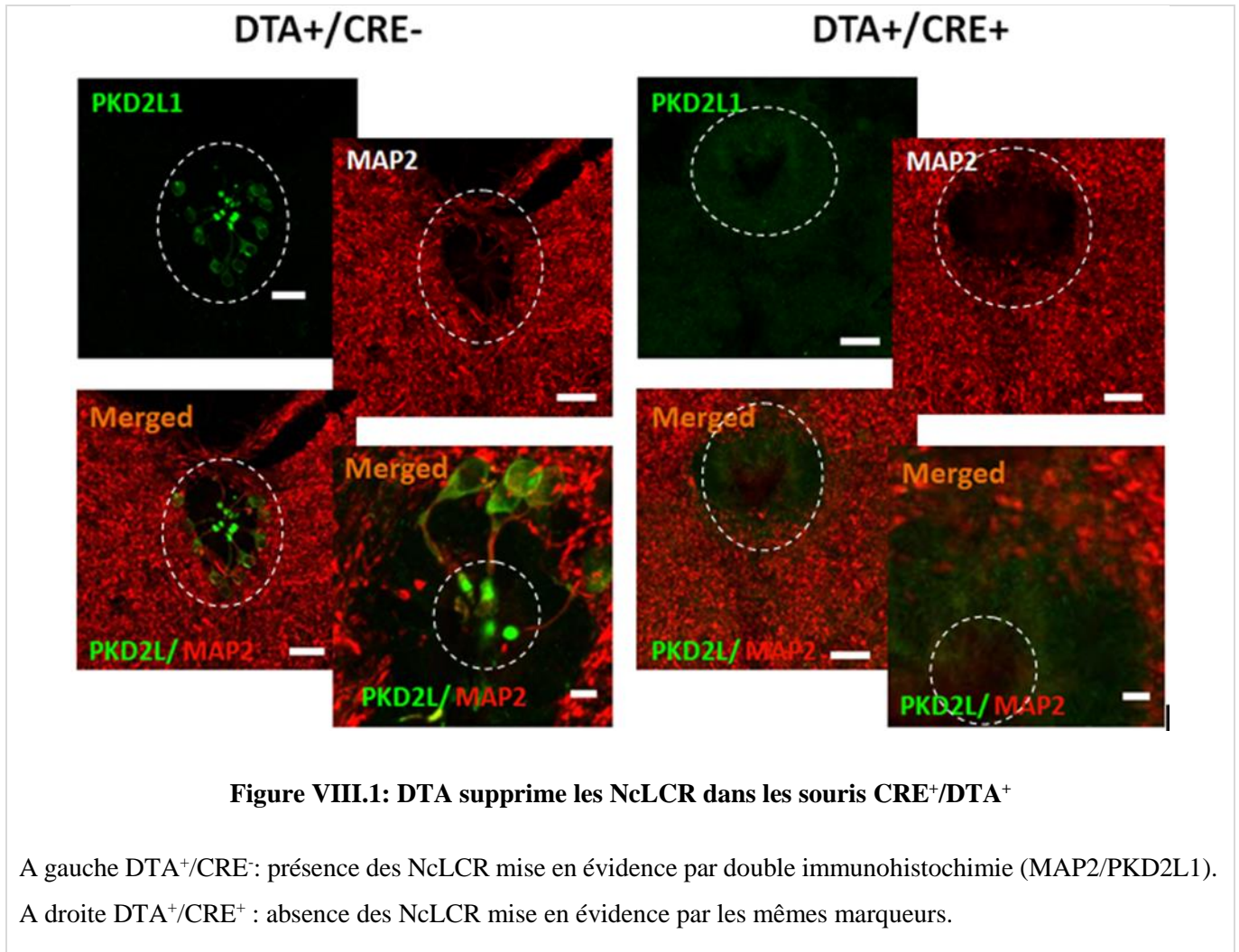
La découverte des récepteurs GABA_B dans ces neurones ne peut que renforcer cette hypothèse. Plusieurs recherches ont affirmé le rôle orexigène du baclofène dans la prise alimentaire via l'inhibition de l'effet de la leptine dans le noyau arqué (Bogatyrev et al. 2017; Mokhtarpouriani et al. 2016). Il serait alors tentant de suggérer un rôle des NcLCR dans la régulation de la prise alimentaire.

Cette nouvelle ligne de recherche pourra être développée en collaboration entre mon laboratoire d'accueil à Marseille (PPSN), spécialisé dans l'étude des NcLCR dans le tronc cérébral et mon laboratoire d'origine à Béni Mellal (Laboratoire Génie Biologique), qui s'intéresse à l'étude des comportements alimentaires.

Nous pouvons prévoir une approche électrophysiologique en évaluant la réponse des NcLCR et leurs récepteurs électrophysiologiques à l'application de la leptine, hormone anorexigène, et qui de surcroît est présente dans le LCR (tableau I.2 ; page 11). Il serait également pertinent d'utiliser l'approche immunohistochimique pour pouvoir mettre en évidence l'expression du récepteur OB de la leptine dans ces neurones.

Nous pouvons également adopter l'approche comportementale dans l'évaluation du rôle des NcLCR dans la prise alimentaire, en utilisant différents groupes transgéniques tels que les souris CRE⁺/DTA⁺ et les souris PKD2L1⁻.

Nous proposons ainsi une mesure directe de la prise alimentaire dans les souris CRE^+/DTA^+ . Ces souris auxquelles le gène CRE (*C-AMP Response Element-binding protein*) est incorporé (CRE^+) au niveau des cellules cibles, ici les NcLCR, ce qui permet après un traitement à la toxine diphtérique A (DTA) de conduire à une ablation totale de ce type cellulaire chez les souris DTA^+/CRE^+ ; comme le montre la figure ci-dessous (figure VIII.1).



Une comparaison de la prise alimentaire chez les souris CRE^+/DTA^+ et les souris sauvages peut nous informer sur la possible implication des NcLCR dans la régulation de la prise alimentaire. Aussi l'usage d'un autre groupe de souris PKD2L1 négatif peut confirmer si la régulation de la prise alimentaire par les NcLCR du CVD est liée au canal PKD2L1.

Nous pourrions mettre nos souris sous différents régimes. Par exemple des régimes gras qui favoriseront la production de la leptine afin de vérifier cette voie également (effet de la leptine dans les NcLCR) (figure VIII.2).

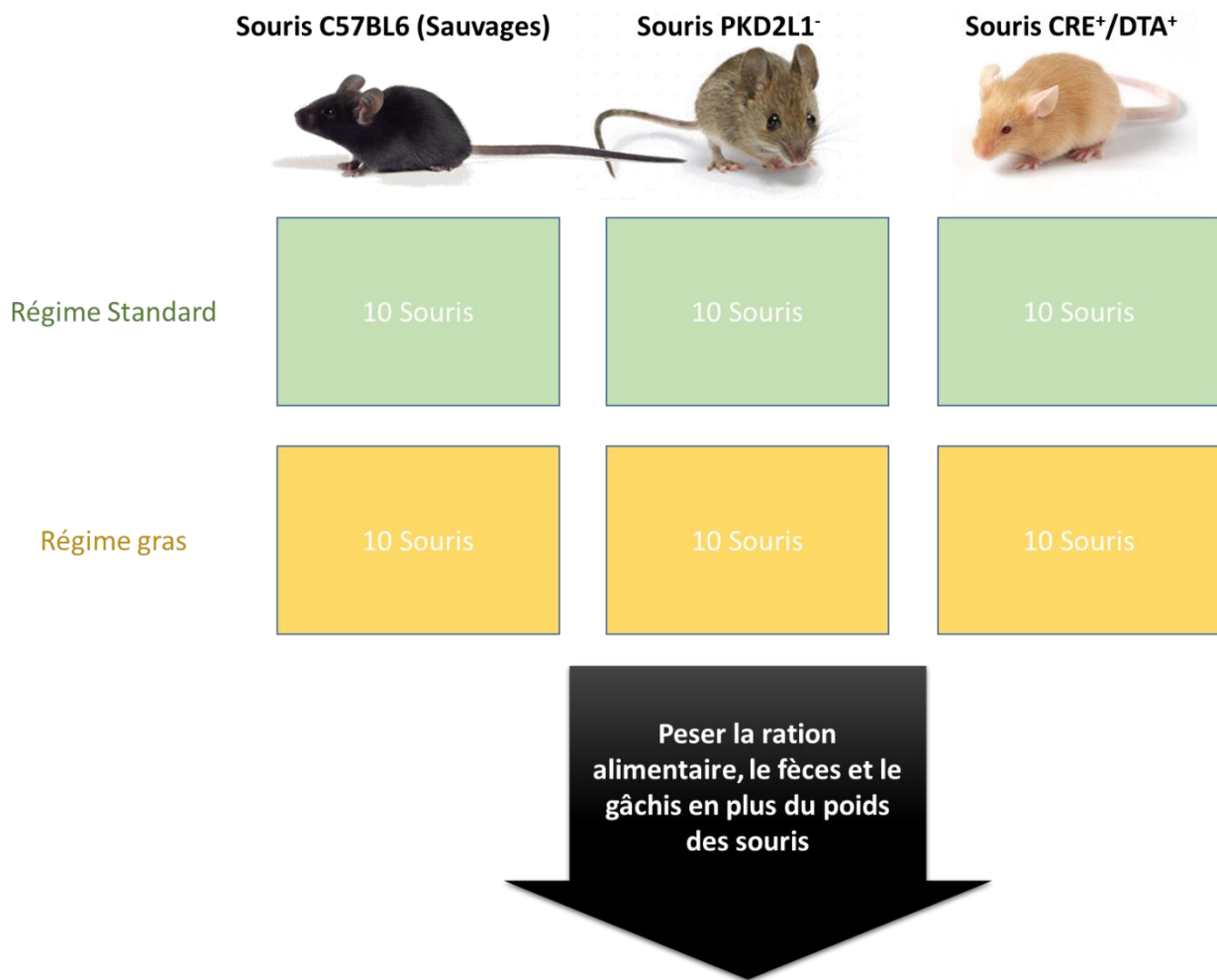


Figure VIII.2: Test pour évaluation du rôle des NcLCR dans la régulation de la prise alimentaire

Des souris mâles et femelles adultes âgées de 12 semaines environ issues de 3 lignées différentes : sauvages ; CRE/DTA positif et PKD2L1 négatif sont partagées en 2 groupes selon chaque lignée. Ensuite chaque groupe doit suivre un régime alimentaire standard ou gras et la prise alimentaire sera mesurée pendant 3-4 semaines.

IX. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Acerbo MJ, Hellmann B, Güntürkün O.** Catecholaminergic and dopamine-containing neurons in the spinal cord of pigeons: an immunohistochemical study. *J Chem Neuroanat* 25: 19–27, 2003.
- Addolorato G, Leggio L, Cardone S, Ferrulli A, Gasbarrini G.** Role of the GABA(B) receptor system in alcoholism and stress: focus on clinical studies and treatment perspectives. *Alcohol Fayettev N* 43: 559–563, 2009.
- Agnati LF, Zoli M, Strömberg I, Fuxe K.** Intercellular communication in the brain: wiring versus volume transmission. *Neuroscience* 69: 711–726, 1995.
- Aizawa M, Ito Y, Fukuda H.** Pharmacological profiles of generalized absence seizures in lethargic, stargazer and gamma-hydroxybutyrate-treated model mice. *Neurosci Res* 29: 17–25, 1997.
- Akhondzadeh S, Ahmadi-Abhari SA, Assadi SM, Shabestari OL, Kashani AR, Farzanehgan ZM.** Double-blind randomized controlled trial of baclofen vs. clonidine in the treatment of opiates withdrawal. *J Clin Pharm Ther* 25: 347–353, 2000.
- Alfaro-Cervello C, Soriano-Navarro M, Mirzadeh Z, Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM.** Biciliated ependymal cell proliferation contributes to spinal cord growth. *J Comp Neurol* 520: 3528–3552, 2012.
- Alibardi L, Meyer-Rochow VB.** Fine structure of regenerating caudal spinal cord in adult tuatara (*Sphenodon punctatus*). *J Hirnforsch* 31: 613–621, 1990.
- Alonso G.** Neuronal progenitor-like cells expressing polysialylated neural cell adhesion molecule are present on the ventricular surface of the adult rat brain and spinal cord. *J Comp Neurol* 414: 149–166, 1999.
- Amantea D, Bowery NG.** Reduced inhibitory action of a GABAB receptor agonist on [3H]-dopamine release from rat ventral tegmental area in vitro after chronic nicotine administration. *BMC Pharmacol* 4: 24, 2004.
- Anadón R, Adrio F, Rodríguez-Moldes I.** Distribution of GABA immunoreactivity in the central and peripheral nervous system of amphioxus (*Branchiostoma lanceolatum* Pallas). *J Comp Neurol* 401: 293–307, 1998.
- Anderson MJ, Waxman SG.** Neurogenesis in adult vertebrate spinal cord in situ and in vitro: a new model system. *Ann N Y Acad Sci* 457: 213–233, 1985.
- Andrén PE, Emmett MR, DaGue BB, Steulet AF, Waldmeier P, Caprioli RM.** Blood-brain barrier penetration of 3-aminopropyl-n-butylphosphinic acid (CGP 36742) in rat brain by microdialysis/mass spectrometry. *J Mass Spectrom JMS* 33: 281–287, 1998.
- Andriamampandry C, Taleb O, Kemmel V, Humbert J-P, Aunis D, Maitre M.** Cloning and functional characterization of a gamma-hydroxybutyrate receptor identified in the human brain. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 21: 885–895, 2007.

Arolfo MP, Zanudio MA, Ramirez OA. Baclofen infused in rat hippocampal formation impairs spatial learning. *Hippocampus* 8: 109–113, 1998.

Ashby CR, Rohatgi R, Ngosuwana J, Borda T, Gerasimov MR, Morgan AE, Kushner S, Brodie JD, Dewey SL. Implication of the GABA(B) receptor in gamma vinyl-GABA's inhibition of cocaine-induced increases in nucleus accumbens dopamine. *Synapse* 31: 151–153, 1999.

Ataka T, Kumamoto E, Shimoji K, Yoshimura M. Baclofen inhibits more effectively C-afferent than A-delta-afferent glutamatergic transmission in substantia gelatinosa neurons of adult rat spinal cord slices. *Pain* 86: 273–282, 2000.

Audus KL, Borchardt RT. Characteristics of the large neutral amino acid transport system of bovine brain microvessel endothelial cell monolayers. *J Neurochem* 47: 484–488, 1986.

Awapara J, Landua AJ, Fuerst R, Seale B. Free gamma-aminobutyric acid in brain. *J Biol Chem* 187: 35–39, 1950.

Baker KA, Taylor JW, Lilly GE. Treatment of trigeminal neuralgia: use of baclofen in combination with carbamazepine. *Clin Pharm* 4: 93–96, 1985.

Barber RP, Vaughn JE, Roberts E. The cytoarchitecture of gabaergic neurons in rat spinal cord. *Brain Res* 238: 305–328, 1982.

Barreiro-Iglesias A, Villar-Cerviño V, Anadón R, Rodicio MC. Descending brain-spinal cord projections in a primitive vertebrate, the lamprey: cerebrospinal fluid-contacting and dopaminergic neurons. *J Comp Neurol* 511: 711–723, 2008.

Bartoletti M, Ricci F, Gaiardi M. A GABA(B) agonist reverses the behavioral sensitization to morphine in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 192: 79–85, 2007.

Basbaum AI, Woolf CJ. Pain. *Curr Biol* 9: R429–431, 1999.

Becker R, Alberti O, Bauer BL. Continuous intrathecal baclofen infusion in severe spasticity after traumatic or hypoxic brain injury. *J Neurol* 244: 160–166, 1997.

Becker R, Benes L, Sure U, Hellwig D, Bertalanffy H. Intrathecal baclofen alleviates autonomic dysfunction in severe brain injury. *J Clin Neurosci Off J Neurosurg Soc Australas* 7: 316–319, 2000.

Becker WJ, Harris CJ, Long ML, Ablett DP, Klein GM, DeForge DA. Long Term Intrathecal Baclofen Therapy in Patients with Intractable Spasticity. *Can J Neurol Sci* 22: 208–217, 1995.

Belley M, Sullivan R, Reeves A, Evans J, O'Neill G, Ng GY. Synthesis of the nanomolar photoaffinity GABA(B) receptor ligand CGP 71872 reveals diversity in the tissue distribution of GABA(B) receptor forms. *Bioorg Med Chem* 7: 2697–2704, 1999.

Belvisi MG, Ichinose M, Barnes PJ. Modulation of non-adrenergic, non-cholinergic neural bronchoconstriction in guinea-pig airways via GABA(B)-receptors. *Br J Pharmacol* 97: 1225–1231, 1989.

Benes FM, Berretta S. GABAergic interneurons: implications for understanding schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol* 25: 1–27, 2001.

Bennis M, Calas A, Geffard M, Gamrani H. Distribution of dopamine immunoreactive systems in brain stem and spinal cord of the chameleon. *Biol Struct Morphog* 3: 13–19, 1990.

Bernasconi R, Mathivet P, Bischoff S, Marescaux C. Gamma-hydroxybutyric acid: an endogenous neuromodulator with abuse potential? *Trends Pharmacol Sci* 20: 135–141, 1999.

Bettler B, Kaupmann K, Mosbacher J, Gassmann M. Molecular structure and physiological functions of GABA(B) receptors. *Physiol Rev* 84: 835–867, 2004.

Binet V, Brajon C, Le Corre L, Acher F, Pin J-P, Prézeau L. The heptahelical domain of GABA(B2) is activated directly by CGP7930, a positive allosteric modulator of the GABA(B) receptor. *J Biol Chem* 279: 29085–29091, 2004.

Binor E, Heathcote RD. Development of GABA-immunoreactive neuron patterning in the spinal cord. *J Comp Neurol* 438: 1–11, 2001.

Biscoe TJ, Duggan AW, Lodge D. Antagonism between bicuculline, strychnine, and picrotoxin and depressant amino-acids in the rat nervous system. *Comp Gen Pharmacol* 3: 423–433, 1972.

Bittiger H, Froestl W, Gentsch C, Jaekel J, Mickel SJ, Mondadori C, Olpe HR, Schmutz M. GABAB Receptor Antagonists: Potential Therapeutic Applications. In: *GABA: Receptors, Transporters and Metabolism*, edited by Tanaka C, Bowery NG. Birkhäuser Basel, p. 297–305.

Bjugn R, Haugland HK, Flood PR. Ultrastructure of the mouse spinal cord ependyma. *J Anat* 160: 117–125, 1988.

Black PM. Harvey Cushing at the Peter Bent Brigham Hospital. *Neurosurgery* 45: 990–1001, 1999.

Blackshaw LA, Staunton E, Lehmann A, Dent J. Inhibition of transient LES relaxations and reflux in ferrets by GABA receptor agonists. *Am J Physiol* 277: G867–874, 1999.

Bockaert J, Pin JP. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J* 18: 1723–1729, 1999.

Bogatyrev S, Yakimova KS, Tzschentke B. Influence of leptin and GABAB-receptor agonist and antagonist on neurons of the b in the chicken. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 203: 291–299, 2017.

Böhm UL, Prendergast A, Djenoune L, Nunes Figueiredo S, Gomez J, Stokes C, Kaiser S, Suster M, Kawakami K, Charpentier M, Concordet J-P, Rio J-P, Del Bene F, Wyart C. CSF-contacting neurons regulate locomotion by relaying mechanical stimuli to spinal circuits. *Nat Commun* 7: 10866, 2016.

Böhm UL, Wyart C. Spinal sensory circuits in motion. *Curr Opin Neurobiol* 41: 38–43, 2016.

Bolser DC, Blythin DJ, Chapman RW, Egan RW, Hey JA, Rizzo C, Kuo SC, Kreutner W. The pharmacology of SCH 50911: a novel, orally-active GABA-beta receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 274: 1393–1398, 1995.

Bonfanti L, Olive S, Poulain DA, Theodosios DT. Mapping of the distribution of polysialylated neural cell adhesion molecule throughout the central nervous system of the adult rat: an immunohistochemical study. *Neuroscience* 49: 419–436, 1992.

Bony G, Szczerkowska J, Tamagno I, Shelly M, Contestabile A, Cancedda L. Non-hyperpolarizing GABAB receptor activation regulates neuronal migration and neurite growth and specification by cAMP/LKB1. *Nat Commun* 4: 1800, 2013.

Borowska J, Jones CT, Zhang H, Blacklaws J, Goulding M, Zhang Y. Functional subpopulations of V3 interneurons in the mature mouse spinal cord. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 33: 18553–18565, 2013.

Bowery NG, Doble A, Hill DR, Hudson AL, Turnbull MJ, Warrington R. Structure/activity studies at a baclofen-sensitive, bicuculline-insensitive GABA receptor. *Adv Biochem Psychopharmacol* 29: 333–341, 1981.

Bowery NG, Hudson AL, Price GW. GABAA and GABAB receptor site distribution in the rat central nervous system. *Neuroscience* 20: 365–383, 1987.

van Bree JB, Audus KL, Borchardt RT. Carrier-mediated transport of baclofen across monolayers of bovine brain endothelial cells in primary culture. *Pharm Res* 5: 369–371, 1988.

van Bree JB, Heijligers-Feijen CD, de Boer AG, Danhof M, Breimer DD. Stereoselective transport of baclofen across the blood-brain barrier in rats as determined by the unit impulse response methodology. *Pharm Res* 8: 259–262, 1991.

Breslow MF, Fankhauser MP, Potter RL, Meredith KE, Misiaszek J, Hope DG. Role of gamma-aminobutyric acid in antipanic drug efficacy. *Am J Psychiatry* 146: 353–356, 1989.

Brightwell JJ, Gallagher M, Colombo PJ. Hippocampal CREB1 but not CREB2 is decreased in aged rats with spatial memory impairments. *Neurobiol Learn Mem* 81: 19–26, 2004.

Brinker T, Stopa E, Morrison J, Klinge P. A new look at cerebrospinal fluid circulation. *Fluids Barriers CNS* 11: 10, 2014.

Brodin L, Dale N, Christenson J, Storm-Mathisen J, Hökfelt T, Grillner S. Three types of GABA-immunoreactive cells in the lamprey spinal cord. *Brain Res* 508: 172–175, 1990.

Brogden RN, Speight TM, Avery GS. Baclofen: a preliminary report of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in spasticity. *Drugs* 8: 1–14, 1974.

Browning KN, Travagli RA. Mechanism of action of baclofen in rat dorsal motor nucleus of the vagus. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280: G1106-1113, 2001.

Bruni JE, Reddy K. Ependyma of the central canal of the rat spinal cord: a light and transmission electron microscopic study. *J Anat* 152: 55–70, 1987.

Brusberg M, Ravnefjord A, Martinsson R, Larsson H, Martinez V, Lindström E. The GABA(B) receptor agonist, baclofen, and the positive allosteric modulator, CGP7930,

inhibit visceral pain-related responses to colorectal distension in rats. *Neuropharmacology* 56: 362–367, 2009.

Buchanan JT, Brodin L, Hökfelt T, Van Dongen PA, Grillner S. Survey of neuropeptide-like immunoreactivity in the lamprey spinal cord. *Brain Res* 408: 299–302, 1987.

Buda-Levin A, Wojnicki FHE, Corwin RL. Baclofen reduces fat intake under binge-type conditions. *Physiol Behav* 86: 176–184, 2005.

Buonaguro V, Scelsa B, Curci D, Monforte S, Iuorno T, Motta F. Epilepsy and intrathecal baclofen therapy in children with cerebral palsy. *Pediatr Neurol* 33: 110–113, 2005.

Bushman JD, Ye W, Liman ER. A proton current associated with sour taste: distribution and functional properties. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 29: 3014–3026, 2015.

Calver AR, Medhurst AD, Robbins MJ, Charles KJ, Evans ML, Harrison DC, Stammers M, Hughes SA, Hervieu G, Couve A, Moss SJ, Middlemiss DN, Pangalos MN. The expression of GABA(B1) and GABA(B2) receptor subunits in the CNS differs from that in peripheral tissues. *Neuroscience* 100: 155–170, 2000.

Calver AR, Robbins MJ, Cosio C, Rice SQ, Babbs AJ, Hirst WD, Boyfield I, Wood MD, Russell RB, Price GW, Couve A, Moss SJ, Pangalos MN. The C-terminal domains of the GABA(b) receptor subunits mediate intracellular trafficking but are not required for receptor signaling. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 21: 1203–1210, 2001.

Caprile T, Hein S, Rodríguez S, Montecinos H, Rodríguez E. Reissner fiber binds and transports away monoamines present in the cerebrospinal fluid. *Mol Brain Res* 110: 177–192, 2003.

Carai MAM, Brunetti G, Lobina C, Serra S, Vacca G, Minardi G, Colombo G, Gessa GL. Proconvulsive effect of the GABA(B) receptor antagonist, SCH 50911, in rats undergoing ethanol withdrawal syndrome. *Eur J Pharmacol* 445: 195–199, 2002.

Carai MAM, Colombo G, Gessa GL. Resuscitative effect of a gamma-aminobutyric acid B receptor antagonist on gamma-hydroxybutyric acid mortality in mice. *Ann Emerg Med* 45: 614–619, 2005.

Cates LA. Anticonvulsant phosphorus analogs of GABA - Cates - 1985 - Drug Development Research - Wiley Online Library [Online]. 1985.<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ddr.430050413> [10 Oct. 2018].

Chang CH. Structure & absolute configuration of (R)baclofen monochloride. [Online]. 1982.<http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?S0567740882007973> [10 Oct. 2018].

Chapman RW, Danko G, Prado M del, Egan RW, Kreutner W, Rizzo CA, Hey JA. Further Evidence for Prejunctional GABA-B Inhibition of Cholinergic and Peptidergic Bronchoconstriction in Guinea Pigs: Studies with New Agonists and Antagonists. *Pharmacology* 46: 315–323, 1993a.

Chapman RW, Hey JA, Rizzo CA, Bolser DC. GABAB receptors in the lung. *Trends Pharmacol Sci* 14: 26–29, 1993b.

- Chen S-R, Pan H-L.** Activation of muscarinic receptors inhibits spinal dorsal horn projection neurons: role of GABAB receptors. *Neuroscience* 125: 141–148, 2004.
- Chen XZ, Vassilev PM, Basora N, Peng JB, Nomura H, Segal Y, Brown EM, Reeders ST, Hediger MA, Zhou J.** Polycystin-L is a calcium-regulated cation channel permeable to calcium ions. *Nature* 401: 383–386, 1999.
- Chesler M, Nicholson C.** Organization of the filum terminale in the frog. *J Comp Neurol* 239: 431–444, 1985.
- Chiba A, Oka S.** Serotonin-immunoreactive structures in the central nervous system of the garfish *Lepisosteus productus* (Semionotiformes, Osteichthyes). *Neurosci Lett* 261: 73–76, 1999.
- Chodobski A, Szmydynger-Chodobska J.** Choroid plexus: target for polypeptides and site of their synthesis. *Microsc Res Tech* 52: 65–82, 2001.
- Christenson J, Alford S, Grillner S, Hökfelt T.** Co-localized GABA and somatostatin use different ionic mechanisms to hyperpolarize target neurons in the lamprey spinal cord. *Neurosci Lett* 134: 93–97, 1991a.
- Christenson J, Alford S, Grillner S, Hökfelt T.** Co-localized GABA and somatostatin use different ionic mechanisms to hyperpolarize target neurons in the lamprey spinal cord. *Neurosci Lett* 134: 93–97, 1991b.
- Christenson J, Bongiani F, Grillner S, Hökfelt T.** Putative GABAergic input to axons of spinal interneurons and primary sensory neurons in the lamprey spinal cord as shown by intracellular Lucifer yellow and GABA immunohistochemistry. *Brain Res* 538: 313–318, 1991c.
- Colombo G,** editor. **GABAB Receptor** [Online]. Humana Press.//www.springer.com/us/book/9783319460420 [8 Oct. 2018a].
- Colombo G.** *GABAB Receptor*. Springer, 2016b.
- Corrigall WA, Coen KM, Adamson KL, Chow BL, Zhang J.** Response of nicotine self-administration in the rat to manipulations of mu-opioid and gamma-aminobutyric acid receptors in the ventral tegmental area. *Psychopharmacology (Berl)* 149: 107–114, 2000.
- Couve A, Filippov AK, Connolly CN, Bettler B, Brown DA, Moss SJ.** Intracellular retention of recombinant GABAB receptors. *J Biol Chem* 273: 26361–26367, 1998.
- Crone SA, Quinlan KA, Zagoraoui L, Droho S, Restrepo CE, Lundfald L, Endo T, Setlak J, Jessell TM, Kiehn O, Sharma K.** Genetic ablation of V2a ipsilateral interneurons disrupts left-right locomotor coordination in mammalian spinal cord. *Neuron* 60: 70–83, 2008.
- Cross JA, Horton RW.** Are increases in GABAB receptors consistent findings following chronic antidepressant administration? *Eur J Pharmacol* 141: 159–162, 1987.
- Crunelli V, Emri Z, Leresche N.** Unravelling the brain targets of gamma-hydroxybutyric acid. *Curr Opin Pharmacol* 6: 44–52, 2006.
- Cryan JF, Kaupmann K.** Don't worry "B" happy!: a role for GABA(B) receptors in anxiety and depression. *Trends Pharmacol Sci* 26: 36–43, 2005.

Curtis DR, Duggan AW, Felix D, Johnston GA. Bicuculline and central GABA receptors. *Nature* 228: 676–677, 1970.

Curtis DR, Duggan AW, Felix D, Johnston GA, McLennan H. Antagonism between bicuculline and GABA in the cat brain. *Brain Res* 33: 57–73, 1971.

Dale N, Roberts A, Ottersen OP, Storm-Mathisen J. The morphology and distribution of “Kolmer-Agduhr cells”, a class of cerebrospinal-fluid-contacting neurons revealed in the frog embryo spinal cord by GABA immunocytochemistry. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 232: 193–203, 1987a.

Dale N, Roberts A, Ottersen OP, Storm-Mathisen J. The development of a population of spinal cord neurons and their axonal projections revealed by GABA immunocytochemistry in frog embryos. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 232: 205–215, 1987b.

Davson H, Kleeman CR, Levin E. Quantitative studies of the passage of different substances out of the cerebrospinal fluid. *J Physiol* 161: 126–142, 1962.

Deguchi Y, Inabe K, Tomiyasu K, Nozawa K, Yamada S, Kimura R. Study on brain interstitial fluid distribution and blood-brain barrier transport of baclofen in rats by microdialysis. *Pharm Res* 12: 1838–1844, 1995.

Delmas P. The gating of polycystin signaling complex. *Biol Res* 37: 681–691, 2004.

Delmas P. Polycystins: polymodal receptor/ion-channel cellular sensors. *Pflugers Arch* 451: 264–276, 2005.

Denman-Johnson K, Forge A. Establishment of hair bundle polarity and orientation in the developing vestibular system of the mouse. *J Neurocytol* 28: 821–835, 1999.

Dervan AG, Roberts BL. Reaction of spinal cord central canal cells to cord transection and their contribution to cord regeneration. *J Comp Neurol* 458: 293–306, 2003.

Di Terlizzi R, Platt S. The function, composition and analysis of cerebrospinal fluid in companion animals: part I - function and composition. *Vet J Lond Engl* 1997 172: 422–431, 2006.

Dicpinigaitis PV, Grimm DR, Lesser M. Baclofen-induced cough suppression in cervical spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil* 81: 921–923, 2000.

Djenoune L, Desban L, Gomez J, Sternberg JR, Prendergast A, Langui D, Quan FB, Marnas H, Auer TO, Rio J-P, Del Bene F, Bardet P-L, Wyart C. The dual developmental origin of spinal cerebrospinal fluid-contacting neurons gives rise to distinct functional subtypes. *Sci Rep* 7, 2017.

Djenoune L, Khabou H, Joubert F, Quan FB, Nunes Figueiredo S, Bodineau L, Del Bene F, Burcklé C, Tostivint H, Wyart C. Investigation of spinal cerebrospinal fluid-contacting neurons expressing PKD2L1: evidence for a conserved system from fish to primates. *Front Neuroanat* 8: 26, 2014.

Djenoune L, Wyart C. Light on a sensory interface linking the cerebrospinal fluid to motor circuits in vertebrates. *J Neurogenet* 31: 113–127, 2017.

Dolphin AC. G protein modulation of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev* 55: 607–627, 2003.

Dolphin AC, Pearson HA, Menon-Johansson AS, Sweeney MI, Sutton K, Huston E, Cullen GP, Scott RH. G protein modulation of voltage-dependent calcium channels and transmitter release. *Biochem Soc Trans* 21: 391–395, 1993.

Dougherty KJ, Kiehn O. Functional organization of V2a-related locomotor circuits in the rodent spinal cord. *Ann N Y Acad Sci* 1198: 85–93, 2010a.

Dougherty KJ, Kiehn O. Firing and cellular properties of V2a interneurons in the rodent spinal cord. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 30: 24–37, 2010b.

Doupnik CA, Davidson N, Lester HA. The inward rectifier potassium channel family. *Curr Opin Neurobiol* 5: 268–277, 1995.

Drake RG, Davis LL, Cates ME, Jewell ME, Ambrose SM, Lowe JS. Baclofen treatment for chronic posttraumatic stress disorder. *Ann Pharmacother* 37: 1177–1181, 2003.

Du J, Yang X, Zhang L, Zeng Y-M. Expression of TRPM8 in the distal cerebrospinal fluid-contacting neurons in the brain mesencephalon of rats. *Cerebrospinal Fluid Res* 6: 3, 2009.

Dunn PM, Zhong Y, Burnstock G. P2X receptors in peripheral neurons. *Prog Neurobiol* 65: 107–134, 2001.

Ebenezer IS, Patel SM. Effects of the GABAB receptor agonists baclofen and 3-aminopropylphosphinic acid (3-APA) on food intake in rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 26: 627–630, 2004.

Enna SJ, McCarson KE. The role of GABA in the mediation and perception of pain. *Adv Pharmacol San Diego Calif* 54: 1–27, 2006.

Enna SJ, Reisman SA, Stanford JA. CGP 56999A, a GABA(B) receptor antagonist, enhances expression of brain-derived neurotrophic factor and attenuates dopamine depletion in the rat corpus striatum following a 6-hydroxydopamine lesion of the nigrostriatal pathway. *Neurosci Lett* 406: 102–106, 2006.

Erhardt S, Nissbrandt H, Engberg G. Activation of nigral dopamine neurons by the selective GABA(B)-receptor antagonist SCH 50911. *J Neural Transm Vienna Austria* 1996 106: 383–394, 1999.

Federici M, Nisticò R, Giustizieri M, Bernardi G, Mercuri NB. Ethanol enhances GABAB-mediated inhibitory postsynaptic transmission on rat midbrain dopaminergic neurons by facilitating GIRK currents. *Eur J Neurosci* 29: 1369–1377, 2009.

Feldblum S, Dumoulin A, Anoaï M, Sandillon F, Privat A. Comparative distribution of GAD65 and GAD67 mRNAs and proteins in the rat spinal cord supports a differential regulation of these two glutamate decarboxylases in vivo. *J Neurosci Res* 42: 742–757, 1995.

Ferguson IA, Schweitzer JB, Bartlett PF, Johnson EM. Receptor-mediated retrograde transport in CNS neurons after intraventricular administration of NGF and growth factors. *J Comp Neurol* 313: 680–692, 1991.

Fernández-Alacid L, Aguado C, Ciruela F, Martín R, Colón J, Cabañero MJ, Gassmann M, Watanabe M, Shigemoto R, Wickman K, Bettler B, Sánchez-Prieto J, Luján R. Subcellular compartment-specific molecular diversity of pre- and post-synaptic GABA-activated GIRK channels in Purkinje cells. *J Neurochem* 110: 1363–1376, 2009.

Fernández-López B, Villar-Cerviño V, Valle-Maroto SM, Barreiro-Iglesias A, Anadón R, Rodicio MC. The glutamatergic neurons in the spinal cord of the sea lamprey: an in situ hybridization and immunohistochemical study. *PLoS One* 7: e47898, 2012.

Fidelin K, Djenoune L, Stokes C, Prendergast A, Gomez J, Baradel A, Del Bene F, Wyart C. State-Dependent Modulation of Locomotion by GABAergic Spinal Sensory Neurons. *Curr Biol* 25: 3035–3047, 2015.

File SE, Mabbutt PS, Andrews N. Diazepam withdrawal responses measured in the social interaction test of anxiety and their reversal by baclofen. *Psychopharmacology (Berl)* 104: 62–66, 1991.

Fioravante D, Regehr WG. Short-term forms of presynaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 21: 269–274, 2011.

Flannery BA, Garbutt JC, Cody MW, Renn W, Grace K, Osborne M, Crosby K, Morreale M, Trivette A. Baclofen for alcohol dependence: a preliminary open-label study. *Alcohol Clin Exp Res* 28: 1517–1523, 2004.

Flock A, Duvall AJ. THE ULTRASTRUCTURE OF THE KINOCILIUM OF THE SENSORY CELLS IN THE INNER EAR AND LATERAL LINE ORGANS. *J Cell Biol* 25: 1–8, 1965.

Franek M, Vaculín S, Rokyta R. GABA(B) receptor agonist baclofen has non-specific antinociceptive effect in the model of peripheral neuropathy in the rat. *Physiol Res* 53: 351–355, 2004.

Franklin TR, Harper D, Kampman K, Kildea-McCrea S, Jens W, Lynch KG, O'Brien CP, Childress AR. The GABA B agonist baclofen reduces cigarette consumption in a preliminary double-blind placebo-controlled smoking reduction study. *Drug Alcohol Depend* 103: 30–36, 2009.

Froestl W, Gallagher M, Jenkins H, Madrid A, Melcher T, Teichman S, Mondadori CG, Pearlman R. SGS742: the first GABA(B) receptor antagonist in clinical trials. *Biochem Pharmacol* 68: 1479–1487, 2004.

Froestl W, Mickel SJ, Hall RG, von Sprecher G, Strub D, Baumann PA, Brugger F, Gentsch C, Jaekel J, Olpe HR. Phosphinic acid analogues of GABA. 1. New potent and selective GABAB agonists. *J Med Chem* 38: 3297–3312, 1995a.

Froestl W, Mickel SJ, von Sprecher G, Diel PJ, Hall RG, Maier L, Strub D, Melillo V, Baumann PA, Bernasconi R. Phosphinic acid analogues of GABA. 2. Selective, orally active GABAB antagonists. *J Med Chem* 38: 3313–3331, 1995b.

Fromm GH, Terrence CF. Comparison of L-baclofen and racemic baclofen in trigeminal neuralgia. *Neurology* 37: 1725–1728, 1987.

Frydenvang K, Enna SJ, Krosgaard-Larsen P. (–)-(R)-5,5-Dimethylmorpholinyl-2-acetic Acid Ethyl Ester Hydrochloride, C₁₀H₂₀NO₃⁺.Cl[–]. *Acta Crystallogr C* 53: 1088–1091, 1997.

Frydenvang K, Hansen JJ, Krosgaard-Larsen P, Mitrovic A, Tran H, Drew CA, Johnston GA. GABAB antagonists: resolution, absolute stereochemistry, and pharmacology of (R)- and (S)-phaclofen. *Chirality* 6: 583–589, 1994.

Gaiarsa JL, McLean H, Congar P, Leinekugel X, Khazipov R, Tseeb V, Ben-Ari Y. Postnatal maturation of gamma-aminobutyric acidA and B-mediated inhibition in the CA3 hippocampal region of the rat. *J Neurobiol* 26: 339–349, 1995.

Gaiarsa J-L, Porcher C. Emerging neurotrophic role of GABAB receptors in neuronal circuit development. *Front Cell Neurosci* 7: 206, 2013a.

Gaiarsa J-L, Porcher C. Emerging neurotrophic role of GABAB receptors in neuronal circuit development. *Front Cell Neurosci* 7: 206, 2013b.

Galvez T, Duthey B, Kniazeff J, Blahos J, Rovelli G, Bettler B, Prézeau L, Pin JP. Allosteric interactions between GB1 and GB2 subunits are required for optimal GABA(B) receptor function. *EMBO J* 20: 2152–2159, 2001.

Gangadharan V, Agarwal N, Brugger S, Tegeder I, Bettler B, Kuner R, Kurejova M. Conditional gene deletion reveals functional redundancy of GABAB receptors in peripheral nociceptors in vivo. *Mol Pain* 5: 68, 2009.

Gassmann M, Haller C, Stoll Y, Abdel Aziz S, Biermann B, Mosbacher J, Kaupmann K, Bettler B. The RXR-type endoplasmic reticulum-retention/retrieval signal of GABAB1 requires distant spacing from the membrane to function. *Mol Pharmacol* 68: 137–144, 2005.

Gassmann M, Shaban H, Vigot R, Sansig G, Haller C, Barbieri S, Humeau Y, Schuler V, Muller M, Kinzel B, Klebs K, Schmutz M, Froestl W, Heid J, Kelly PH, Gentry C, Jatton AL, Van der Putten H, Mombereau C, Lecourtier L, Mosbacher J, Cryan JF, Fritschy JM, Luthi A, Kaupmann K, Bettler B. Redistribution of GABAB(1) protein and atypical GABAB responses in GABAB(2)-deficient mice. *J Neurosci* 24: 6086–97, 2004.

Gato A, Martín P, Alonso MI, Martín C, Pulgar MA, Moro JA. Analysis of cerebrospinal fluid protein composition in early developmental stages in chick embryos. *J Exp Zool A Comp Exp Biol* 301: 280–289, 2004.

Gato A, Moro JA, Alonso MI, Bueno D, De La Mano A, Martín C. Embryonic cerebrospinal fluid regulates neuroepithelial survival, proliferation, and neurogenesis in chick embryos. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 284: 475–484, 2005.

Getova DP, Dimitrova DD. Effects of GABABreceptor antagonists CGP63360, CGP76290A and CGP76291A on learning and memory processes in rodents. *Cent Eur J Med* 2: 280–293, 2007.

Giachino C, Barz M, Tchorz JS, Tome M, Gassmann M, Bischofberger J, Bettler B, Taylor V. GABA suppresses neurogenesis in the adult hippocampus through GABAB receptors. *Dev Camb Engl* 141: 83–90, 2014.

Giraldo J, Pin JP. G Protein-coupled Receptors: From Structure to Function - Google Livres [Online]. 2011. [https://books.google.co.ma/books?id=KMpvQwj1YEQC&printsec=frontcover&dq=G+Protein-Coupled+Receptors:+From+Structure+to+Function+\(Drug+Discovery\)&hl=fr&sa=X&ved=0ahUKEwiZw5Cbo_zdAhXlx4UKHTpbBakQ6AEIjAA#v=onepage&q=G%20Protein-Coupled%20Receptors%3A%20From%20Structure%20to%20Function%20\(Drug%20Discovery\)&f=false](https://books.google.co.ma/books?id=KMpvQwj1YEQC&printsec=frontcover&dq=G+Protein-Coupled+Receptors:+From+Structure+to+Function+(Drug+Discovery)&hl=fr&sa=X&ved=0ahUKEwiZw5Cbo_zdAhXlx4UKHTpbBakQ6AEIjAA#v=onepage&q=G%20Protein-Coupled%20Receptors%3A%20From%20Structure%20to%20Function%20(Drug%20Discovery)&f=false) [10 Oct. 2018].

Godfraind JM, Krnjević K, Pumain R. Doubtful value of bicuculline as a specific antagonist of GABA. *Nature* 228: 675–676, 1970.

Gonzales EB, Kawate T, Gouaux E. Pore architecture and ion sites in acid-sensing ion channels and P2X receptors. *Nature* 460: 599–604, 2009.

Gonzalez JC, Epps SA, Markwardt SJ, Wadiche JI, Overstreet-Wadiche L. Constitutive and Synaptic Activation of GIRK Channels Differentiates Mature and Newborn Dentate Granule Cells. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 38: 6513–6526, 2018.

Grill HJ, Schwartz MW, Kaplan JM, Foxhall JS, Breininger J, Baskin DG. Evidence that the caudal brainstem is a target for the inhibitory effect of leptin on food intake. *Endocrinology* 143: 239–246, 2002.

Grillner L, Blomberg I. Restriction enzyme analysis of human cytomegalovirus using DNA extracted from infected cells. *J Med Virol* 14: 313–322, 1984.

Guelaud C, Similowski T, Bizec JL, Cabane J, Whitelaw WA, Derenne JP. Baclofen therapy for chronic hiccup. *Eur Respir J* 8: 235–237, 1995.

Guglielmone R, Panzica GC. Early appearance of catecholaminergic neurons in the central nervous system of precocial and altricial avian species. A fluorescence-histochemical study. *Cell Tissue Res* 240: 381–384, 1985.

Guyon A, Leresche N. Modulation by different GABAB receptor types of voltage-activated calcium currents in rat thalamocortical neurones. *J Physiol* 485 (Pt 1): 29–42, 1995.

Haney M, Hart CL, Foltin RW. Effects of baclofen on cocaine self-administration: opioid- and nonopioid-dependent volunteers. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol* 31: 1814–1821, 2006.

Harayama N, Shibuya I, Tanaka K, Kabashima N, Ueta Y, Yamashita H. Inhibition of N- and P/Q-type calcium channels by postsynaptic GABAB receptor activation in rat supraoptic neurones. *J Physiol* 509 (Pt 2): 371–383, 1998.

Heathcote RD, Chen A. A nonrandom interneuronal pattern in the developing frog spinal cord. *J Comp Neurol* 328: 437–448, 1993.

Heinrichs SC, Leite-Morris KA, Carey RJ, Kaplan GB. Baclofen enhances extinction of opiate conditioned place preference. *Behav Brain Res* 207: 353–359, 2010.

- Helm KA, Haberman RP, Dean SL, Hoyt EC, Melcher T, Lund PK, Gallagher M.** GABAB receptor antagonist SGS742 improves spatial memory and reduces protein binding to the cAMP response element (CRE) in the hippocampus. *Neuropharmacology* 48: 956–964, 2005.
- Hering-Hanit R.** Baclofen for prevention of migraine. *Cephalalgia Int J Headache* 19: 589–591, 1999.
- Hering-Hanit R, Gadoth N.** Baclofen in cluster headache. *Headache* 40: 48–51, 2000.
- Hering-Hanit R, Gadoth N.** The use of baclofen in cluster headache. *Curr Pain Headache Rep* 5: 79–82, 2001.
- van Herwaarden MA, Samsom M, Rydholm H, Smout AJPM.** The effect of baclofen on gastro-oesophageal reflux, lower oesophageal sphincter function and reflux symptoms in patients with reflux disease. *Aliment Pharmacol Ther* 16: 1655–1662, 2002.
- Higashijima S-I, Mandel G, Fetcho JR.** Distribution of prospective glutamatergic, glycinergic, and GABAergic neurons in embryonic and larval zebrafish. *J Comp Neurol* 480: 1–18, 2004a.
- Higashijima S-I, Schaefer M, Fetcho JR.** Neurotransmitter properties of spinal interneurons in embryonic and larval zebrafish. *J Comp Neurol* 480: 19–37, 2004b.
- Høg S, Wellendorph P, Nielsen B, Frydenvang K, Dahl IF, Bräuner-Osborne H, Brehm L, Frølund B, Clausen RP.** Novel high-affinity and selective biaromatic 4-substituted gamma-hydroxybutyric acid (GHB) analogues as GHB ligands: design, synthesis, and binding studies. *J Med Chem* 51: 8088–8095, 2008.
- Holopainen I, Rau C, Wojcik WJ.** Proposed antagonists at GABAB receptors that inhibit adenylyl cyclase in cerebellar granule cell cultures of rat. *Eur J Pharmacol* 227: 225–228, 1992.
- Horner PJ, Gage FH.** Regenerating the damaged central nervous system. *Nature* 407: 963–970, 2000.
- Hosford et al., DA.** Characterization of the antiabsence effects of SCH 50911, a GABA-B receptor antagonist, in the lethargic mouse, gamma-hydroxybutyrate, and pentylenetetrazole models. | *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* [Online]. 1995.<http://jpet.aspetjournals.org/content/274/3/1399.long> [8 Oct. 2018].
- Hoyo-Becerra C, López-Ávalos MD, Pérez J, Miranda E, Rojas-Ríos P, Fernández-Llebrez P, Grondona JM.** Continuous delivery of a monoclonal antibody against Reissner's fiber into CSF reveals CSF-soluble material immunorelated to the subcommissural organ in early chick embryos. *Cell Tissue Res* 326: 771–786, 2006.
- Huang AL, Chen X, Hoon MA, Chandrashekar J, Guo W, Tränkner D, Ryba NJP, Zuker CS.** The cells and logic for mammalian sour taste detection. *Nature* 442: 934–938, 2006.
- Hubbard JM, Böhm UL, Prendergast A, Tseng P-EB, Newman M, Stokes C, Wyart C.** Intraspinal Sensory Neurons Provide Powerful Inhibition to Motor Circuits Ensuring Postural Control during Locomotion. *Curr Biol CB* 26: 2841–2853, 2016.

- Hugnot JP, Franzen R.** The spinal cord ependymal region: a stem cell niche in the caudal central nervous system. *Front Biosci Landmark Ed* 16: 1044–1059, 2011.
- Huston E, Cullen GP, Burley JR, Dolphin AC.** The involvement of multiple calcium channel sub-types in glutamate release from cerebellar granule cells and its modulation by GABAB receptor activation. *Neuroscience* 68: 465–478, 1995.
- Illiff JJ, Wang M, Liao Y, Plogg BA, Peng W, Gundersen GA, Benveniste H, Vates GE, Deane R, Goldman SA, Nagelhus EA, Nedergaard M.** A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid β . *Sci Transl Med* 4: 147ra111, 2012.
- Inada H, Kawabata F, Ishimaru Y, Fushiki T, Matsunami H, Tominaga M.** Off-response property of an acid-activated cation channel complex PKD1L3-PKD2L1. *EMBO Rep* 9: 690–697, 2008.
- Ishii S, Misaka T, Kishi M, Kaga T, Ishimaru Y, Abe K.** Acetic acid activates PKD1L3-PKD2L1 channel--a candidate sour taste receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 385: 346–350, 2009.
- Ishimaru Y, Inada H, Kubota M, Zhuang H, Tominaga M, Matsunami H.** Transient receptor potential family members PKD1L3 and PKD2L1 form a candidate sour taste receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 12569–12574, 2006.
- Ishimaru Y, Katano Y, Yamamoto K, Akiba M, Misaka T, Roberts RW, Asakura T, Matsunami H, Abe K.** Interaction between PKD1L3 and PKD2L1 through their transmembrane domains is required for localization of PKD2L1 at taste pores in taste cells of circumvallate and foliate papillae. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 24: 4058–4067, 2010.
- Ishimaru Y, Matsunami H.** Transient Receptor Potential (TRP) Channels and Taste Sensation. *J Dent Res* 88: 212–218, 2009.
- Jaeger CB, Teitelman G, Joh TH, Albert VR, Park DH, Reis DJ.** Some neurons of the rat central nervous system contain aromatic-L-amino-acid decarboxylase but not monoamines. *Science* 219: 1233–1235, 1983.
- Jalalvand E, Robertson B, Wallén P, Grillner S.** Ciliated neurons lining the central canal sense both fluid movement and pH through ASIC3. *Nat Commun* 7: 10002, 2016.
- Jalalvand E, Robertson B, Wallén P, Hill RH, Grillner S.** Laterally projecting cerebrospinal fluid-contacting cells in the lamprey spinal cord are of two distinct types. *J Comp Neurol* , 2014a. doi:10.1002/cne.23542.
- Jalalvand E, Robertson B, Wallén P, Hill RH, Grillner S.** Laterally projecting cerebrospinal fluid-contacting cells in the lamprey spinal cord are of two distinct types. *J Comp Neurol* 522: Spc1, 2014b.
- Jasti J, Furukawa H, Gonzales EB, Gouaux E.** Structure of acid-sensing ion channel 1 at 1.9 Å resolution and low pH. *Nature* 449: 316–323, 2007.

Jiang W-X, Zhang L-C. [Distribution and effects of 5-HT(1A) receptors in distal cerebral spinal fluid-contacting neurons in rat brain parenchyma in neuropathic pain]. *Sheng Li Xue Bao* 60: 243–248, 2008.

Johanson CE, Duncan JA, Klinge PM, Brinker T, Stopa EG, Silverberg GD. Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: New challenges in health and disease. *Cerebrospinal Fluid Res* 5: 10, 2008.

Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisén J. Identification of a Neural Stem Cell in the Adult Mammalian Central Nervous System. *Cell* 96: 25–34, 1999.

Johnston GA, Beart PM, Curtis DR, Game CJ, McCulloch RM, Maclachlan RM. Bicuculline methochloride as a GABA antagonist. *Nature New Biol* 240: 219–220, 1972.

Jonaidi H, Abbassi L, Yaghoobi MM, Kaiya H, Denbow DM, Kamali Y, Shojaei B. The role of GABAergic system on the inhibitory effect of ghrelin on food intake in neonatal chicks. *Neurosci Lett* 520: 82–86, 2012.

Juiz JM, Albin RL, Helfert RH, Altschuler RA. Distribution of GABAA and GABAB binding sites in the cochlear nucleus of the guinea pig. *Brain Res* 639: 193–201, 1994.

Kaduri AJ, Magoul R, Lescaudron L, Campistron G, Calas A. Immunocytochemical approach of GABAergic innervation of the mouse spinal cord using antibodies to GABA. *J Hirnforsch* 28: 349–355, 1987.

Kasaian MT, Neet KE. Nerve growth factor in human amniotic and cerebrospinal fluid. *BioFactors Oxf Engl* 2: 99–104, 1989.

Kaupmann K. Expression cloning of GABA(B) receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. - PubMed - NCBI [Online]. 1997b.<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Kaupmann%2C+K+1997> [8 Oct. 2018].

Kaupmann K. Expression cloning of GABA(B) receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. - PubMed - NCBI [Online]. 1997a.<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9069281> [8 Oct. 2018].

Kaupmann K. Specific gamma-hydroxybutyrate-binding sites but loss of pharmacological effects of gamma-hydroxybutyrate in GABA(B)(1)-deficient mice. - PubMed - NCBI [Online]. 2003.<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Specific+g-hydroxybutyrate-binding+sites+but+loss+of+pharmacological+effects+of+g-hydroxybutyrate+in+GABAB1-deficient+mice>. [10 Oct. 2018].

Kawaguchi H, Yamanaka A, Uchida K, Shibasaki K, Sokabe T, Maruyama Y, Yanagawa Y, Murakami S, Tominaga M. Activation of polycystic kidney disease-2-like 1 (PKD2L1)-PKD1L3 complex by acid in mouse taste cells. *J Biol Chem* 285: 17277–17281, 2010a.

Kawaguchi H, Yamanaka A, Uchida K, Shibasaki K, Sokabe T, Maruyama Y, Yanagawa Y, Murakami S, Tominaga M. Activation of polycystic kidney disease-2-like 1 (PKD2L1)-PKD1L3 complex by acid in mouse taste cells. *J Biol Chem* 285: 17277–17281, 2010b.

Kerr. The (S)-enantiomer of 2-hydroxysaclofen is the active GABAB receptor antagonist in central and peripheral preparations. - PubMed - NCBI [Online]. 1995.<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8749034> [8 Oct. 2018].

Kerr DI. Phaclofen: a peripheral and central baclofen antagonist. - PubMed - NCBI [Online]. 1987.<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3032346> [8 Oct. 2018].

Kerr et al. DI. 2-Hydroxy-saclofen: an improved antagonist at central and peripheral GABAB receptors. - PubMed - NCBI [Online]. 1988.<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2847092> [8 Oct. 2018].

Khakh BS. Molecular physiology of P2X receptors and ATP signalling at synapses. *Nat Rev Neurosci* 2: 165–174, 2001.

Kilpatrick DL, Jones BN, Kojima K, Udenfriend S. Identification of the octapeptide [Met]enkephalin -Arg6-Gly7-Leu8 in extracts of bovine adrenal medulla. *Biochem Biophys Res Commun* 103: 698–705, 1981.

Kindt KS, Finch G, Nicolson T. Kinocilia mediate mechanosensitivity in developing zebrafish hair cells. *Dev Cell* 23: 329–341, 2012.

Kishi T, Aschkenasi CJ, Lee CE, Mountjoy KG, Saper CB, Elmquist JK. Expression of melanocortin 4 receptor mRNA in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol* 457: 213–235, 2003.

Kniazeff J. No Ligand Binding in the GB2 Subunit of the GABAB Receptor Is Required for Activation and Allosteric Interaction between the Subunits | Journal of Neuroscience [Online]. 2002.<http://www.jneurosci.org/content/22/17/7352> [8 Oct. 2018].

Koek GH, Sifrim D, Lerut T, Janssens J, Tack J. Effect of the GABA(B) agonist baclofen in patients with symptoms and duodeno-gastro-oesophageal reflux refractory to proton pump inhibitors. *Gut* 52: 1397–1402, 2003.

Krach LE. Pharmacotherapy of spasticity: oral medications and intrathecal baclofen. *J Child Neurol* 16: 31–36, 2001.

Krach LE. Intrathecal baclofen use in adults with cerebral palsy. *Dev Med Child Neurol* 51 Suppl 4: 106–112, 2009.

Krahn A, Penner SB. Use of baclofen for intractable hiccups in uremia. *Am J Med* 96: 391, 1994.

Kroin JS. Intrathecal drug administration. Present use and future trends. *Clin Pharmacokinet* 22: 319–326, 1992.

Kunishima N, Shimada Y, Tsuji Y, Sato T, Yamamoto M, Kumasaka T, Nakanishi S, Jingami H, Morikawa K. Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature* 407: 971–977, 2000.

Kútna V, Ševc J, Gombalová Z, Matiašová A, Daxnerová Z. Enigmatic cerebrospinal fluid-contacting neurons arise even after the termination of neurogenesis in the rat spinal cord during embryonic development and retain their immature-like characteristics until adulthood. *Acta Histochem* 116: 278–285, 2014.

LaMotte CC. Vasoactive intestinal polypeptide cerebrospinal fluid-contacting neurons of the monkey and cat spinal central canal. *J Comp Neurol* 258: 527–541, 1987.

Leary Swan EE, Peppi M, Chen Z, Green KM, Evans JE, McKenna MJ, Mescher MJ, Kujawa SG, Sewell WF. Proteomics Analysis of Perilymph and Cerebrospinal Fluid in Mouse. *The Laryngoscope* 119: 953–958, 2009.

Leggio L. Understanding and Treating Alcohol Craving and Dependence: Recent Pharmacological and Neuroendocrinological Findings. *Alcohol Alcohol* 44: 341–352, 2009.

Lehmann A. Novel treatments of GERD: focus on the lower esophageal sphincter. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 12 Suppl 1: 103–110, 2008.

Lehmann A. GABAB receptors as drug targets to treat gastroesophageal reflux disease. *Pharmacol Ther* 122: 239–245, 2009.

Lehmann A, Holmberg AA, Bhatt U, Bremner-Danielsen M, Brändén L, Elg S, Elebring T, Fitzpatrick K, Geiss WB, Guzzo P, Jensen J, Jerndal G, Mattsson JP, Nilsson K, Olsson B-M. Effects of (2R)-(3-amino-2-fluoropropyl)sulphinic acid (AFPSiA) on transient lower oesophageal sphincter relaxation in dogs and mechanism of hypothermic effects in mice. *Br J Pharmacol* 146: 89–97, 2005.

Lehtinen MK, Walsh CA. Neurogenesis at the brain-cerebrospinal fluid interface. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27: 653–679, 2011.

Lehtinen MK, Zappaterra MW, Chen X, Yang YJ, Hill AD, Lun M, Maynard T, Gonzalez D, Kim S, Ye P, D’Ercole AJ, Wong ET, LaMantia AS, Walsh CA. The cerebrospinal fluid provides a proliferative niche for neural progenitor cells. *Neuron* 69: 893–905, 2011.

Lei S, McBain CJ. GABA B receptor modulation of excitatory and inhibitory synaptic transmission onto rat CA3 hippocampal interneurons. *J Physiol* 546: 439–453, 2003.

Leisen C, Langguth P, Herbert B, Dressler C, Koggel A, Spahn-Langguth H. Lipophilicities of baclofen ester prodrugs correlate with affinities to the ATP-dependent efflux pump P-glycoprotein: relevance for their permeation across the blood-brain barrier? *Pharm Res* 20: 772–778, 2003.

Leonhardt H. [Neurosecretory structures in the 4th ventricle and central canal of the rabbit]. *Verh Anat Ges* 62: 95–102, 1967.

Li Y, Stern JE. Activation of postsynaptic GABAB receptors modulate the firing activity of supraoptic oxytocin and vasopressin neurones: role of calcium channels. *J Neuroendocrinol* 16: 119–130, 2004.

Liu Z-L, Ma H, Xu R-X, Dai Y-W, Zhang H-T, Yao X-Q, Yang K. Potassium channels underlie postsynaptic but not presynaptic GABAB receptor-mediated inhibition on ventrolateral periaqueductal gray neurons. *Brain Res Bull* 88: 529–533, 2012.

Loubser PG, Akman NM. Effects of intrathecal baclofen on chronic spinal cord injury pain. *J Pain Symptom Manage* 12: 241–247, 1996.

Luhmann HJ, Prince DA. Postnatal maturation of the GABAergic system in rat neocortex. *J Neurophysiol* 65: 247–263, 1991.

Maccioni P, Bienkowski P, Carai MAM, Gessa GL, Colombo G. Baclofen attenuates cue-induced reinstatement of alcohol-seeking behavior in Sardinian alcohol-preferring (sP) rats. *Drug Alcohol Depend* 95: 284–287, 2008.

Mackie M, Hughes DI, Maxwell DJ, Tillakaratne NJK, Todd AJ. Distribution and colocalisation of glutamate decarboxylase isoforms in the rat spinal cord. *Neuroscience* 119: 461–472, 2003.

Magoul R, Onteniente B, Geffard M, Calas A. Anatomical distribution and ultrastructural organization of the GABAergic system in the rat spinal cord. An immunocytochemical study using anti-GABA antibodies. *Neuroscience* 20: 1001–1009, 1987.

Malcangio M, Bowery NG. Calcitonin gene-related peptide content, basal outflow and electrically-evoked release from monoarthritic rat spinal cord in vitro. *Pain* 66: 351–358, 1996.

Manabe T, Wyllie DJ, Perkel DJ, Nicoll RA. Modulation of synaptic transmission and long-term potentiation: effects on paired pulse facilitation and EPSC variance in the CA1 region of the hippocampus. *J Neurophysiol* 70: 1451–1459, 1993.

Manning J-PA, Richards DA, Bowery NG. Pharmacology of absence epilepsy. *Trends Pharmacol Sci* 24: 542–549, 2003.

Marescaux C, Vergnes M, Bernasconi R. GABAB receptor antagonists: potential new anti-absence drugs. *J Neural Transm Suppl* 35: 179–188, 1992.

Margeta-Mitrovic M, Mitrovic I, Riley RC, Jan LY, Basbaum AI. Immunohistochemical localization of GABA(B) receptors in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 405: 299–321, 1999a.

Margeta-Mitrovic M, Mitrovic I, Riley RC, Jan LY, Basbaum AI. Immunohistochemical localization of GABA(B) receptors in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 405: 299–321, 1999b.

Marichal N, García G, Radmilovich M, Trujillo-Cenóz O, Russo RE. Enigmatic central canal contacting cells: immature neurons in “standby mode”? *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 29: 10010–10024, 2009.

Marino RA. Baclofen therapy for intractable hiccups in pancreatic carcinoma. *Am J Gastroenterol* 93: 2000, 1998.

Martin K, Groves AK. Competence of cranial ectoderm to respond to Fgf signaling suggests a two-step model of otic placode induction. *Development* 133: 877–887, 2006.

Martin SC, Heinrich G, Sandell JH. Sequence and expression of glutamic acid decarboxylase isoforms in the developing zebrafish. *J Comp Neurol* 396: 253–266, 1998.

Mathivet P, Bernasconi R, De Barry J, Marescaux C, Bittiger H. Binding characteristics of gamma-hydroxybutyric acid as a weak but selective GABAB receptor agonist. *Eur J Pharmacol* 321: 67–75, 1997.

Maurel D, Kniazeff J, Mathis G, Trinquet E, Pin J-P, Ansanay H. Cell surface detection of membrane protein interaction with homogeneous time-resolved fluorescence resonance energy transfer technology. *Anal Biochem* 329: 253–262, 2004.

McPherson DR, Kemnitz CP. Modulation of lamprey fictive swimming and motoneuron physiology by dopamine, and its immunocytochemical localization in the spinal cord. *Neurosci Lett* 166: 23–26, 1994.

Meeren H, van Luijtelaar G, Lopes da Silva F, Coenen A. Evolving concepts on the pathophysiology of absence seizures: the cortical focus theory. *Arch Neurol* 62: 371–376, 2005.

Megías M, Alvarez-Otero R, Pombal MA. Calbindin and calretinin immunoreactivities identify different types of neurons in the adult lamprey spinal cord. *J Comp Neurol* 455: 72–85, 2003.

Meinzel A. The secretory ependymal cells of the subcommissural organ: which role in hydrocephalus? *Int J Biochem Cell Biol* 39: 463–468, 2007.

Menelaou E, VanDunk C, McLean DL. Differences in Spinal V2a Neuron Morphology Reflect Their Recruitment Order During Swimming in Larval Zebrafish. *J Comp Neurol* 522: 1232–1248, 2014.

Miller AD, Leslie RA. The area postrema and vomiting. *Front Neuroendocrinol* 15: 301–320, 1994.

Mintz IM, Bean BP. GABAB receptor inhibition of P-type Ca²⁺ channels in central neurons. *Neuron* 10: 889–898, 1993.

Miyan JA, Zendah M, Mashayekhi F, Owen-Lynch PJ. Cerebrospinal fluid supports viability and proliferation of cortical cells in vitro, mirroring in vivo development. *Cerebrospinal Fluid Res* 3: 2, 2006.

Mokhtarpouriani K, Zendehtel M, Jonaidi H, Babapour V, Shayan P. The interaction of central nitergic and GABAergic systems on food intake in neonatal layer-type chicks. *Amino Acids* 48: 1275–1283, 2016.

Mombereau C, Kaupmann K, Gassmann M, Bettler B, van der Putten H, Cryan JF. Altered anxiety and depression-related behaviour in mice lacking GABAB(2) receptor subunits. *Neuroreport* 16: 307–310, 2005.

Mongiat LA, Espósito MS, Lombardi G, Schinder AF. Reliable activation of immature neurons in the adult hippocampus. *PloS One* 4: e5320, 2009.

Montgomery JE, Wiggin TD, Rivera-Perez LM, Lillesaar C, Masino MA. Intraspinal serotonergic neurons consist of two, temporally distinct populations in developing zebrafish. *Dev Neurobiol* 76: 673–687, 2016.

Mott DD, Lewis DV. Facilitation of the induction of long-term potentiation by GABAB receptors. *Science* 252: 1718–1720, 1991.

Moutoussis M, Orrell W. Baclofen therapy for rigidity associated with Lewy body dementia. *Br J Psychiatry J Ment Sci* 169: 795, 1996.

Murakami M, Ohba T, Xu F, Shida S, Satoh E, Ono K, Miyoshi I, Watanabe H, Ito H, Iijima T. Genomic organization and functional analysis of murine PKD2L1. *J Biol Chem* 280: 5626–5635, 2005.

Naderi N, Shafaghi B, Khodayar M-J, Zarindast M-R. Interaction between gamma-aminobutyric acid GABAB and cannabinoid CB1 receptors in spinal pain pathways in rat. *Eur J Pharmacol* 514: 159–164, 2005.

Nagatsu I, Sakai M, Yoshida M, Nagatsu T. Aromaticl-amino acid decarboxylase-immunoreactive neurons in and around the cerebrospinal fluid-contacting neurons of the central canal do not contain dopamine or serotonin in the mouse and rat spinal cord. *Brain Res* 475: 91–102, 1988.

Nakada T. Virchow-Robin space and aquaporin-4: new insights on an old friend. *Croat Med J* 55: 328–336, 2014.

Nakane Y, Shimmura T, Abe H, Yoshimura T. Intrinsic photosensitivity of a deep brain photoreceptor. *Curr Biol CB* 24: R596-597, 2014.

Nakayasu H, Nishikawa M, Mizutani H, Kimura H, Kuriyama K. Immunoaffinity purification and characterization of gamma-aminobutyric acid (GABA)B receptor from bovine cerebral cortex. *J Biol Chem* 268: 8658–8664, 1993.

Nauli SM, Alenghat FJ, Luo Y, Williams E, Vassilev P, Li X, Elia AEH, Lu W, Brown EM, Quinn SJ, Ingber DE, Zhou J. Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat Genet* 33: 129–137, 2003.

Nelson G, Hoon MA, Chandrashekar J, Zhang Y, Ryba NJ, Zuker CS. Mammalian sweet taste receptors. *Cell* 106: 381–390, 2001.

Ng GY, Bertrand S, Sullivan R, Ethier N, Wang J, Yergey J, Belley M, Trimble L, Bateman K, Alder L, Smith A, McKernan R, Metters K, O'Neill GP, Lacaille JC, Hébert TE. Gamma-aminobutyric acid type B receptors with specific heterodimer composition and postsynaptic actions in hippocampal neurons are targets of anticonvulsant gabapentin action. *Mol Pharmacol* 59: 144–152, 2001.

Nichols CG, Lopatin AN. Inward rectifier potassium channels. *Annu Rev Physiol* 59: 171–191, 1997.

Nicholson C. Signals that go with the flow. *Trends Neurosci* 22: 143–145, 1999.

Nicoll RA. My close encounter with GABA(B) receptors. *Biochem Pharmacol* 68: 1667–1674, 2004.

Nilius B. Transient receptor potential (TRP) cation channels: rewarding unique proteins. *Bull Mem Acad R Med Belg* 162: 244–253, 2007.

Nilius B, Owsianik G. The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biol* 12: 218, 2011.

Nurse S, Lacaille JC. Late maturation of GABA(B) synaptic transmission in area CA1 of the rat hippocampus. *Neuropharmacology* 38: 1733–1742, 1999.

O'Brien CF, Seeberger LC, Smith DB. Spasticity after stroke. Epidemiology and optimal treatment. *Drugs Aging* 9: 332–340, 1996.

Obrietan K, van den Pol AN. GABAB receptor-mediated regulation of glutamate-activated calcium transients in hypothalamic and cortical neuron development. *J Neurophysiol* 82: 94–102, 1999.

Ochi J, Hosoya Y. Fluorescence microscopic differentiation of monoamines in the hypothalamus and spinal cord of the lamprey, using a new filter system. *Histochemistry* 40: 263–266, 1974.

Ochi J, Yamamoto T, Hosoya Y. Comparative study of the monoamine neuron system in the spinal cord of the lamprey and hagfish. *Arch Histol Jpn Nihon Soshikigaku Kiroku* 42: 327–336, 1979.

Ochs G, Naumann C, Dimitrijevic M, Sindou M. Intrathecal baclofen therapy for spinal origin spasticity: spinal cord injury, spinal cord disease, and multiple sclerosis. *Neuromodulation J Int Neuromodulation Soc* 2: 108–119, 1999.

O'Connell JE. Cerebrospinal fluid mechanics. *Proc R Soc Med* 63: 507–518, 1970.

Olpe HR, Demiéville H, Baltzer V, Bencze WL, Koella WP, Wolf P, Haas HL. The biological activity of d- and l-baclofen (Lioresal). *Eur J Pharmacol* 52: 133–136, 1978.

Olpe HR, Karlsson G, Pozza MF, Brugger F, Steinmann M, Van Riezen H, Fagg G, Hall RG, Froestl W, Bittiger H. CGP 35348: a centrally active blocker of GABAB receptors. *Eur J Pharmacol* 187: 27–38, 1990.

Olsen RW, DeLorey TM. GABA Receptor Physiology and Pharmacology [Online]. 1999 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK28090/> [29 Jan. 2016].

Ong et al. J. CGP 36216 is a selective antagonist at GABAB presynaptic receptors in rat brain [Online]. 2001. <https://eurekamag.com/pdf/010/010264260.pdf> [8 Oct. 2018].

Orts-Del'immagine A, Kastner A, Tillement V, Tardivel C, Trouslard J, Wanaverbecq N. Morphology, Distribution and Phenotype of Polycystin Kidney Disease 2-like 1-Positive Cerebrospinal Fluid Contacting Neurons in The Brainstem of Adult Mice. *PloS One* 9: e87748, 2014.

Orts-Del'Immagine A, Seddik R, Tell F, Airault C, Er-Raoui G, Najimi M, Trouslard J, Wanaverbecq N. A single polycystic kidney disease 2-like 1 channel opening acts as a spike generator in cerebrospinal fluid-contacting neurons of adult mouse brainstem. *Neuropharmacology* 101: 549–565, 2016.

Orts-Del'Immagine A, Trouslard J, Airault C, Hugnot J-P, Cordier B, Doan T, Kastner A, Wanaverbecq N. Postnatal maturation of mouse medullo-spinal cerebrospinal fluid-contacting neurons. *Neuroscience* 343: 39–54, 2017.

Orts-Del'immagine A, Wanaverbecq N, Tardivel C, Tillement V, Dallaporta M, Trouslard J. Properties of subependymal cerebrospinal fluid contacting neurones in the dorsal vagal complex of the mouse brainstem. *J Physiol* 590: 3719–3741, 2012.

Overholser MD, Whitley JR, O'dell BL, Hogan AG. The ventricular system in hydrocephalic rat brains produced by a deficiency of vitamin B12 or of folic acid in the maternal diet. *Anat Rec* 120: 917–933, 1954.

Owen JM, Quinn CC, Leach R, Findlay JBC, Boyett MR. Effect of Extracellular Cations on the Inward Rectifying K⁺ Channels Kir2.1 and Kir3.1/Kir3.4. *Exp Physiol* 84: 471–488, 1999.

Pacey LKK, Heximer SP, Hampson DR. Increased GABA(B) receptor-mediated signaling reduces the susceptibility of fragile X knockout mice to audiogenic seizures. *Mol Pharmacol* 76: 18–24, 2009.

Pagano A, Rovelli G, Mosbacher J, Lohmann T, Duthey B, Stauffer D, Ristig D, Schuler V, Meigel I, Lampert C, Stein T, Prezeau L, Blahos J, Pin J, Froestl W, Kuhn R, Heid J, Kaupmann K, Bettler B. C-terminal interaction is essential for surface trafficking but not for heteromeric assembly of GABA(b) receptors. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 21: 1189–1202, 2001.

Parada C, Gato A, Aparicio M, Bueno D. Proteome analysis of chick embryonic cerebrospinal fluid. *PROTEOMICS* 6: 312–320, 2006.

Parada C, Gato Á, Bueno D. Mammalian Embryonic Cerebrospinal Fluid Proteome Has Greater Apolipoprotein and Enzyme Pattern Complexity than the Avian Proteome. *J Proteome Res* 4: 2420–2428, 2005.

Pardridge WM. Drug transport in brain via the cerebrospinal fluid. *Fluids Barriers CNS* 8: 7, 2011.

Parent A, Northcutt RG. The monoamine-containing neurons in the brain of the garfish, *Lepisosteus osseus*. *Brain Res Bull* 9: 189–204, 1982.

Park H-C, Shin J, Appel B. Spatial and temporal regulation of ventral spinal cord precursor specification by Hedgehog signaling. *Dev Camb Engl* 131: 5959–5969, 2004.

Patel SM, Ebenezer IS. The effects of intraperitoneal and intracerebroventricular administration of the GABAB receptor antagonist CGP 35348 on food intake in rats. *Eur J Pharmacol* 503: 89–93, 2004.

Penn RD, Kroin JS. Long-term intrathecal baclofen infusion for treatment of spasticity. *J Neurosurg* 66: 181–185, 1987.

Penn RD, Savoy SM, Corcos D, Latash M, Gottlieb G, Parke B, Kroin JS. Intrathecal baclofen for severe spinal spasticity. *N Engl J Med* 320: 1517–1521, 1989.

Pérez J, Garrido O, Cifuentes M, Alonso FJ, Estivill-Torrús G, Eller G, Nualart F, López-Avalos MD, Fernández-Llebrez P, Rodríguez EM. Bovine Reissner's fiber (RF) and the central canal of the spinal cord: an immunocytochemical study using a set of monoclonal antibodies against the RF-glycoproteins. *Cell Tissue Res* 286: 33–42, 1996.

Pérez-Fígares JM, Jimenez AJ, Rodríguez EM. Subcommissural organ, cerebrospinal fluid circulation, and hydrocephalus. *Microsc Res Tech* 52: 591–607, date unknown.

Petracca YL, Sartoretti MM, Bella DJD, Marin-Burgin A, Carcagno AL, Schinder AF, Lanuza GM. The late and dual origin of cerebrospinal fluid-contacting neurons in the mouse spinal cord. *Development* dev.129254, 2016.

Pibiri F, Carboni G, Carai MAM, Gessa GL, Castelli MP. Up-regulation of GABA(B) receptors by chronic administration of the GABA(B) receptor antagonist SCH 50,911. *Eur J Pharmacol* 515: 94–98, 2005.

Pierre J, Mahouche M, Suderevskaya EI, Repérant J, Ward R. Immunocytochemical localization of dopamine and its synthetic enzymes in the central nervous system of the lamprey *Lampetra fluviatilis*. *J Comp Neurol* 380: 119–135, 1997.

Pilc A, Lloyd KG. Chronic antidepressants and GABA “B” receptors: a GABA hypothesis of antidepressant drug action. *Life Sci* 35: 2149–2154, 1984.

Pinard A, Seddik R, Bettler B. GABAB receptors: physiological functions and mechanisms of diversity. *Adv Pharmacol San Diego Calif* 58: 231–255, 2010.

Pollay M, Curl F. Secretion of cerebrospinal fluid by the ventricular ependyma of the rabbit. *Am J Physiol* 213: 1031–1038, 1967.

Pombal MA, El Manira A, Grillner S. Afferents of the lamprey striatum with special reference to the dopaminergic system: a combined tracing and immunohistochemical study. *J Comp Neurol* 386: 71–91, 1997.

Potes CS, Neto FL, Castro-Lopes JM. Administration of baclofen, a gamma-aminobutyric acid type B agonist in the thalamic ventrobasal complex, attenuates allodynia in monoarthritic rats subjected to the ankle-bend test. *J Neurosci Res* 83: 515–523, 2006.

Pozza MF, Manuel NA, Steinmann M, Froestl W, Davies CH. Comparison of antagonist potencies at pre- and post-synaptic GABAB receptors at inhibitory synapses in the CA1 region of the rat hippocampus. *Br J Pharmacol* 127: 211–219, 1999.

Prosser HM, Gill CH, Hirst WD, Grau E, Robbins M, Calver A, Soffin EM, Farmer CE, Lanneau C, Gray J, Schenck E, Warmerdam BS, Clapham C, Reavill C, Rogers DC, Stean T, Upton N, Humphreys K, Randall A, Geppert M, Davies CH, Pangalos MN. Epileptogenesis and enhanced prepulse inhibition in GABA(B1)-deficient mice. *Mol Cell Neurosci* 17: 1059–1070, 2001.

Przesmycki K, Dzieciuch JA, Czuczwar SJ, Kleinrok Z. An isobolographic analysis of drug interaction between intrathecal clonidine and baclofen in the formalin test in rats. *Neuropharmacology* 37: 207–214, 1998.

Qu L, Boyce R, Leung LS. Seizures in the developing brain result in a long-lasting decrease in GABA(B) inhibitory postsynaptic currents in the rat hippocampus. *Neurobiol Dis* 37: 704–710, 2010.

Quan FB, Dubessy C, Galant S, Kenigfest NB, Djenoune L, Leprince J, Wyart C, Lihmann I, Tostivint H. Comparative Distribution and In Vitro Activities of the Urotensin II-Related Peptides URP1 and URP2 in Zebrafish: Evidence for Their Colocalization in Spinal Cerebrospinal Fluid-Contacting Neurons. *PLoS ONE* 10, 2015.

Ramsey IS, Delling M, Clapham DE. An Introduction to Trp Channels. *Annu Rev Physiol* 68: 619–647, 2006.

Rane MJ, Gozal D, Butt W, Gozal E, Pierce WM, Guo SZ, Wu R, Goldbart AD, Thongboonkerd V, McLeish KR, Klein JB. Gamma-amino butyric acid type B receptors stimulate neutrophil chemotaxis during ischemia-reperfusion. *J Immunol Baltim Md 1950* 174: 7242–7249, 2005.

Rapidi C-A, Panourias IG, Petropoulou K, Sakas DE. Management and rehabilitation of neuropathic bladder in patients with spinal cord lesion. In: *Operative Neuromodulation: Volume 1: Functional Neuroprosthetic Surgery. An Introduction*, edited by Sakas DE, Simpson BA, Krames ES. Springer Vienna, p. 307–314.

Rawlins P. Patient management of cerebral origin spasticity with intrathecal baclofen. *J Neurosci Nurs J Am Assoc Neurosci Nurses* 30: 32–5, 40–6, 1998.

Realí C, Fernández A, Radmilovich M, Trujillo-Cenóz O, Russo RE. GABAergic signalling in a neurogenic niche of the turtle spinal cord. *J Physiol* 589: 5633–5647, 2011.

Reiber H. Proteins in cerebrospinal fluid and blood: barriers, CSF flow rate and source-related dynamics. *Restor Neurol Neurosci* 21: 79–96, 2003.

Reimann F, Ashcroft FM. Inwardly rectifying potassium channels. *Curr Opin Cell Biol* 11: 503–508, 1999.

Riley RC, Trafton JA, Chi SI, Basbaum AI. Presynaptic regulation of spinal cord tachykinin signaling via GABA(B) but not GABA(A) receptor activation. *Neuroscience* 103: 725–737, 2001.

Robbins MJ, Calver AR, Filippov AK, Hirst WD, Russell RB, Wood MD, Nasir S, Couve A, Brown DA, Moss SJ, Pangalos MN. GABAB2 Is Essential for G-Protein Coupling of the GABAB Receptor Heterodimer. *J Neurosci* 21: 8043–8052, 2001.

Roberts A, Clarke JD. The neuroanatomy of an amphibian embryo spinal cord. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 296: 195–212, 1982.

Roberts BL, Maslam S, Scholten G, Smit W. Dopaminergic and GABAergic cerebrospinal fluid-contacting neurons along the central canal of the spinal cord of the eel and trout. *J Comp Neurol* 354: 423–437, 1995.

Roberts BL, Meredith GE. Immunohistochemical study of a dopaminergic system in the spinal cord of the ray, *Raja radiata*. *Brain Res* 437: 171–175, 1987.

Roberts BL, Meredith GE, Maslam S. Immunocytochemical analysis of the dopamine system in the brain and spinal cord of the European eel, *Anguilla anguilla*. *Anat Embryol (Berl)* 180: 401–412, 1989.

Roberts DC, Andrews MM. Baclofen suppression of cocaine self-administration: demonstration using a discrete trials procedure. *Psychopharmacology (Berl)* 131: 271–277, 1997.

Roberts E, Frankel S. gamma-Aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid. *J Biol Chem* 187: 55–63, 1950.

Rodicio MC, Villar-Cerviño V, Barreiro-Iglesias A, Anadón R. Colocalization of dopamine and GABA in spinal cord neurones in the sea lamprey. *Brain Res Bull* 76: 45–49, 2008.

Rodríguez EM, Oksche A, Montecinos H. Human subcommissural organ, with particular emphasis on its secretory activity during the fetal life. *Microsc Res Tech* 52: 573–590, date unknown.

Rotheram-Fuller E, Garza RDL, Mahoney JJ, Shoptaw S, Newton TF. Subjective and cardiovascular effects of cocaine during treatment with amantadine and baclofen in combination. *Psychiatry Res* 152: 205–210, 2007.

Ruiz Y, Pombal MA, Megías M. Development of GABA-immunoreactive cells in the spinal cord of the sea lamprey, *P. marinus*. *J Comp Neurol* 470: 151–163, 2004.

Sabelström H, Stenudd M, Réu P, Dias DO, Elfineh M, Zdunek S, Damberg P, Göritz C, Frisé J. Resident neural stem cells restrict tissue damage and neuronal loss after spinal cord injury in mice. *Science* 342: 637–640, 2013.

Sabourin J-C, Ackema KB, Ohayon D, Guichet P-O, Perrin FE, Garces A, Ripoll C, Charité J, Simonneau L, Kettenmann H, Zine A, Privat A, Valmier J, Pattyn A, Hugnot J-P. A mesenchymal-like ZEB1(+) niche harbors dorsal radial glial fibrillary acidic protein-positive stem cells in the spinal cord. *Stem Cells Dayt Ohio* 27: 2722–2733, 2009.

Sako H, Kojima T, Okado N. Immunohistochemical study on the development of serotonergic neurons in the chick: II. Distribution of cell bodies and fibers in the spinal cord. *J Comp Neurol* 253: 79–91, 1986.

Sanger GJ, Munonyara ML, Dass N, Prosser H, Pangalos MN, Parsons ME. GABA(B) receptor function in the ileum and urinary bladder of wildtype and GABA(B1) subunit null mice. *Auton Autacoid Pharmacol* 22: 147–154, 2002.

Santicioli P. GABAA and GABAB receptors modulate the K(+)-evoked release of sensory CGRP from the guinea pig urinary bladder. - PubMed - NCBI [Online]. 1991.<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1849214> [10 Oct. 2018].

Sawamoto K, Wichterle H, Gonzalez-Perez O, Cholfin JA, Yamada M, Spassky N, Murcia NS, Garcia-Verdugo JM, Marin O, Rubenstein JLR, Tessier-Lavigne M, Okano H, Alvarez-Buylla A. New Neurons Follow the Flow of Cerebrospinal Fluid in the Adult Brain. *Science* 311: 629–632, 2006.

Sawynok J, Dickson C. D-baclofen: Is it an antagonist at baclofen receptors? *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 8: 729–731, 1984.

Sawynok J, Dickson C. D-Baclofen Is an Antagonist at Baclofen Receptors Mediating Antinociception in the Spinal Cord. *Pharmacology* 31: 248–259, 1985.

Scheinberg A. Oral baclofen in children with cerebral palsy: a double-blind cross-over pilot study. - PubMed - NCBI [Online]. 2006.<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Scheinberg+2006+%2B+Baclofen> [10 Oct. 2018].

Schotland J, Shupliakov O, Wikström M, Brodin L, Srinivasan M, You ZB, Herrera-Marschitz M, Zhang W, Hökfelt T, Grillner S. Control of lamprey locomotor neurons by colocalized monoamine transmitters. *Nature* 374: 266–268, 1995.

Schotland JL, Shupliakov O, Grillner S, Brodin L. Synaptic and nonsynaptic monoaminergic neuron systems in the lamprey spinal cord. *J Comp Neurol* 372: 229–244, 1996.

Schueren AM, DeSantis M. Cellular heterogeneity in the ependymal layer of the chicken's lumbosacral spinal cord. *Exp Neurol* 87: 387–391, 1985.

Schuler V, Luscher C, Blanchet C, Klix N, Sansig G, Klebs K, Schmutz M, Heid J, Gentry C, Urban L, Fox A, Spooren W, Jatou AL, Vigouret J, Pozza M, Kelly PH, Mosbacher J, Froestl W, Kaslin E, Korn R, Bischoff S, Kaupmann K, van der Putten H, Bettler B. Epilepsy, hyperalgesia, impaired memory, and loss of pre- and postsynaptic GABA(B) responses in mice lacking GABA(B1). *Neuron* 31: 47–58, 2001.

Schwander M, Kachar B, Müller U. The cell biology of hearing. *J Cell Biol* 190: 9–20, 2010.

Schwartz GJ, Moran TH. Leptin and neuropeptide y have opposing modulatory effects on nucleus of the solitary tract neurophysiological responses to gastric loads: implications for the control of food intake. *Endocrinology* 143: 3779–3784, 2002.

Seitz R, Löhler J, Schwendemann G. Ependyma and meninges of the spinal cord of the mouse. A light- and electron-microscopic study. *Cell Tissue Res* 220: 61–72, 1981.

Seki T, Arai Y. Highly polysialylated NCAM expression in the developing and adult rat spinal cord. *Brain Res Dev Brain Res* 73: 141–145, 1993.

Sekiguchi M, Sakuta H, Okamoto K, Sakai Y. GABAB receptors expressed in *Xenopus* oocytes by guinea pig cerebral mRNA are functionally coupled with Ca²⁺-dependent Cl⁻ channels and with K⁺ channels, through GTP-binding proteins. *Brain Res Mol Brain Res* 8: 301–309, 1990.

Shimosegawa T, Koizumi M, Toyota T, Goto Y, Yanaihara C, Yanaihara N. An immunohistochemical study of methionine-enkephalin-Arg6-Gly7-Leu8-like immunoreactivity-containing liquor-contacting neurons (LCNs) in the rat spinal cord. *Brain Res* 379: 1–9, 1986.

Sims TJ. The development of monoamine-containing neurons in the brain and spinal cord of the salamander, *Ambystoma mexicanum*. *J Comp Neurol* 173: 319–336, 1977.

Skinner DC, Caraty A, Malpaux B, Evans NP. Simultaneous measurement of gonadotropin-releasing hormone in the third ventricular cerebrospinal fluid and hypophyseal portal blood of the ewe. *Endocrinology* 138: 4699–4704, 1997.

Skinner DC, Malpaux B. High melatonin concentrations in third ventricular cerebrospinal fluid are not due to Galen vein blood recirculating through the choroid plexus. *Endocrinology* 140: 4399–4405, 1999.

Skipor J, Thiery J-C. The choroid plexus--cerebrospinal fluid system: undervalued pathway of neuroendocrine signaling into the brain. *Acta Neurobiol Exp (Warsz)* 68: 414–428, 2008.

Smith GD, Harrison SM, Birch PJ, Elliott PJ, Malcangio M, Bowery NG. Increased sensitivity to the antinociceptive activity of (\pm)-baclofen in an animal model of chronic neuropathic, but not chronic inflammatory hyperalgesia. *Neuropharmacology* 33: 1103–1108, 1994.

Smith PM, Brzezinska P, Hubert F, Mimee A, Maurice DH, Ferguson AV. Leptin influences the excitability of area postrema neurons. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 310: R440-448, 2016.

Stoeckel M-E, Uhl-Bronner S, Hugel S, Veinante P, Klein M-J, Mutterer J, Freund-Mercier M-J, Schlichter R. Cerebrospinal fluid-contacting neurons in the rat spinal cord, a gamma-aminobutyric acidergic system expressing the P2X2 subunit of purinergic receptors, PSA-NCAM, and GAP-43 immunoreactivities: light and electron microscopic study. *J Comp Neurol* 457: 159–174, 2003.

Straughan DW, Neal MJ, Simmonds MA, Collins GG, Hill RG. Evaluation of bicuculline as a GABA antagonist. *Nature* 233: 352–354, 1971.

Sueiro C, Carrera I, Molist P, Rodríguez-Moldes I, Anadón R. Distribution and development of glutamic acid decarboxylase immunoreactivity in the spinal cord of the dogfish *Scyliorhinus canicula* (elasmobranchs). *J Comp Neurol* 478: 189–206, 2004.

Taira T, Kawamura H, Tanikawa T, Iseki H, Kawabatake H, Takakura K. A new approach to control central deafferentation pain: spinal intrathecal baclofen. *Stereotact Funct Neurosurg* 65: 101–105, 1995.

Tanaka K, Smith CA. Structure of the chicken's inner ear: SEM and TEM study. *Am J Anat* 153: 251–271, 1978.

Terrence CF, Fromm GH, Tenicela R. Baclofen as an analgesic in chronic peripheral nerve disease. *Eur Neurol* 24: 380–385, 1985.

Terrence CF, Sax M, Fromm GH, Chang CH, Yoo CS. Effect of baclofen enantiomorphs on the spinal trigeminal nucleus and steric similarities of carbamazepine. *Pharmacology* 27: 85–94, 1983.

Thomas DA, Navarrete IM, Graham BA, McGowan MK, Hammond DL. Antinociception produced by systemic R(+)-baclofen hydrochloride is attenuated by CGP 35348 administered to the spinal cord or ventromedial medulla of rats. *Brain Res* 718: 129–137, 1996.

Travagli RA. Neurons in the dorsal vagal complex may be more tasteful than expected. *J Physiol* 590: 3637–3638, 2012.

Travagli RA, Hermann GE, Browning KN, Rogers RC. Brainstem circuits regulating gastric function. *Annu Rev Physiol* 68: 279–305, 2006.

Trujillo-Cenóz O, Fernández A, Radmilovich M, Reali C, Russo RE. Cytological organization of the central gelatinosa in the turtle spinal cord. *J Comp Neurol* 502: 291–308, 2007.

Tsuchiya D, Kunishima N, Kamiya N, Jingami H, Morikawa K. Structural views of the ligand-binding cores of a metabotropic glutamate receptor complexed with an antagonist and both glutamate and Gd³⁺. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 2660–2665, 2002.

Turgeon SM, Albin RL. GABAB binding sites in early adult and aging rat brain. *Neurobiol Aging* 15: 705–711, 1994.

Turkyilmaz A, Eroglu A. Use of baclofen in the treatment of esophageal stent-related hiccups. *Ann Thorac Surg* 85: 328–330, 2008.

Twycross R. Baclofen for hiccups. *Am J Hosp Palliat Care* 20: 262; author reply 262–262; author reply 262, 2003.

Uematsu K, Shirasaki M, Storm-Mathisen J. GABA- and glycine-immunoreactive neurons in the spinal cord of the carp, *Cyprinus carpio*. *J Comp Neurol* 332: 59–68, 1993.

Urwyler S, Gjoni T, Koljatić J, Dupuis DS. Mechanisms of allosteric modulation at GABAB receptors by CGP7930 and GS39783: effects on affinities and efficacies of orthosteric ligands with distinct intrinsic properties. *Neuropharmacology* 48: 343–353, 2005.

Urwyler S, Mosbacher J, Lingenhoehl K, Heid J, Hofstetter K, Froestl W, Bettler B, Kaupmann K. Positive allosteric modulation of native and recombinant gamma-aminobutyric acid(B) receptors by 2,6-Di-tert-butyl-4-(3-hydroxy-2,2-dimethyl-propyl)-phenol (CGP7930) and its aldehyde analog CGP13501. *Mol Pharmacol* 60: 963–971, 2001.

Van Setten GB, Edström L, Stibler H, Rasmussen S, Schultz G. Levels of transforming growth factor alpha (TGF-alpha) in human cerebrospinal fluid. *Int J Dev Neurosci Off J Int Soc Dev Neurosci* 17: 131–134, 1999.

Venkatachalam K, Montell C. TRP Channels. *Annu Rev Biochem* 76: 387–417, 2007.

Vergnes M, Boehrer A, Simler S, Bernasconi R, Marescaux C. Opposite effects of GABAB receptor antagonists on absences and convulsive seizures. *Eur J Pharmacol* 332: 245–255, 1997.

Vígh B, Manzano e Silva MJ, Frank CL, Vincze C, Czirok SJ, Szabó A, Lukáts A, Szél A. The system of cerebrospinal fluid-contacting neurons. Its supposed role in the nonsynaptic signal transmission of the brain. *Histol Histopathol* 19: 607–628, 2004.

Vígh B, Teichmann I, Aros B. [The paraventricular organ and liquor contact-neuron system]. *Verh Anat Ges* 63: 683–688, 1969.

Vígh B, Vígh-Teichmann I. Structure of the medullo-spinal liquor-contacting neuronal system. *Acta Biol Acad Sci Hung* 22: 227–243, 1971.

Vígh B, Vígh-Teichmann I. Comparative ultrastructure of the cerebrospinal fluid-contacting neurons. *Int Rev Cytol* 35: 189–251, 1973.

Vígh B, Vígh-Teichmann I. Light- and electron-microscopic demonstration of immunoreactive opsin in the pinealocytes of various vertebrates. *Cell Tissue Res* 221: 451–463, 1981.

Vigh B, Vigh-Teichmann I. Actual problems of the cerebrospinal fluid-contacting neurons. *Microsc Res Tech* 41: 57–83, 1998.

Vigh B, Vigh-Teichmann I, Aros B. [Ultrastructure of the CSF contacting neurons of the central canal of the spinal cord in the carp (*Cyprinus carpio*)]. *Z Zellforsch Mikrosk Anat Vienna Austria 1948* 122: 301–309, 1971a.

Vigh B, Vigh-Teichmann I, Aros B. [Ultrastructure of the spinal liquor contacting neurons in the clawed toad (*Xenopus laevis*)]. *Z Zellforsch Mikrosk Anat Vienna Austria 1948* 112: 201–211, 1971b.

Vigh B, Vigh-Teichmann I, Aros B. Intraependymal cerebrospinal fluid contacting neurons and axon terminals on the external surface in the filum terminale of the carp (*Cyprinus carpio*). *Cell Tissue Res* 148: 359–370, 1974.

Vigh B, Vigh-Teichmann I, Aros B. Special dendritic and axonal endings formed by the cerebrospinal fluid contacting neurons of the spinal cord. *Cell Tissue Res* 183: 541–552, 1977.

Vigh B, Vigh-Teichmann I, Koritsánszky S, Aros B. Ultrastructure of the spinal CSF contacting neuronal system in the white leghorn chicken. *Acta Morphol Acad Sci Hung* 19: 9–24, 1971c.

Vigh B, Vigh-Teichmann I, Manzano e Silva MJ, van den Pol AN. Cerebrospinal fluid-contacting neurons of the central canal and terminal ventricle in various vertebrates. *Cell Tissue Res* 231: 615–621, 1983.

Vigh-Teichmann I, Vigh B, Aros B. Ultrastructure of the CSF contacting neurons of the preoptic nucleus in the newt, *Triturus cristatus*. *Acta Morphol Acad Sci Hung* 18: 383–394, 1970.

Vigot R, Barbieri S, Bräuner-Osborne H, Turecek R, Shigemoto R, Zhang Y-P, Luján R, Jacobson LH, Biermann B, Fritschy J-M, Vacher C-M, Müller M, Sansig G, Guetg N, Cryan JF, Kaupmann K, Gassmann M, Oertner TG, Bettler B. Differential compartmentalization and distinct functions of GABAB receptor variants. *Neuron* 50: 589–601, 2006.

Villar-Cerviño V, Holstein GR, Martinelli GP, Anadón R, Rodicio MC. Glycine-immunoreactive neurons in the developing spinal cord of the sea lamprey: Comparison with the γ -aminobutyric acidergic system. *J Comp Neurol* 508: 112–130, 2008.

Vinay L, Barthe JY, Grillner S. Central modulation of stretch receptor neurons during fictive locomotion in lamprey. *J Neurophysiol* 76: 1224–1235, 1996.

Vio K, Rodríguez S, Yulis CR, Oliver C, Rodríguez EM. The subcommissural organ of the rat secretes Reissner's fiber glycoproteins and CSF-soluble proteins reaching the internal and external CSF compartments. *Cerebrospinal Fluid Res* 5: 3, 2008.

Wallace JA, Mondragon RM, Allgood PC, Hoffman TJ, Maez RR. Two populations of tyrosine hydroxylase-positive cells occur in the spinal cord of the chick embryo and hatchling. *Neurosci Lett* 83: 253–258, 1987.

Wellendorph P, Høg S, Greenwood JR, de Lichtenberg A, Nielsen B, Frølund B, Brehm L, Clausen RP, Bräuner-Osborne H. Novel cyclic gamma-hydroxybutyrate (GHB)

analogs with high affinity and stereoselectivity of binding to GHB sites in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* 315: 346–351, 2005.

Wellendorph P, Høg S, Skonberg C, Bräuner-Osborne H. Phenylacetic acids and the structurally related non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac bind to specific gamma-hydroxybutyric acid sites in rat brain. *Fundam Clin Pharmacol* 23: 207–213, 2009.

Wersall J. Studies on the structure and innervation of the sensory epithelium of the cristae ampullares in the guinea pig; a light and electron microscopic investigation. *Acta Oto-Laryngol Suppl* 126: 1–85, 1956.

Wilcox KS, Dichter MA. Paired pulse depression in cultured hippocampal neurons is due to a presynaptic mechanism independent of GABAB autoreceptor activation. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 14: 1775–1788, 1994.

Wong CGT, Gibson KM, Snead OC. From the street to the brain: neurobiology of the recreational drug gamma-hydroxybutyric acid. *Trends Pharmacol Sci* 25: 29–34, 2004.

Wyart C, Del Bene F, Warp E, Scott EK, Trauner D, Baier H, Isacoff EY. Optogenetic dissection of a behavioural module in the vertebrate spinal cord. *Nature* 461: 407–410, 2009.

Xi ZX, Stein EA. Baclofen inhibits heroin self-administration behavior and mesolimbic dopamine release. *J Pharmacol Exp Ther* 290: 1369–1374, 1999.

Xie L, Kang H, Xu Q, Chen MJ, Liao Y, Thiyagarajan M, O'Donnell J, Christensen DJ, Nicholson C, Iliff JJ, Takano T, Deane R, Nedergaard M. Sleep Drives Metabolite Clearance from the Adult Brain. *Science* 342, 2013.

Yamada M, Inanobe A, Kurachi Y. G protein regulation of potassium ion channels. *Pharmacol Rev* 50: 723–760, 1998.

Yang L, Rastegar S, Strähle U. Regulatory interactions specifying Kolmer-Agduhr interneurons. *Dev Camb Engl* 137: 2713–2722, 2010.

Yeo S-Y, Chitnis AB. Jagged-mediated Notch signaling maintains proliferating neural progenitors and regulates cell diversity in the ventral spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 5913–5918, 2007.

Yu Y, Ulbrich MH, Li M-H, Dobbins S, Zhang WK, Tong L, Isacoff EY, Yang J. Molecular mechanism of the assembly of an acid-sensing receptor ion channel complex. *Nat Commun* 3: 1252, 2012.

Yulis CR, Lederis K. Extraurophyseal distribution of urotensin II immunoreactive neuronal perikarya and their processes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 7079–7083, 1986.

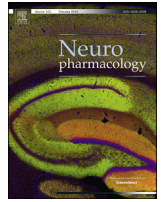
Yulis CR, Lederis K. Relationship between urotensin II- and somatostatin-immunoreactive spinal cord neurons of *Catostomus commersoni* and *Oncorhynchus kisutch* (Teleostei). *Cell Tissue Res* 254: 539–542, 1988a.

Yulis CR, Lederis K. Occurrence of an anterior spinal, cerebrospinal fluid-contacting, urotensin II neuronal system in various fish species. *Gen Comp Endocrinol* 70: 301–311, 1988b.

Zhang Y, Narayan S, Geiman E, Lanuza GM, Velasquez T, Shanks B, Akay T, Dyck J, Pearson K, Gosgnach S, Fan C-M, Goulding M. V3 spinal neurons establish a robust and balanced locomotor rhythm during walking. *Neuron* 60: 84–96, 2008.

Zheng W, Hussein S, Yang J, Huang J, Zhang F, Hernandez-Anzaldo S, Fernandez-Patron C, Cao Y, Zeng H, Tang J, Chen X-Z. A novel PKD2L1 C-terminal domain critical for trimerization and channel function. *Sci Rep* 5, 2015.

X. Annexes 1: A single polycystic kidney disease 2-like 1 channel opening acts as a spike generator in cerebrospinal fluid-contacting neurons of adult mouse brainstem



A single polycystic kidney disease 2-like 1 channel opening acts as a spike generator in cerebrospinal fluid-contacting neurons of adult mouse brainstem



Adeline Orts-Del'Imagine^a, Riad Seddik^a, Fabien Tell^b, Coraline Airault^a, Ghizlane Er-Raoui^{a,c}, Mohamed Najimi^c, Jérôme Trouslard^{a,**}, Nicolas Wanaverbecq^{a,*}

^a Aix Marseille Université, PPSN EA 4674, 13397, Marseille, France

^b Aix Marseille Université, CNRS, CRN2M UMR 7286, 13344, Marseille, France

^c Université Sultan Moulay Slimane, 23000, Béni Mellal, Morocco

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 April 2015

Received in revised form

3 July 2015

Accepted 24 July 2015

Available online 26 July 2015

CHEMICAL COMPOUNDS:

Acetylcholine (PubChem CID: 187)

α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) (PubChem CID: 158397)

DL-2-amino-5-phosphonopentanoic acid sodium salt (AP-5) (PubChem CID: 1216)

6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione disodium salt (DNQX) (PubChem CID: 45073428)

Gama-Amino butyric acid (GABA) (PubChem CID: 119)

Gabazine (SR-95531) (PubChem CID: 107896)

Glutamate (PubChem CID: 33032)

Kainate (PubChem CID: 22880)

N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) (PubChem CID: 22880)

D-Tubocurarine (D-TC) (PubChem CID: 16000)

Keywords:

Cerebrospinal fluid contacting neurons

Sensory

Alkalinization

PKD2L1

ASIC

AMPA

Kainate

nAChRs

Brainstem

ABSTRACT

Cerebrospinal fluid contacting neurons (CSF-cNs) are found around the central canal of all vertebrates. They present a typical morphology, with a single dendrite that projects into the cavity and ends in the CSF with a protuberance. These anatomical features have led to the suggestion that CSF-cNs might have sensory functions, either by sensing CSF movement or composition, but the physiological mechanisms for any such role are unknown. This hypothesis was recently supported by the demonstration that in several vertebrate species medullo-spinal CSF-cNs selectively express Polycystic Kidney Disease 2-Like 1 proteins (PKD2L1). PKD2L1 are members of the 'transient receptor potential (TRP)' superfamily, form non-selective cationic channels of high conductance, are regulated by various stimuli including protons and are therefore suggested to act as sensory receptors.

Using patch-clamp whole-cell recordings of CSF-cNs in brainstem slices obtained from wild type and mutant PKD2L1 mice, we demonstrate that spontaneously active unitary currents in CSF-cNs are due to PKD2L1 channels that are capable, with a single opening, of triggering action potentials. Thus PKD2L1 might contribute to the setting of CSF-cN spiking activity. We also reveal that CSF-cNs have the capacity of discriminating between alkalinization and acidification following activation of specific conductances (PKD2L1 vs. ASIC) generating specific responses. Altogether, this study reinforces the idea that CSF-cNs represent sensory neurons intrinsic to the central nervous system and suggests a role for PKD2L1 channels as spike generators.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

* Corresponding author.

** Corresponding author.

E-mail addresses: Jerome.trouslard@univ-amu.fr (J. Trouslard), nicolas.wanaverbecq@univ-amu.fr (N. Wanaverbecq).

1. Introduction

Medullo-spinal cerebrospinal fluid contacting neurons (CSF-cNs) are present around the ependymal layer along the central canal from the *filum terminale* to the brainstem of all vertebrates examined so far (Vigh et al., 2004). CSF-cNs are GABAergic neurons and have a characteristic morphology with a unique dendrite that ends in the CSF with a ciliated protuberance (Vigh et al., 1983; Shimosegawa et al., 1986; Bruni and Reddy, 1987; Dale et al., 1987; Stoeckel et al., 2003; Orts-Del'Immagine et al., 2014). Although, little information is available regarding their function(s), CSF-cNs were suggested to have sensory functions by sensing either CSF movement within the central canal or variations in its composition, notably its pH (Huang et al., 2006). To support this hypothesis, recent data demonstrated that the Polycystic Kidney Disease 2-Like 1 protein (PKD2L1), a channel with putative sensory functions (Nauli et al., 2003; Huang et al., 2006; Shimizu et al., 2009), represented a selective marker for medullo-spinal CSF-cNs in several vertebrate species (Djenoune et al., 2014; Orts-Del'Immagine et al., 2014).

PKD2L1 (or TRPP3 and initially named Polycystin-L) is a member of the polycystin family of TRP proteins (Clapham et al., 2010). Mutations of *pkd1* and *pkd2* genes coding for, polycystin-1 and polycystin-2, respectively, account for almost all cases of autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD), the most common form of inherited polycystic kidney disease (Harris and Torres, 2014). *pkd2l1* and *pkd2l2* are two homologs of the *pkd2* gene identified so far (Veldhuisen et al., 1999; Wu et al., 1998) but are unlikely to be directly linked to ADPKD (Basora et al., 2002; Nomura et al., 1998). Although the functional role of PKD2L1 is still unclear, it was suggested that PKD2L1 might be involved in sensory physiology. Indeed, PKD2L1 has a wide expression pattern especially in several brain nuclei and sensory organs such as retina, taste bud and inner ear (Basora et al., 2002; Huang et al., 2006; Ishimaru et al., 2006; Lopezjimenez et al., 2006; Cuajungco et al., 2007; Li et al., 2007; Takumida and Anniko, 2010). Second, in expression systems, PKD2L1 forms a non-selective cationic channel of high conductance and was shown to be regulated by several stimuli such as: voltage, calcium (Chen et al., 1999; Liu et al., 2002), protons (Shimizu et al., 2011), extracellular osmolarity (Shimizu et al., 2009) and temperature (Higuchi et al., 2014). Finally, the levels of channel insertion in the plasma membrane as well as its functional properties were shown to depend on its

association with other proteins in particular of the polycystin 1 type (Inada et al., 2008; Ishii et al., 2009; DeCaen et al., 2013; Delling et al., 2013).

In murine medullary CSF-cNs, we recently reported the presence of a spontaneously active unitary current bearing all the functional properties of PKD2L1 currents and we suggested that its activation could modulate CSF-cN excitability (Orts-Del'Immagine et al., 2012). Nevertheless, the nature of the channels expressed in CSF-cNs could not be definitively demonstrated because of the lack of a selective blocker for PKD2L1 channels.

Here, using patch-clamp recording techniques on brainstem slices prepared from PKD2L1 mice lacking the channel and their wild type littermates (Horio et al., 2011), we demonstrate that functional PKD2L1 channels are indeed expressed in CSF-cNs. They are capable, at a single channel level, to generate a depolarization large enough to trigger action potentials and would act as spike generator. They play a role in the setting of basal excitability and in sensing extracellular variations in pH. Finally, and because of the lack of any excitatory synaptic entries, PKD2L1 appears to represent an important excitatory input to these peculiar neurons.

2. Materials and methods

2.1. Animals

PKD2L1^{+/+} (wild type) and PKD2L1^{-/-} (mutant) mice were obtained by breeding heterozygous PKD2L1^{+/-} mice (B6.Cg-Pkd2l1tm1.1^{Yuni}/J; <http://jaxmice.jax.org/strain/016853.html> and Horio et al., 2011) while PKD2L1:EGFP transgenic mice were obtained by crossing PKD2L1-IRES-Cre with Z/EG reporter transgenic mice (Huang et al., 2006; Orts-Del'Immagine et al., 2012). All animals were housed at constant temperature (21 °C) under a standard 12 h light–12 h dark cycle, with food (pellet AO4, UAR, Villemoisson-sur-Orge, France) and water provided *ad libitum*. Experiments were conducted in conformity with the rules set by the EC Council Directive (2010/63/UE) and the French “Direction Départementale de la Protection des Populations des Bouches-du-Rhône” (licence N°13.435 held by JT and N°13.430 by NW). Every precaution was taken to minimize animal stress as well as the number of animals used. All our experiments were conducted on animals whose genotype was determined following PCR on DNA extracted from the tail to assess EGFP and CRE expression or PKD2L1^{+/+} (wild type) and PKD2L1^{-/-} genotype (see Table 1 for details). The breeding of heterozygous PKD2L1^{+/-} mice also

Table 1

Summary of the experimental procedure used for PCR on tail genomic DNA. Table indicating the sequence of the sense and antisense primers used in our PCR experiments to determine the genotype of PKD2L1^{+/+} (wild type) and PKD2L1^{-/-} mice (mutant see B6.Cg-Pkd2l1tm1.1^{Yuni}/J; <http://jaxmice.jax.org/strain/016853.html> and Horio et al., 2011) as well as of the PKD2L1:EGFP transgenic mice. The molecular weight of the different amplicons (Amplicon size) is indicated as well as the experimental parameters for each set of PCR reaction. PCR reaction for PKD2L1 animals were adapted from the protocol published by the Jackson Laboratories (<http://jaxmice.jax.org/strain/016853.html>).

GENE	Sense primers sequence		Anti-sense primers sequence
CRE	5'-CGT ACT GAC GGT GGG AGA AT-3'		5'-CCC GGC AAA ACA GGT AGT TA-3'
eGFP	5'-GCC ACA AGT TCA GCG TGT CC-3'		5'-GCT TCT CGT TGG GGT CTT TGC-3'
PKD2L1	5'-GAT CTG CAA TGC AAT GAA CC-3'		Wild type: 5'-GAC CCT CTG CCT TGT GTC TC-3' Mutant: 5'-ACA CCG GCC TTA TTC CAA G-3'
Amplicon size	CRE 166 bp	eGFP 573 bp	PKD2L1 Wild type: 725 bp Mutant: 575 bp
PCR reaction	Initial denaturation (5 min, 95 °C), Denaturation (30 s, 95 °C), Primers hybridization (30 s, 62 °C), Elongation (30 s, 72 °C), Final elongation (7 min, 72 °C), Number of Cycles: 36	Initial denaturation (5 min, 95 °C), Denaturation (30 s, 95 °C), Primers hybridization (30 s, 64 °C), Elongation (45 s, 72 °C), Final elongation (7 min, 72 °C), Number of Cycles: 36	Initial denaturation (5 min, 95 °C), Denaturation (30 s, 95 °C), Primers hybridization (30 s, 62 °C), Elongation (45 s, 72 °C), Final elongation (7 min, 72 °C), Number of Cycles: 36

generated heterozygous animals that were not considered in the present study.

2.2. Immunohistochemistry

Immunofluorescence experiments were carried out as previously described (Orts-Del'Immagine et al., 2012; Orts-Del'Immagine et al., 2014). After paraformaldehyde transcardiac perfusion (4% PFA in 0.1M PBS) of eight to twelve week-old mice, brains were removed, post-fixed for one hour at 4 °C and frozen in isopentane (−40 °C) following cryoprotection in 30% sucrose at 4 °C (24–48 h). Coronal brainstem sections (40 μm) were obtained using a cryostat (Leica CM3050) and collected serially in twelve-well plates containing 0.1 M PBS. Sections were then incubated at room temperature for 1 h in PBS containing 0.3% Triton X100 (Sigma) and 3% horse serum with 1% bovine serum albumin (BSA) before adding the primary antibody (mouse anti-MAP2 IgG; 1:600 48 h, Sigma–Aldrich M-1406 or rabbit anti-PKD2L1 IgG; 1:700 overnight; Millipore AB9086). Sections were then washed in PBS and incubated for 2 h at room temperature with secondary antibody (1:400; Millipore-Chemicon; MAP2: goat anti-mouse IgG, PKD2L1: donkey anti-rabbit IgG conjugated to AlexaFluor 594 or 488, respectively). MAP2 and PKD2L1 immunolabeling experiments were conducted sequentially. Sections were mounted on gelatin coated slides and coverslipped with home-made mowiol mounting medium for fluorescence microscope preparation. Experiments were reproduced in 3 animals for each model. Slides were observed and images acquired using a confocal microscope (Zeiss LSM700; maximal intensity z-projections of 10–15 μm section). Images were analyzed and prepared using ZEN 2009/2010 light Edition (Zeiss software), ImageJ 1.45 (NIH) and Corel Draw X3 graphics suite. In the insets of Fig. 1B, the central canal is labeled as cc.

2.3. Slice preparation and electrophysiology

2.3.1. Brainstem slice preparation

Eight to twelve week-old mice were anaesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine (Carros, France) and xylazine (Puteau, France) mixture (100 and 15 mg/kg, respectively). Brainstem slices (from the caudal part up to the 4th ventricle) were prepared as previously described by Roux et al. (2009). Slice preparation was performed in ice-cold (0–4 °C), oxygenated (95% O₂/5% CO₂) and low calcium/high magnesium artificial cerebrospinal fluid (aCSF) containing (in mM): NaCl 75, NaHCO₃ 45, NaH₂PO₄ 1.25, KCl 3, CaCl₂ 0.5, MgCl₂ 7, glucose 15, sucrose 31, ascorbic acid 2, Na-pyruvate 2, myo-Inositol 3 (pH 7.3–7.4, and osmolality of 300–310 mosmole.kg⁻¹). Coronal brainstem slices (200 μm thick) were cut with a vibratome (Leica VT1000S) and transferred to a submerged recovery chamber filled with standard oxygenated aCSF at 35 °C containing (in mM): NaCl 115, NaHCO₃ 26, NaH₂PO₄ 1.25, KCl 3, CaCl₂ 2, MgCl₂ 2, glucose 15, ascorbic acid 2, Na-pyruvate 2, myo-Inositol 3 (pH 7.3–7.4 and osmolality of 300–310 mosmole.kg⁻¹). Slices were allowed to return from 35 °C to room temperature for 1 h and subsequently kept under continuous oxygenation until their transfer to the recording chamber.

2.3.2. Electrophysiological recordings

The recording procedure has been described in details in our previous study (Orts-Del'Immagine et al., 2012). Briefly, cells around the central canal (cc) were spotted under either Infra-red-DIC (for slices obtained from PKD2L1^{+/+} or PKD2L1^{-/-} mice) or 490 nm illumination (for PKD2L1:EGFP⁺ mice) using an upright Zeiss AxioScope microscope (60x water immersion objective) equipped with a precisExcite P1 CoolLED epifluorescence system and a CoolSNAP HQ2 cooled CCD camera (Photometrics) connected

to a PC through a frame grabber (CoolSNAP LVDS interface card, Photometrics) and controlled by MetaView software (Molecular Devices Inc.). Whole-cell patch-clamp recordings were performed in current- and/or voltage-clamp mode using a Multiclamp 700B patch-clamp amplifier connected with a Digidata 1322A interface (Molecular Device Inc.) to the computer. Patch pipettes were pulled from thin-wall borosilicate glass capillaries (Harvard Apparatus) and filled with an internal solution with composition (in mM): KCl 135, NaCl 10, MgCl₂ 2, CaCl₂ 1, EGTA 5, Hepes 10, Na₂-phosphocreatine 10 and Mg-ATP 4 (adjusted to pH 7.30–7.35 with KOH 1N; osmolality of 290–295 mosmole.kg⁻¹; High chloride concentration with E_{Cl} set at +0 mV). In all experiments, the internal solution of the recording pipette was supplemented with 10 μM AlexaFluor 594 (Invitrogen) to identify after whole-cell dialysis the recorded cell and ensure it presented the typical morphology of medullo-spinal CSF-cNs as previously described (Orts-Del'Immagine et al., 2012; Orts-Del'Immagine et al., 2014). The tip resistance of the electrodes was 4–6 MΩ when filled with the intracellular solution and series resistances, in whole-cell configuration, ranged between 10 and 20 MΩ. The series resistance (r_s) was monitored with a −20 mV calibration pulse regularly applied throughout each experiment and recording was stopped when r_s exceeded by more than 25% the original value. Typically, signals were filtered at 2.4 kHz and digitized between 10 and 20 kHz, and then acquired on a PC using the Clampex 9.2 software (Molecular Device Inc.).

2.3.3. Slice perfusion and drug application

Slices were continuously superfused at a rate of 2.5 ml.min⁻¹ with oxygenated standard aCSF (see composition above) maintained at room temperature (~20 °C) and containing, unless otherwise stated (see Figs. 5 and 6), 10 μM gabazine, 1 μM strychnine and 1 mM kynurenic acid to block ionotropic GABAergic, glycinergic and glutamatergic receptors, respectively and avoid synaptic transmission during recordings. To allow for rapid and focal application as well as rapid wash, all test solutions were pressure-applied using a patch pipette (~1 μm tip diameter) connected to a pressure application system (Toohey Company) and positioned at ~50 μm from the recorded cells. We confirmed the absence of any application artifacts or mechanical responses using pressure application of standard aCSF.

To assess the effect of variations in extracellular pH (alkalinization or acidification) on single-channel activity and/or action potentials (APs) discharge, we pressure applied test solutions at defined pH values. Alkaline solution at pH 9 (TAPS) had the following composition (mM): NaCl 145, KCl 3, CaCl₂ 2, MgCl₂ 2, glucose 15, Hepes 10, N-tris(hydroxymethyl)-methyl-3-aminopropanesulfonic acid (TAPS) 10 (pH 9 adjusted with NaOH 1 M; ~310 mosmole.kg⁻¹). The citric acid-based acidic solution was prepared by adding to a modified aCSF (NaCl reduced to 130 mM) the citric acid (10 mM)/sodium citrate (15 mM) couple (final concentration 25 mM) in proportions enabling a final pH of 5.0 (~310 mosmole.kg⁻¹).

The presence of functional ionotropic glutamatergic receptors (Fig. 5A–C) was determined by pressure application of glutamate (Glut.), N-methyl-D-aspartic acid (NMDA), kainate (Kai.) and α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA). Expression of functional nicotinic acetylcholine receptors (nAChR) was tested by pressure application of acetylcholine (ACh) in the presence of 1 μM atropine to avoid potential activation of muscarinic receptors (Fig. 5D and E). The presence of glutamatergic and/or cholinergic synaptic transmission onto CSF-cNs was further assessed by using a hyperosmotic shock to force vesicular release and record triggered synaptic events. The solution was prepared by adding 500 mM sucrose to the standard aCSF solution (final osmolality of ~800 mosmole.kg⁻¹) and pressure-

applied for 10 s.

All chemicals and drugs were purchased from Sigma–Aldrich except for: Gabazine (SR95531), AMPA, DL-2-amino-5-phosphopentanoic acid sodium salt (AP-V), 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione disodium salt (DNQX), NMDA, kainate and D-tubocurarine (D-TC) that were purchased from Abcam Biochemicals. The osmolality of all solutions was measured using a calibrated micro-osmometer (Roebing MessTechnick) and their pH tested.

2.4. Modeling

To question the potential location of PKD2L1 channels in CSF-cNs as well as their role and implication in their excitability, we constructed a model neuron (see Table 2 and Fig. 7A) based on the previously described morphology for medullo-spinal CSF-cNs (Orts-Del'Immagine et al., 2014). Here our main goal was to determine whether and under which conditions one single PKD2L1 channel opening is capable of triggering APs. The model consisted of a passive spherical soma (diameter: 10 μm), an axon (length \times diameter (μm): 200 \times 1) and a unique dendrite (length \times diameter (μm): 30 \times 1) ending with a bud (diameter: 3 μm). We also added a primary cilium (length \times diameter (μm): 3.5 \times 0.5) since such a structure was reported on the soma of CSF-cNs (Orts-Del'Immagine et al., 2014). This primary cilium was connected to the soma by a junction compartment (0.25 $\mu\text{m} \times$ 0.25 μm) creating a junctional resistance between soma and cilium (R_j ; Fig. 7A and see below). The Simulations were made using the compartmental NEURON simulation software (Hines and Carnevale, 1997) and the passive properties of the model neuron were set to conform to the electrophysiological properties determined in CSF-cNs (see Tables 3 and 4). Thus, the leak conductance was set to $5.10^{-5} \text{ S.cm}^{-2}$ in all compartments

Table 2
Equations and parameters used to construct the model CSF-cNs. The table indicates the parameters used to define the morphological and biophysical passive properties of the model CSF-cNs and are based on earlier publications (Orts-Del'Immagine et al., 2012; Orts-Del'Immagine et al., 2014) and the functional properties recorded in the present study. The table also indicates the equations and the variables used to define the currents setting the active properties of the model neuron based on a Hodgkin–Huxley model. The data, equations and variables were used in the compartmental NEURON simulation software (Hines and Carnevale, 1997). \emptyset : diameter; ℓ : length. Distance are given in micrometers.

Morphology in μm (see Fig. 7A):	
A soma (\emptyset : 8) connected to a primary dendrite ($\emptyset \times \ell$: 1 \times 30), a bud (\emptyset : 3), an axon ($\emptyset \times \ell$: 1 \times 200) and a primary cilium ($\emptyset \times \ell$: 3.5 \times 0.5) attached to the soma with a junction compartment ($\emptyset \times \ell$: 0.25 \times 0.25).	
Passive properties:	
$g_{\text{leak}} = 5.10^{-5} \text{ S/cm}^2$; $C_m = 1 \text{ } \mu\text{F/cm}^2$; Axial resistance or resistivity (ρ) = 123 Ohm.cm (unless otherwise specified)	
Currents general equations for the model neuron with active properties	
Current	
Current equation	$I(V,t) = g_{\text{bar}} \cdot m^a(V,t)^b \cdot h^c(V,t) \cdot (V - E_{\text{rev}})$
m_{∞}	$m_{\infty}(V) = 1 / (1 + \exp[-(V - V_{\text{ac}}) / k_{\text{ac}}])$
h_{∞}	$h_{\infty}(V) = 1 / (1 + \exp[-(V - V_{\text{inac}}) / k_{\text{inac}}])$
dm/dt	$dm(V,t)/dt = [m_{\infty}(V) - m(V,t)] / \tau_m(V)$
dh/dt	$dh(V,t)/dt = [h_{\infty}(V) - h(V,t)] / \tau_h(V)$
dt	$dt = 5 \text{ } \mu\text{s}$
Variables for I_{Na} (Mediated by sodium voltage-dependent channels)	
$a = 3$	$b = 1$
$\tau_m(\text{ms})$	$\tau_m(V) = 0.163 + (0.08 / (1 + ((V + 38) / 27)^2))$
$h_{\infty}, k_{\text{inac}}(\text{mV})$	$V_{\text{inac}} = -49.6, k_{\text{inac}} = -5$
$\tau_h(\text{ms})$	$\tau_h(V) = 0.15 + (1.15 * (\exp(-0.5 * ((V + 29.6) / 12.9)^2))$
$E_{\text{rev}}(\text{mV}) = +60$	$g_{\text{bar}}(\text{S/cm}^2) = 0.25$
Variables for I_{KDR} (Mediated by potassium delayed rectifier channels)	
$a = 4$	$b = 0$
$\tau_m(\text{ms})$	$\tau_m(V) = (20 * \exp(-(0.000729 * ((V + 32)^2))) + 4$
$E_{\text{rev}}(\text{mV}) = -90$	$g_{\text{bar}}(\text{S/cm}^2) = 0.1$

and the capacitance to $1 \text{ } \mu\text{F/cm}^2$ to give a measured membrane resistance (r_m) of 2 $\text{G}\Omega$ and membrane capacitance (c_m) of 6 pF, respectively. The axial resistance (ρ : resistivity) was set at 123 $\text{ }\Omega\text{.cm}$ in all compartments unless otherwise specified (see Fig. 7B₂ and C₂). The junctional resistance (R_j) between the soma and the cilium was calculated as $R_j = \rho \cdot \ell / A$, where ρ is the internal resistivity ($\text{ }\Omega\text{.cm}$), ℓ the length of the junction compartment (0.25 μm) and A its cross-sectional area (for a diameter of 0.25 μm). To date little is known about the voltage-dependent conductances responsible for setting the firing properties in mice CSF-cNs and such a characterization would require a dedicated study (but see Marichal et al., 2009). Therefore, to define the active properties of the model neuron we integrated, as a first approach, I_{Na} (current-mediated by sodium voltage-dependent channels) and I_{KDR} (current-mediated by potassium delayed rectifier channels) with activation–inactivation properties following the Hodgkin–Huxley model (see Table 2). We set the density and localization of these active conductances to obtain values for RMP, spiking threshold and overshooting potentials in agreement with the experimental data (see Tables 3 and 4). PKD2L1 channels were modeled as a simple squared linear conductance ($E_{\text{rev}} = 0$; in agreement with a non-selective cation current) with an amplitude corresponding to experimental data and variable duration. Real current traces were converted into conductances ($g = I_{\text{channel}} / (V_{\text{holding}} - E_{\text{rev}})$) and injected as a point process into the model. Data were generated in current-clamp mode or in simulated single electrode voltage-clamp (series resistance, $r_s = 5 \text{ M}\Omega$) using the SEClamp point process of NEURON (Hines and Carnevale, 1997).

2.5. Analysis and statistics

Passive properties were determined, in voltage-clamp mode at -80 mV , from the cell current response to a -20 mV hyperpolarization step (V_{step}). Membrane resistance (r_m) was estimated from the amplitude of the sustained current at the end of the 100 ms voltage step ($r_m = V_{\text{step}} / I_m$). Membrane capacitance was estimated as the ratio between the cell decay time constant (τ), obtained from the exponential fit of the current decay, divided by r_s ($C_m \sim \tau / r_s$). Resting membrane potential (RMP) was determined in current-clamp mode at $I = 0$ just after the whole-cell configuration was achieved as well as by averaging in current-clamp recordings a 1 s period without AP and current injection ($I_{\text{injection}} = 0 \text{ pA}$).

The analysis of the AP basic properties was carried out using the 'Template search' routine of the Clampfit 10 suite and the detected APs were superimposed and individually analyzed to determine their principal parameters (threshold, overshoot, 10–90% rise time and level of hyperpolarization). The analysis of AP frequency and of its modulation upon application of test solutions were carried out over 10–30 s periods selected from whole recordings using the 'threshold detection' routine from Clampfit 10 (threshold set at 0 mV).

Single-channel activity was analyzed with the 'single-channel detection' routine from Clampfit 10 in periods of 10–30 s selected from whole recordings to determine unitary current amplitude and opening durations. The effect of test solutions (TAPS, citric acid) on the unitary current properties and activity was assessed. Typically, the channel opening probability ($N \cdot P_0$ with N the number of channels and P_0 the channel open probability) was calculated as the sum of open times divided by the time of analysis in each condition. The minimal event duration for unitary current detection was typically set at 1 ms (cut-off duration). In some instance, we also analyzed the frequency of occurrence for events longer than 5, 10 and 20 ms and in that case the cut-off

duration was set accordingly (excluding events with shorter duration). Typically this frequency corresponded to the number of detected events divided by the duration of the analyzed recordings.

The amplitude of the current responses generated following applications of ionotropic receptors agonists (glutamate, kainate, AMPA and ACh) or citric acid solutions were measured as the average of the net current amplitude (with the baseline current subtracted) over a 5 ms period at the current peak.

Current and potential responses were analyzed using the Clampfit 10 suite (Molecular Devices Inc.) and Excel 2007 (Microsoft).

For the determination of the statistical analysis, no assumption for the distribution of raw data was made. Significance of the difference between means of two samples was computed using two-way unpaired or paired non parametric tests (Mann–Whitney and Wilcoxon matched-pairs signed rank tests, respectively). For comparison between three groups or more, we used a one-way ANOVA test for unmatched and matched samples (Kruskal–Wallis and Friedman tests, respectively) and a post hoc Dunn's test if the null hypothesis was rejected. Correlation between two groups was determined with a contingency Fisher's exact statistical tests. The differences were considered significant when $p < 0.05$. Statistical analysis was carried out using Prism 5.0.4 (Graphpad Software).

3. Results

3.1. Deletion of PKD2L1 channel does not alter passive properties of CSF-cNs

To identify CSF-cNs in the brainstem of PKD2L1^{+/+} and PKD2L1^{-/-} animals, we carried out double labeling immunofluorescence experiments on brainstem sections using primary antibodies against MAP2 (neuronal marker) and PKD2L1. As illustrated in Fig. 1A, immunolabeling against MAP2 revealed the presence of neurons projecting to the cc in sections obtained from both PKD2L1^{+/+} (Fig. 1A, Left) and PKD2L1^{-/-} (Fig. 1A, Right) mice. Both in wild type and mutant animals, these cells exhibited the characteristic morphology previously described for CSF-cNs (Orts-Del'Immagine et al., 2012; Orts-Del'Immagine et al., 2014). As expected from the mutation of the *pkd2l1* gene, positive immunoreactivity against PKD2L1 was only observed on sections prepared from wild type animals (PKD2L1^{+/+} in Fig. 1A Left). Further, unitary current activity was only recorded in PKD2L1^{+/+} CSF-cNs (Fig. 1B₁). PKD2L1 channel activity represented a functional hallmark for these neurons since it was recorded in all wild type CSF-cNs tested ($n = 50$) but never in PKD2L1^{-/-} animals ($n = 30$) (in Fig. 1B compare panels 1 and 2). In CSF-cNs from wild type animals, the recorded unitary current had an average amplitude of -13.9 ± 0.3 pA at a holding potential of -80 mV (potassium-based intracellular solution) and an average N.P₀ of 0.004 ± 0.001 ($n = 21$ cells). All the recordings presented here were carried out in the whole-cell configuration and in brain slices, which are not optimal experimental conditions to conduct accurate single channel analysis. Nevertheless, as a first approach, we determined the occurrence of event openings with duration longer than 5 ms and found a frequency of 0.14 ± 0.03 Hz ($n = 13$). This frequency progressively decreased when considering longer opening duration: 0.09 ± 0.02 Hz ($n = 9$) and 0.04 ± 0.01 Hz ($n = 9$) for cut-off durations of 10 and 20 ms, respectively (Kruskal–Wallis statistical test: $p = 0.01$).

We next compared the passive electrophysiological properties of identified CSF-cNs in brainstem slices obtained from either

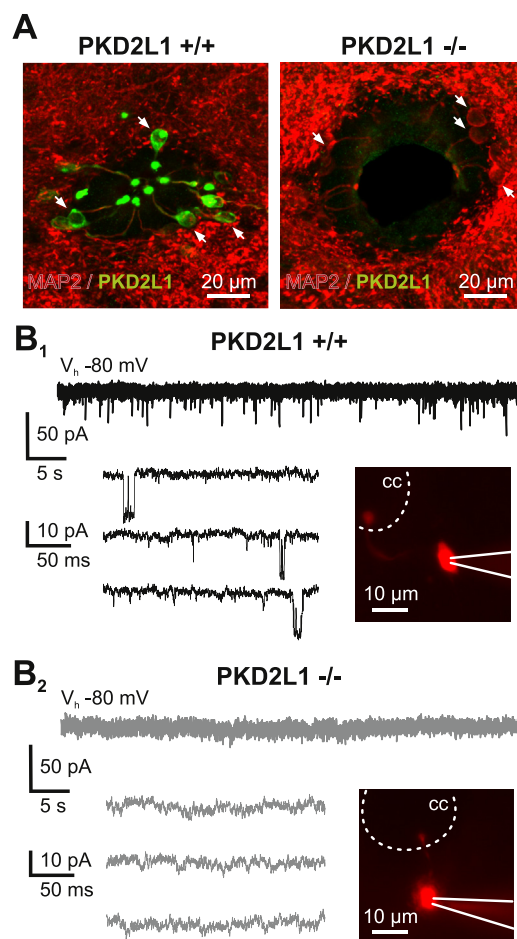


Fig. 1. Identification and properties of CSF-cNs in PKD2L1 wild type and mutant animals. **A.** Micrographs (confocal maximal intensity Z-projection) from wild type (PKD2L1^{+/+}, Left) and mutant (PKD2L1^{-/-}, Right) brainstem coronal sections showing the superimposed immunolabeling of CSF-cNs with antibodies against MAP2 (red) and PKD2L1 (green). Experiments illustrate that although CSF-cNs can be visualized in both animal models through MAP2 immunoreactivity (Arrows) only wild type animals presented immunoreactivity against PKD2L1. **B.** Representative voltage-clamp recordings ($V_h = -80$ mV) showing current traces in identified CSF-cNs in acute brainstem slices from PKD2L1^{+/+} (**B₁**) and PKD2L1^{-/-} (**B₂**) animals. In **B₁** and **B₂**, Bottom Left: current traces at a slower timescale showing that unitary currents are only observed in PKD2L1^{+/+} animals; Bottom Right: micrographs illustrating the recorded cells dialyzed in whole-cell configuration with Alexa 594 (10 μ M) to ensure that recordings were made from CSF-cNs (white lines delineate the recording electrode). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

PKD2L1^{+/+} or PKD2L1^{-/-} animals and show that deletion of PKD2L1 channels had no effect on these parameters. Resting membrane potential (RMP), input resistance (r_m) and membrane capacitance (C_m) were similar in both animal types (see Table 3).

Taken together these results indicate that CSF-cNs with the typical morphology are present in PKD2L1^{-/-} mice and, except for the absence of the PKD2L1 channel, they presented unaltered electrophysiological passive properties. Our results further confirm that the unitary current recorded in medullar CSF-cNs from wild type mice and previously reported in PKD2L1:EGFP mice (Orts-Del'Immagine et al., 2012) is effectively carried by PKD2L1 channels. The spontaneous PKD2L1 activity is low and mainly characterized by events with short opening duration (around 5 ms) but present also openings lasting over several tens of milliseconds. Such current was never observed in animals lacking PKD2L1 channels (PKD2L1^{-/-} animals).

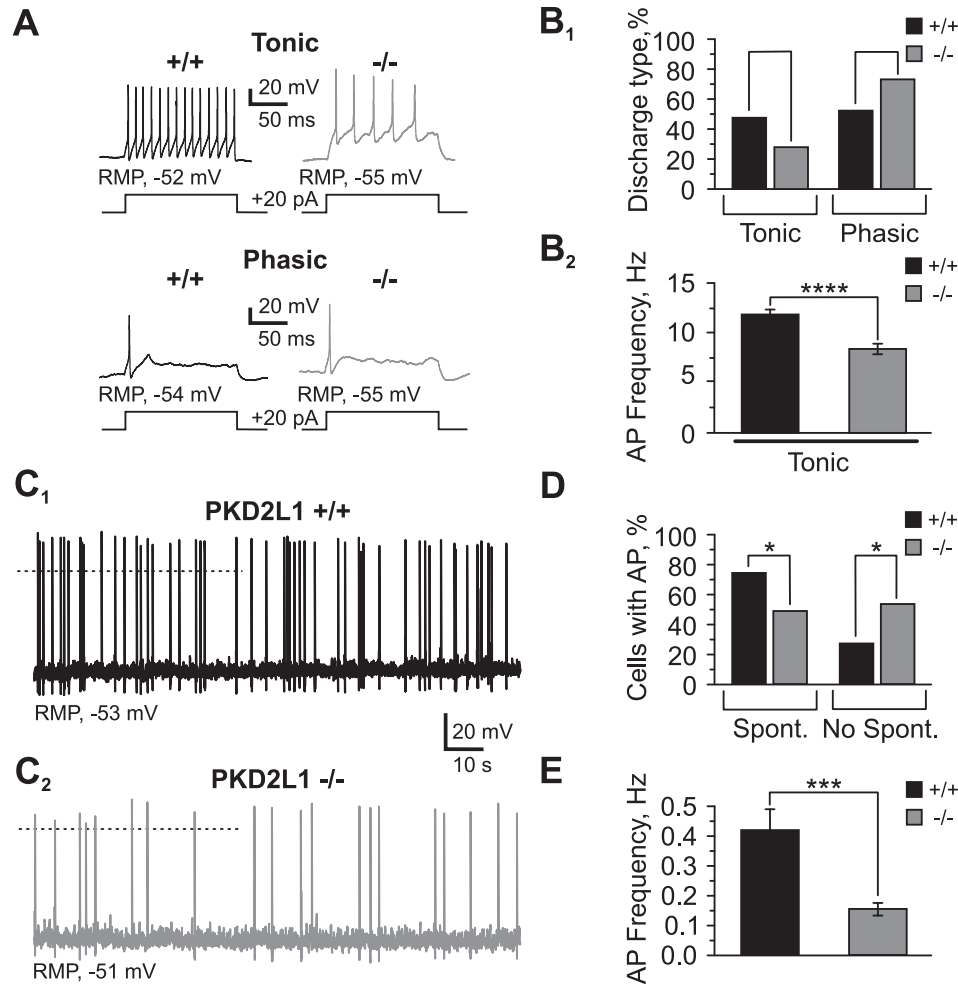


Fig. 2. PKD2L1 deletion affects AP discharge frequency in CSF-cNs. **A.** Voltage traces recorded in current-clamp mode at RMP (indicated below the traces) in 4 representative CSF-cNs (2 in wild type animals, +/+; 2 in mutant animals, -/-) in response to a +20 pA current injection pulse for 150 ms. In both animals models, CSF-cNs exhibited either *tonic* (Top) or *phasic* (Bottom) discharge pattern upon current injection. **B₁.** Summary bar graphs in percent of wild type (+/+) and mutant (-/-) CSF-cNs presenting either *tonic* (Left; 48%, n = 24/50 cells in +/+ vs. 27%, n = 7/26 cells in -/-) or *phasic* (Right; 52%, n = 26/50 cells in +/+ vs. 73%, n = 19/26 cells in -/-) discharge pattern upon current injection. There was no statistically significant difference between wild type and mutant animals. **B₂.** Summary bar graphs of the AP discharge frequency observed in *tonic* CSF-cNs from wild type (+/+) and mutant (-/-) CSF-cNs following a +20 pA current injection (n = 24 in +/+ and n = 7 in -/-). **C.** Representative voltage traces recorded at RMP (as indicated below the traces) in a CSF-cN from a PKD2L1^{+/+} (C₁) and a PKD2L1^{-/-} (C₂) animal illustrating the spontaneous discharge activity. Dashed lines: 0 mV level. **D.** Summary bar graphs of the percentage of CSF-cNs presenting at RMP either spontaneous AP discharge (Spont.) or no AP discharge (No Spont.) when recorded in wild type (+/+) and mutant (-/-) animals. Note that a larger proportion of CSF-cNs (28 cells out of 38) were spontaneously firing in PKD2L1^{+/+} than in PKD2L1^{-/-} animals (14 cells out of 30). **E.** Summary bar graphs of the mean \pm S.E.M AP frequency in CSF-cNs presenting spontaneous discharge when recorded at RMP in wild type (+/+) and mutant (-/-) animals. Note that the average AP frequency was higher in PKD2L1^{+/+} CSF-cNs than in PKD2L1^{-/-}. *: p < 0.05; **: p < 0.001 and ****: p < 0.0001.

3.2. PKD2L1 channel activity participates to the setting of CSF-cN excitability

To further characterize the effect of PKD2L1 channel deletion on CSF-cN activity, we compared the basic AP properties, their discharge pattern and their spontaneous frequency (*i.e.* the *active* properties) in CSF-cNs recorded from either PKD2L1^{+/+} or PKD2L1^{-/-} animals. Action potentials could be observed in both PKD2L1^{+/+} and PKD2L1^{-/-} CSF-cNs (Fig. 2A and C) and there was no differences in their basic properties *i.e.* the membrane potential threshold to trigger APs was similar and APs presented similar 10–90% rise time, overshoot and hyperpolarization (see Table 4). Further, as previously reported for wild type CSF-cNs (Orts-Del'Immagine et al., 2012 and see Fig. 2A Left panels), injection of positive current in PKD2L1^{-/-} CSF-cNs also revealed the presence of neurons with *tonic* (a train of APs; Fig. 2A, Top Right) and *phasic* (few APs at the start of the step; Fig. 2A, Bottom Right) AP discharge pattern. There was no significant differences in the proportion of *tonic* vs. *phasic* CSF-cNs between PKD2L1^{+/+} and PKD2L1^{-/-} animals (Fig. 2A and B₁; Fisher's exact

contingency test, p = 0.09). Nevertheless, the analysis of the AP frequency observed upon +20 pA current injection indicated that *tonic* CSF-cNs from wild type animals presented a higher frequency

Table 3

Deletion of PKD2L1 does not modify CSF-cNs passive properties. Summary table for the passive properties of CSF-cNs recorded from PKD2L1 wild type (+/+) or mutant (-/-) littermates and showing the resting membrane potential (RMP), the membrane or input resistance (r_m) and the membrane capacitance (c_m). All data are presented as mean \pm S.E.M and the n number for each group are given. The statistical significance of the difference in each group was tested using a Mann–Whitney statistical test: ns: not significant.

PKD2L1	RMP (mV)		r_m (G Ω)		c_m (pF)	
	+/+	-/-	+/+	-/-	+/+	-/-
Mean	-54.4	-54.8	1.56	1.53	4.7	4.9
SEM	0.4	0.6	0.04	0.08	0.2	0.3
n	50	26	50	26	50	26
Statistical significance	0.526 ns		0.350 ns		0.941 ns	

Table 4

PKD2L1 deletion does not alter the action potential properties in CSF-cNs. Summary table for the basic properties of action potentials (APs) recorded from PKD2L1 wild type (+/+) or mutant (-/-) CSF-cNs. In each group the membrane potential value to reach AP threshold (Threshold), the 10–90% rise time of the APs (Rise Time), the amplitude of the overshoot (Overshoot) and the net amplitude of the hyperpolarization following the repolarization phase (Hyperpol.) are indicated. All data are presented as mean \pm S.E.M and the n number for each group are given. The statistical significance of the difference in each group was tested using a Mann–Whitney statistical test: ns: not significant.

PKD2L1	Threshold (mV)		Rise time (ms)		Overshoot (mV)		Hyperpol. (mV)	
	+/+	-/-	+/+	-/-	+/+	-/-	+/+	-/-
Mean	-41.2	-40.9	0.47	0.34	15	13	-11	-10
SEM	0.2	0.2	0.04	0.04	2	2	1	1
n	16	7	16	7	16	7	16	7
Statistical significance	0.873 ns		0.072 ns		0.935 ns		0.354 ns	

for the 'induced' discharge than those recorded from PKD2L1^{-/-} mice (Fig. 2B₂; 'induced' AP frequency: 11.7 \pm 0.6 Hz in +/+, n = 24 and 8.3 \pm 0.5 Hz in -/-, n = 7; Mann Whitney statistical test: p = 0.0001).

When comparing the ability for CSF-cNs to exhibit spontaneous AP discharge activity at RMP (Fig. 2C), we found that in PKD2L1^{+/+} animals 74% of CSF-cNs presented a spontaneously spiking activity (+/+ Spont: 28 cells out of 38; Fig. 2D, Left) and 26% were silent

neurons (+/+ No Spont: 10 out of 38 CSF-cNs; Fig. 2D, Right). In contrast, in PKD2L1^{-/-} animals an equivalent number of CSF-cNs exhibited either spontaneous AP discharge or were silent at RMP (Fig. 2D; -/- Spont: 47%, 14 cells out of 30 vs. -/- No Spont: 53%, 16 cells out of 30; Fisher's exact contingency test between PKD2L1^{+/+} and PKD2L1^{-/-}: p = 0.027). Finally, in spontaneously active CSF-cNs recorded from animals expressing PKD2L1 (Fig. 2C), the average spontaneous AP frequency was ~3 times higher than in mutant animals (Fig. 2E; AP frequency: 0.42 \pm 0.07, n = 28 in +/+ vs. 0.16 \pm 0.02, n = 14 in -/-; Mann Whitney statistical test: p = 0.0003).

The results presented above indicate that PKD2L1 deletion does not alter CSF-cN ability to generate APs neither does it modify the AP basic properties. Nevertheless, in PKD2L1^{+/+} animals a larger proportion of CSF-cNs exhibited at RMP spontaneous AP discharge activity accompanied by both a higher 'induced' and spontaneous frequency than in PKD2L1^{-/-} animals. Therefore, one would suggest that PKD2L1 channels, mediating an inward non-selective cationic current, are participating in setting the level of excitability in medullo-spinal CSF-cNs.

3.3. Detection of strong extracellular acidification is unaltered in the absence of PKD2L1

It was suggested that PKD2L1 channels might be activated by

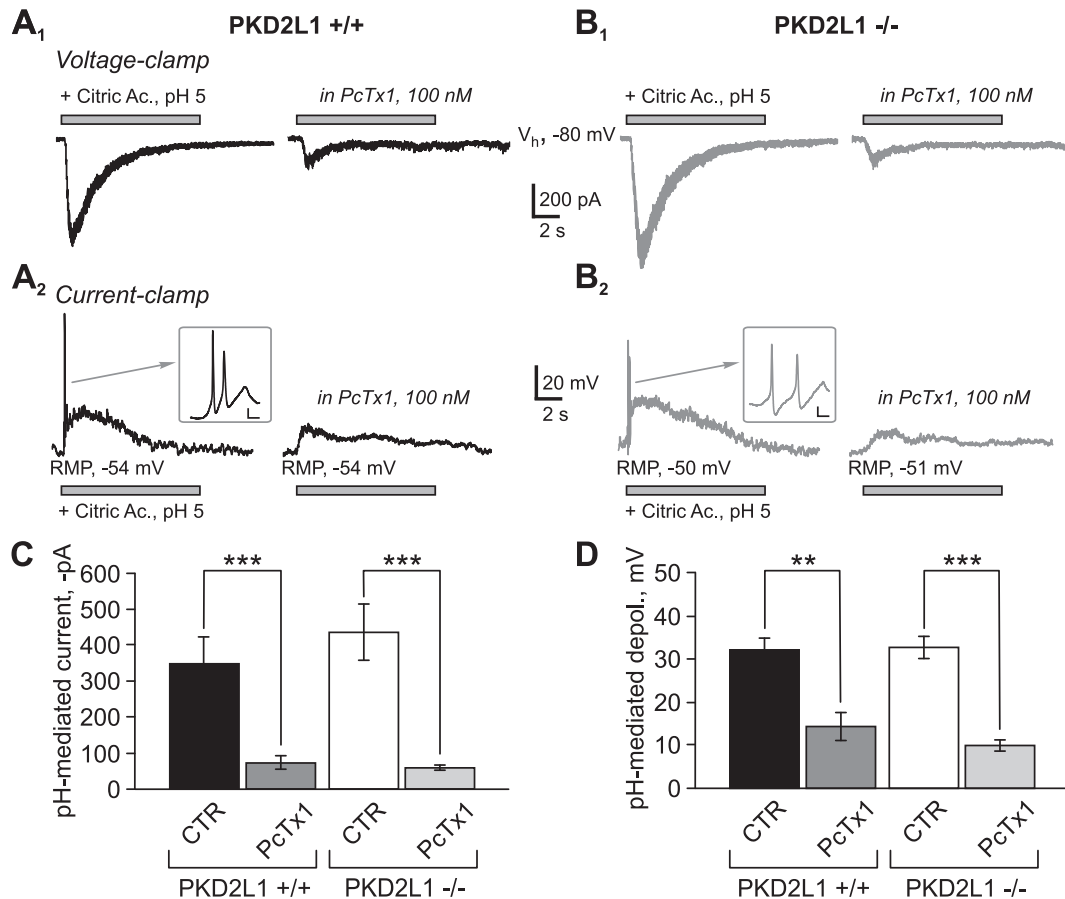


Fig. 3. Extracellular acidification transiently depolarizes CSF-cNs through ASIC activation. Typical voltage- (A₁ and B₁) and current-clamp (A₂ and B₂) recordings in one wild type (PKD2L1^{+/+}) and one mutant (PKD2L1^{-/-}) CSF-cN upon a 10 s exposure to a citric acid solution at pH 5. In each panel (from A₁ to B₂) the same neuron was recorded in control (Left) and in the presence of 100 nM Psalmotoxin (PcTx1, Right), a selective blocker for ASIC1a containing channels. For the recordings in current-clamp mode (A₂ and B₂), RMP values are indicated under the traces and the inset illustrates at a slower timescale the early voltage response to acidic exposure (scale bars: 50 ms and 10 mV). Note that citric acid exposure induces a fast depolarization generating a burst of APs followed by a sustained depolarization without AP. In the presence of PcTx1, the amplitude of the depolarization is reduced and no AP is generated (Right panels in A₂ and B₂). **C–D.** Summary bar graphs of the mean \pm S.E.M net current (C) and net voltage variation (D) induced by application of citric acid at pH 5 in the absence (CTR) or presence of PcTx1 and recorded in PKD2L1^{+/+} and PKD2L1^{-/-} animals. **: p < 0.01; ***: p < 0.001.

extracellular acidification and thereby induce an increase in CSF-cN firing frequency (Huang et al., 2006). However, we found opposite results and demonstrated that acidification inhibited PKD2L1-like channels in medullo-spinal CSF-cNs but activated an acid sensitive ionic conductance (ASIC) (Orts-Del'Immagine et al., 2012). Here we aimed at comparing in CSF-cNs from wild type and mutant littermates the response to strong extracellular acidification.

In wild type CSF-cNs, application of the citric acid solution at pH 5 reversibly inhibited by $84 \pm 6\%$ the unitary PKD2L1 current activity recorded in voltage-clamp mode at -80 mV (data not shown; N.P₀: Control, 0.0030 ± 0.0012 ; Citric acid, 0.0002 ± 0.0001 ; Wash, 0.0017 ± 0.0004 ; Friedman statistic test: $p = 0.0001$; Control vs. Citric Ac., $p < 0.001$; Wash vs. Citric Ac. $p < 0.05$; Wash vs. CTR, ns, $n = 10$; and see Orts-Del'Immagine et al., 2012). This citric acid application also elicited a fast transitory inward current with an average peak amplitude of -349 ± 69 pA (Fig. 3A₁, Left panel and 3C, CTR in PKD2L1^{+/+}, $n = 19$). In the presence of 100 nM psalmotoxin 1 (PcTx1), a selective blocker of ASIC1a homomers and ASIC1a/2b heteromers (Diochot et al., 2007), the acid-mediated

current was inhibited by 82% down to -62 ± 13 pA (Fig. 3A₁, Right panel and 3C, PcTx1 $n = 4$; Mann Whitney statistical test: $p = 0.0009$ for CTR vs. PcTx1). The fast and transient current response observed in PKD2L1^{+/+} CSF-cNs upon extracellular acidification was still present in PKD2L1^{-/-} animals (Fig. 3B₁; Left panel), had a similar average peak amplitude of -434 ± 79 pA (Fig. 3C, CTR in PKD2L1^{-/-} $n = 13$; Mann Whitney statistical test: $p = 0.375$ for PKD2L1^{-/-} vs. PKD2L1^{+/+}) and was inhibited to a similar extent by PcTx1 (Fig. 3B₁, Right panel and 3C; current in PcTx1: -60 ± 7 pA, inhibition by 86% $n = 5$; Mann Whitney statistical test: $p = 0.0002$ for CTR vs. PcTx1 in PKD2L1^{-/-} and $p = 0.960$ for the PcTx1 inhibition in PKD2L1^{+/+} vs. in PKD2L1^{-/-}). Further, in CSF-cNs recorded in current-clamp mode at RMP, application of the pH 5 citric acid solution induced a depolarization in PKD2L1^{+/+} and in PKD2L1^{-/-} animals (Fig. 3A₂ and B₂, Left panels). This depolarization had a fast onset, triggered a burst of APs (see inset in Fig. 3A₂ and B₂) and was followed by a sustained slowly recovering depolarization with a similar net peak amplitude (Fig. 3D, CTR: $+33 \pm 3$ mV in PKD2L1^{+/+} $n = 17$ vs. CTR: $+32 \pm 3$ mV in

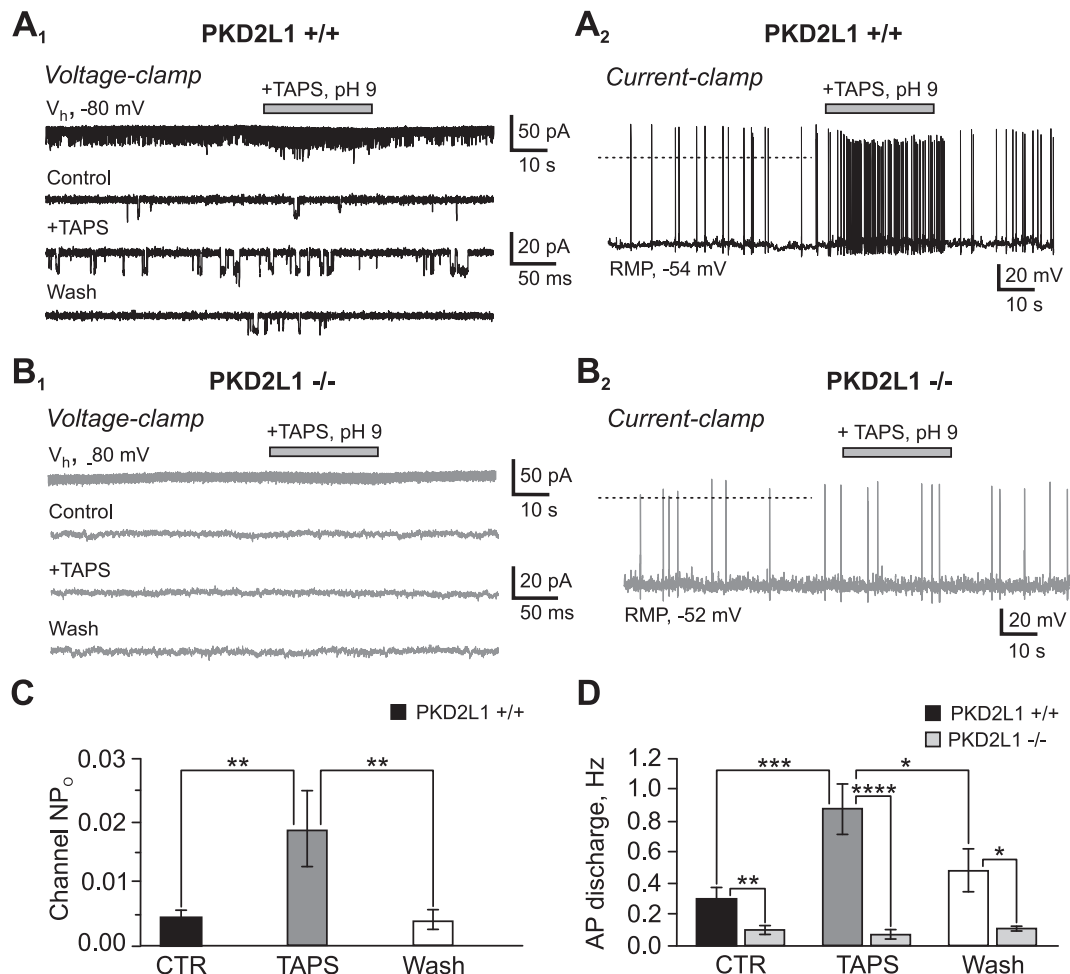


Fig. 4. Extracellular alkalization activates PKD2L1 channels and increases CSF-cN firing. Voltage- (A₁) and current-clamp (A₂) recordings before, during and after a 30 s exposure to an alkaline solution at pH 9 (+TAPS, gray horizontal bar) in one representative wild type CSF-cN (PKD2L1^{+/+}). **A₁ Bottom.** Selected regions from the current trace at the Top showing at a slower timescale the increased unitary current activity during extracellular alkalization (+TAPS). **B.** Voltage- (B₁) and current-clamp (B₂) recordings in the same condition as in **A** in one representative PKD2L1^{-/-} CSF-cN. In **B₁**, note the absence of any current activity in control or variation in the presence of the alkaline solution (+TAPS, horizontal gray bar) as can be better seen on the traces at a slower timescale (**B₁ Bottom**). Exposure to the alkaline solution did not modify the AP frequency either (+TAPS in **B₂**). **C.** Summary bar graphs of the mean ± S.E.M channel N.P₀ in control (CTR), during alkalization (TAPS) and after (Wash) in CSF-cNs ($n = 11$) recorded from PKD2L1^{+/+} animals. No data are given for PKD2L1^{-/-} animals since no current response was observed. **D.** Summary bar graphs of the mean ± S.E.M AP frequency in CSF-cNs recorded from PKD2L1^{+/+} ($n = 12$) and PKD2L1^{-/-} animals ($n = 3$ out of 6 recorded CSF-cNs; light gray bars) in control (CTR), during alkalization (TAPS) and after (Wash). Note that while no variation in the AP frequency was observed in CSF-cNs recorded from PKD2L1^{-/-} animals, extracellular alkalization induced a large and reversible AP frequency increase in PKD2L1^{+/+} animals. Dashed lines in **A₂** and **B₂**: 0 mV level. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$ and ****: $p < 0.0001$.

PKD2L1^{-/-} n = 15; Mann Whitney statistical test: p = 0.572). In agreement with the effect observed for the acid-mediated current, application of 100 nM PcTx1 reduced the amplitude of the acid-mediated depolarization and blocked the generation of APs in PKD2L1^{+/+} and PKD2L1^{-/-} CSF-cNs (Right panels in Fig. 3A₂ and B₂). Thus in PcTx1, the net depolarization was only +14 ± 3 mV (Inhibition: 58%, n = 4) in PKD2L1^{+/+} CSF-cNs (Fig. 3D; Mann Whitney statistical test: in PKD2L1^{+/+}, CTR vs. PcTx1, p = 0.009) and +10 ± 1 mV (Inhibition: 68%, n = 4) in PKD2L1^{-/-} CSF-cNs (Fig. 3D; Mann Whitney statistical test: in PKD2L1^{-/-}, CTR vs. PcTx1, p = 0.0005 and acid-mediated depolarization in PcTx1 for PKD2L1^{+/+} vs. in PKD2L1^{-/-}, p = 0.457).

In summary, detection of strong extracellular acidification is

maintained in CSF-cNs from mutant animals and involves ASIC but not PKD2L1 channels. These results also indicate that detection of extracellular acidification by ASICs is subsequently converted in a depolarization of the membrane potential with an initial burst of APs to transiently increase CSF-cN excitability.

3.4. CSF-cNs detect and code for extracellular alkalinization through PKD2L1 activation

As extracellular alkalinization was shown to activate PKD2L1 channels (Shimizu et al., 2009; Orts-Del'Immagine et al., 2012), one would therefore expect that selective activation of PKD2L1 following increase in the extracellular pH would consequently

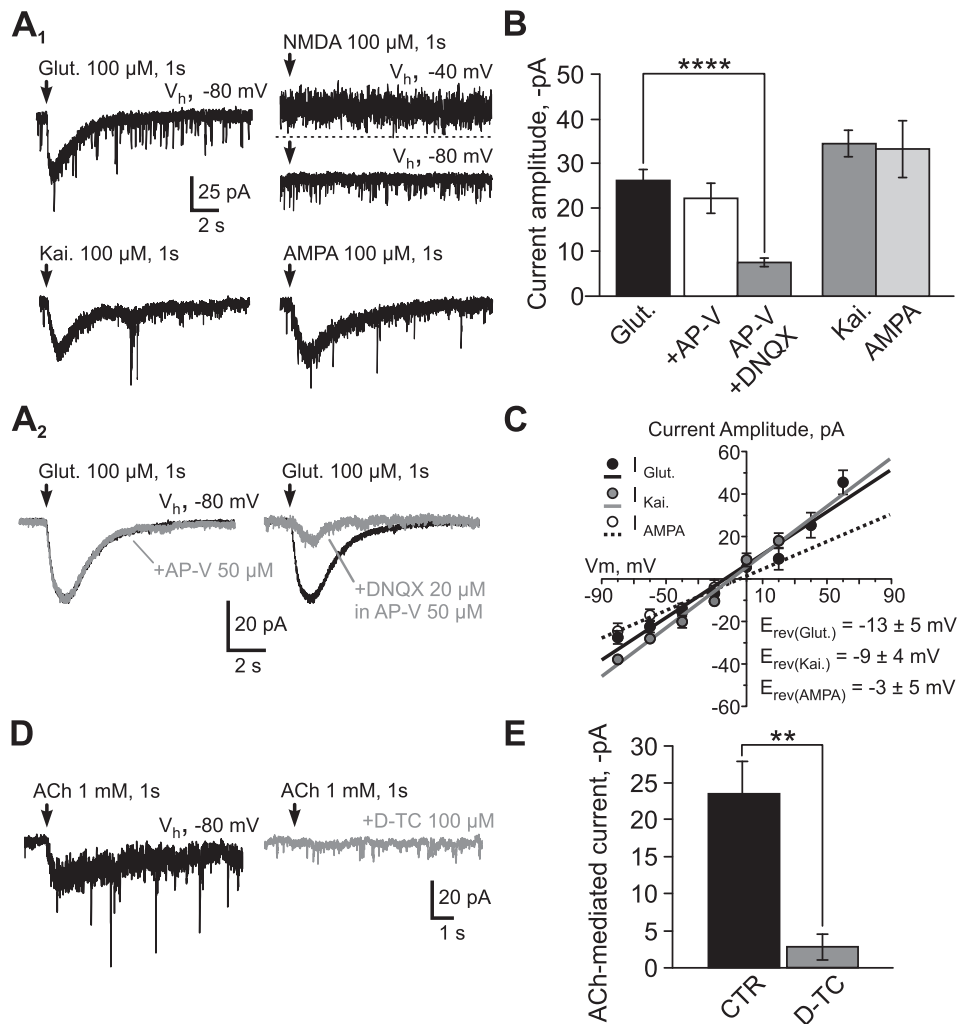


Fig. 5. CSF-cNs express functional AMPA/kainate and nicotinic cholinergic receptors. **A₁**. Representative current traces recorded in CSF-cNs from wild type animals at a holding potential of -80 mV (V_h) and showing the response to 1 s pressure application of glutamate (Glut.), NMDA, kainate (Kai.) or AMPA at a concentration of 100 μ M. Note that the response to NMDA application was tested at -80 mV and at -40 mV, to relieve the NMDA receptors voltage-dependent magnesium block. However at both membrane potentials no response was observed. Dashed line: 0 pA level. **A₂**. Representative current responses to glutamate in the absence (Glut., 100 μ M for 1 s; n = 33) and in the presence of AP-5 alone (+AP-V, gray trace; Left) and in the presence of 20 μ M DNQX (selective antagonist against AMPA/kainate receptors) with AP-5 (+DNQX, gray trace; Right). Note that the glutamate-mediated current was strongly reduced only in the presence of DNQX. **B**. Summary bar graphs of the average current responses recorded in CSF-cNs after application (100 μ M for 1 s) of either glutamate (Glut., 100 μ M for 1 s; n = 33) and in the presence of AP-5 alone (+AP-V; n = 5) or with DNQX (AP-V + DNQX; n = 6). Right part of the bar graphs, average current responses recorded in CSF-cNs after application (100 μ M for 1 s) of either kainate (Kai.; n = 3) or AMPA (n = 7). **C**. Plot against the holding potential of the mean peak amplitude for the glutamate- ($I_{Glut.}$, from -80 to +60 mV; n = 12), kainate- ($I_{Kai.}$, from -80 to +20 mV; n = 3) and AMPA- (I_{AMPA} , from -80 to -20 mV; n = 4) mediated currents. The reversal potentials indicated for the glutamate- ($E_{rev(Glut.)}$; $R^2 = 0.96$), kainate- ($E_{rev(Kai.)}$; $R^2 = 0.98$), and AMPA-mediated currents ($E_{rev(AMPA)}$; $R^2 = 0.96$) were obtained from the linear regression of mean current-potential relationship for each tested agonist. Note that the pharmacology (agonist and antagonist), the linear I-V relationship and the value of the reversal potentials are all in agreement with a current mediated by the activation of AMPA/kainate receptors. **D**. Representative current traces recorded at -80 mV (V_h) in one CSF-cN in response to acetylcholine application (ACh, 1 mM for 1 s) in the absence (Left) or in the presence of 100 μ M D-tubocurarine (+D-TC, Right), a selective antagonist for cholinergic ionotropic (nicotinic type) receptors. **E**. Summary bar graphs of the mean \pm S.E.M current response to ACh alone (CTR, n = 11) or in the presence of 100 μ M D-tubocurarine (D-TC, n = 4). **: p < 0.01; and ****: p < 0.0001.

increase AP frequency in CSF-cNs. We carried out a set of experiments to test this hypothesis.

Fig. 4A₁ illustrates the recording at a holding potential of -80 mV of one representative PKD2L1^{+/+} CSF-cNs and shows that upon application of a solution buffered to pH 9 with TAPS (+TAPS, 30 s) PKD2L1 unitary channel activity (*i.e.* N.P₀) was strongly but reversibly increased (Fig. 4A₁, Bottom panels at a slower time resolution for a better visualization of the effect – NP₀ for the illustrated recording: 0.010 in control; 0.032 during alkalization and 0.008 following wash). Recording of the same neuron in current-clamp mode at RMP (Fig. 4A₂) indicated that alkalization induced a strong increase in the AP frequency that was reversible after removal of the TAPS solution (AP frequency for the

illustrated recording: 0.3 Hz in control; 2.1 Hz during alkalization and 0.5 Hz after washout). Thus, on average in PKD2L1^{+/+} CSF-cNs, the channel NP₀ was 0.004 ± 0.001 in control, increased to 0.018 ± 0.006 during extracellular alkalization (corresponding to a ~4.5 times increase; Fig. 4C) and returned to 0.004 ± 0.001 , a value similar to that measured in control, following washout of the TAPS solution (Fig. 4C, Friedman statistical test: $p = 0.0012$, for CTR vs TAPS: $p < 0.05$; for TAPS vs. Wash: $p < 0.05$, for Wash vs. CTR: ns; $n = 11$). In parallel, the analysis of the average AP frequency indicated that upon extracellular alkalization the AP frequency in PKD2L1^{+/+} CSF-cNs was increased by more than 3 times (Fig. 4D, CTR: 0.38 ± 0.07 Hz vs. TAPS: 0.96 ± 0.21 Hz). This effect of the alkalization was reversible since upon TAPS washout the

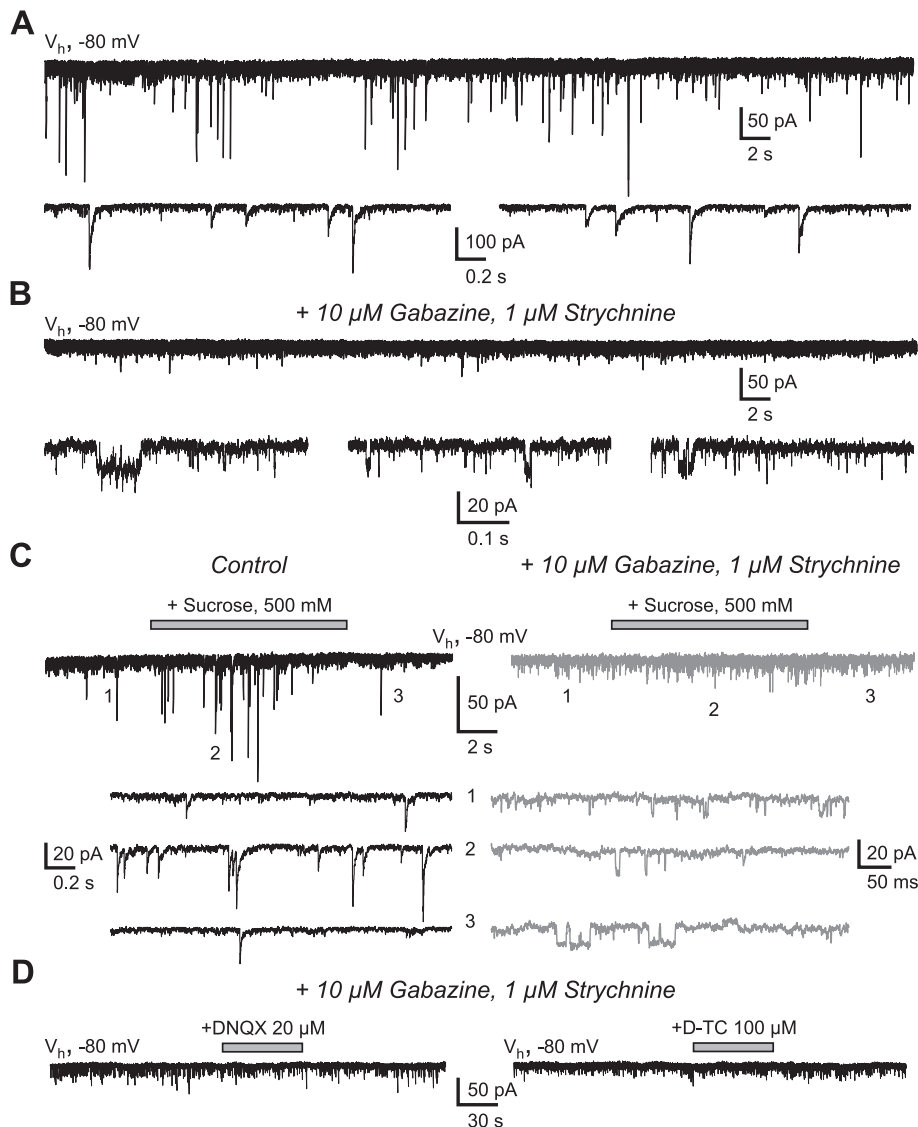


Fig. 6. CSF-cNs receive GABAergic synaptic inputs, but neither synaptic nor tonic glutamatergic or nicotinic inputs. **A.** Current traces illustrating the spontaneous synaptic activity recorded at -80 mV (V_h) in one wild type CSF-cN (PKD2L1:EGFP⁺ mice). Lower traces present selected portions of the Top trace at a slower time resolution. **B.** In the presence of $10 \mu\text{M}$ gabazine and $1 \mu\text{M}$ strychnine to block respectively GABA_A and glycine receptors, all synaptic activity is blocked and only unitary currents can be recorded (Bottom traces, selected portions of the Top trace at a slower time resolution). **C.** Current traces recorded at -80 mV (V_h) in one CSF-cN and illustrating the response induced by the application of aCSF supplemented with 500 mM sucrose (10 s, gray horizontal bar) to force vesicular release. **Left:** Control without ionotropic antagonists. **Right:** in the presence of gabazine and strychnine. **Bottom traces,** selected areas labeled with numbers on the Top traces in Control (Left) and when GABAergic and glycinergic neurotransmission was blocked (Right) before (1), during (2) and after (3) application of the sucrose hypertonic solution. Note that in the presence of gabazine and strychnine only unitary current activity is observed. **D.** Current traces recorded at -80 mV (V_h) in the presence of gabazine and strychnine in two representative CSF-cNs before, during and after a 1 min pressure application of either $20 \mu\text{M}$ DNQX (+DNQX; Left), to block AMPA/kainate receptors, or $100 \mu\text{M}$ D-tubocurarine (+D-TC; Right), to block nicotinic cholinergic receptors. Note the absence of change in current baseline suggesting that neither AMPA/kainate nor nicotinic receptors are tonically activated in CSF-cNs.

frequency was reduced back to a value of 0.43 ± 0.09 Hz similar to that observed in control (Fig. 4D, Friedman statistical test: $p = 0.007$, for CTR vs TAPS: $p < 0.05$; for TAPS vs. Wash: $p < 0.05$, for Wash vs. CTR: ns; $n = 16$).

In contrast, as illustrated for a representative CSF-cNs, in all PKD2L1^{-/-} CSF-cNs tested, extracellular alkalinization never induced either a current response (Fig. 4B₁) or a variation in the AP frequency (Fig. 4B₂ and D). Note that in Fig. 4C no data are given for PKD2L1^{-/-} animals since no current either in control or during extracellular alkalinization could be recorded. Further in PKD2L1^{-/-} animals the CSF-cNs AP frequency was significantly lower than in the CSF-cNs from wild type littermates (see Section 3.2 and Fig. 2C–E) and remained unchanged in the presence of the alkaline solution (Fig. 4B₂ and D; Friedman statistical test: $p = 0.250$ for PKD2L1^{-/-} CTR vs. TAPS: ns; TAPS vs. Wash: ns and Wash vs. CTR: ns, $n = 3$). Note that extracellular alkalinization did not trigger AP discharge in PKD2L1^{-/-} CSF-cNs that were silent in control (data not shown).

Taken together, these results confirm that in CSF-cNs PKD2L1 channels are activated by extracellular alkalinization and show that it induced a reversible increase in their AP frequency. This modulation of CSF-cN excitability by alkalinization is strictly dependent on PKD2L1 channel since no variation in membrane current or potential was observed in CSF-cNs recorded from PKD2L1^{-/-} mice.

3.5. CSF-cNs are devoid of any excitatory synaptic inputs

Medullar CSF-cNs present spontaneous GABAergic and glycinergic synaptic activities (Orts-Del'Immagine et al., 2012) that are classically involved in an inhibitory synaptic transmission. Here, we show that activation of PKD2L1 channels has an excitatory action on CSF-cNs. To determine if CSF-cNs are also under the control of synaptic excitatory inputs, we carried out a set of experiments to determine the presence of functional excitatory ionotropic receptors and their involvement in neurotransmission.

In wild type CSF-cNs, pressure application of glutamate (Glut.) at a concentration of 100 μ M for 1 s induced a slow inward current at a holding potential of -80 mV (Fig. 5A₁, Top Left panel and 5B and 5C) with an average amplitude of -26 ± 2 pA ($n = 33$). This response was not mediated by NMDA receptors since application of NMDA (100 μ M, 1 s) in 5 out of 5 recorded CSF-cNs, failed to generate a current response even when neurons were held at -40 mV, in order to relieve the NMDA receptors voltage-dependent magnesium block (Fig. 5A₁, Top Right panel). In agreement with these results, the glutamate-evoked response was not modified in the presence of 50 μ M AP-V, a selective antagonist for NMDA receptors (see Fig. 5A₂, Left and Fig. 5B, Glut. in AP-V: -22 ± 2 pA, $n = 5$; Mann Whitney statistical test: $p = 0.323$ for Glut. alone vs. Glut. with AP-V). In contrast, application (100 μ M, 1 s) of kainate (Kai.) or AMPA induced currents with an average amplitude of -34 ± 3 pA ($n = 3$) and -33 ± 6 pA ($n = 7$), respectively similar to that obtained with glutamate (Fig. 5A₁, Bottom Left and Right, 5B and 5C; Mann Whitney statistical test: $p = 0.104$ and $p = 0.322$ for Glut. vs. Kai. and for Glut. vs. AMPA, respectively). Further, the glutamate-evoked current was inhibited by $70 \pm 4\%$ when 20 μ M DNQX was added to AP-V (Fig. 5A₂, Right and 5B, in AP-V + DNQX: -6.0 ± 0.1 pA, $n = 6$; Mann Whitney statistical test: $p < 0.0001$ for Glut. alone vs. Glut. in AP-V + DNQX). Finally, we measured the peak amplitude of the glutamate- (from -80 to $+60$ mV; $n = 12$), kainate- (from -80 to $+20$ mV; $n = 3$) and AMPA-evoked (from -80 to -20 mV; $n = 4$) currents at different holding potentials and analyzed their current–voltage relationship (Fig. 5C). This analysis indicated that the average current–voltage relationships for all three agonists was best fitted with a linear regression function and yielded reversal potentials (E_{rev}) of similar values and close to 0 mV (see inset in

Fig. 5C for reversal potentials; Kruskal–Wallis statistical test: $p = 0.416$) as expected for the non-selective cationic current mediated by AMPA/kainate receptors activation. We then looked for the presence of functional cholinergic receptors of the nicotinic type. Pressure application of acetylcholine (ACh, 1 mM for 1 s), in the presence of 1 μ M atropine to block muscarinic cholinergic receptors, induced an inward current with an average amplitude of -23 ± 4 pA (CTR; Fig. 5D, Left and 5E; $n = 11$). This current was blocked by 78% in the presence of 100 μ M D-tubocurarine (D-TC; Fig. 5D, Right and 5E; $n = 4$; Mann Whitney statistical test: $p = 0.0029$ for CTR vs. D-TC). These results are in agreement with activation of cholinergic receptors of the nicotinic type (nACh).

We next determined if the identified functional AMPA/kainate and nACh receptors were involved in a synaptic transmission onto CSF-cNs. Fig. 6A illustrates a representative current trace recorded in voltage-clamp mode at a holding potential of -80 mV (KCl-based intracellular solution with a chloride reversal potential set at $+0$ mV) where inward currents can be observed. The observed downward current deflections exhibited characteristic features of synaptic currents with a fast onset and an exponential decay (see traces at a slower timescale, Fig. 6A at the Bottom). To isolate potential AMPA/kainate and/or nACh synaptic currents, we bath applied 10 μ M gabazine and 1 μ M strychnine to block activation of synaptic GABA_A and glycine receptors, respectively (Fig. 6B). In this condition, the PKD2L1-mediated unitary current was the sole spontaneous current activity that could be recorded suggesting that CSF-cNs did not receive any excitatory synaptic entries (see Bottom panel in Fig. 6B, traces at a slower timescale). To confirm the absence of any excitatory synaptic transmission, we recorded CSF-cNs at a holding potential of -80 mV and forced vesicular release using the classical hyperosmotic shock (Fig. 6C; aCSF supplemented with 500 mM sucrose; see Section 2.3.3). In the absence of any excitatory or inhibitory ionotropic antagonist, a 10 s application of the hyperosmotic solution triggered a burst of synaptic events (Control in Fig. 6C, Right and see Bottom panel for traces at a slower timescale). Similar results were observed in 6 out of the 6 tested CSF-cNs. However, in the presence of 10 μ M gabazine and 1 μ M strychnine, the same hyperosmotic shock failed to trigger any synaptic event (Fig. 6C, Right and see Bottom panel for traces at a slower timescale) and again the only spontaneous current activity remaining was of the unitary type ($n = 4$ out of 4 recorded CSF-cNs). Finally, in the presence of 10 μ M gabazine and 1 μ M strychnine to block inhibitory neurotransmission, we pressure applied for 1 min either DNQX at 20 μ M (Fig. 6D, Left panel; $n = 3$) or D-TC at 100 μ M (Fig. 6D, Left panel; $n = 2$) to reveal potential tonic activation of AMPA/kainate or nACh receptors. However, the absence of any changes in the current baseline suggests that neither the AMPA/kainate nor the nACh receptors expressed on CSF-cNs would be activated in a tonic manner by ambient glutamate and/or ACh.

In summary, the results presented here indicate that CSF-cNs do express, along with GABA_A and glycine receptors, functional excitatory AMPA/kainate and nACh receptors. Nevertheless these latter receptors are neither synaptically nor tonically activated in CSF-cNs. These results therefore suggest that pH activated currents from channels such as ASICs and PKD2L1 would represent important sources of depolarization in CSF-cNs.

3.6. Role of PKD2L1 channel in CSF-cN excitability: a study with a model neuron

Because individual PKD2L1 channels have such large conductances, the opening of just a few of them might sufficiently depolarize the CSF-cN membrane potential to trigger APs. Further, PKD2L1-mediated current appear to be capable of modulating CSF-cN excitability. However, our experimental data do not allow

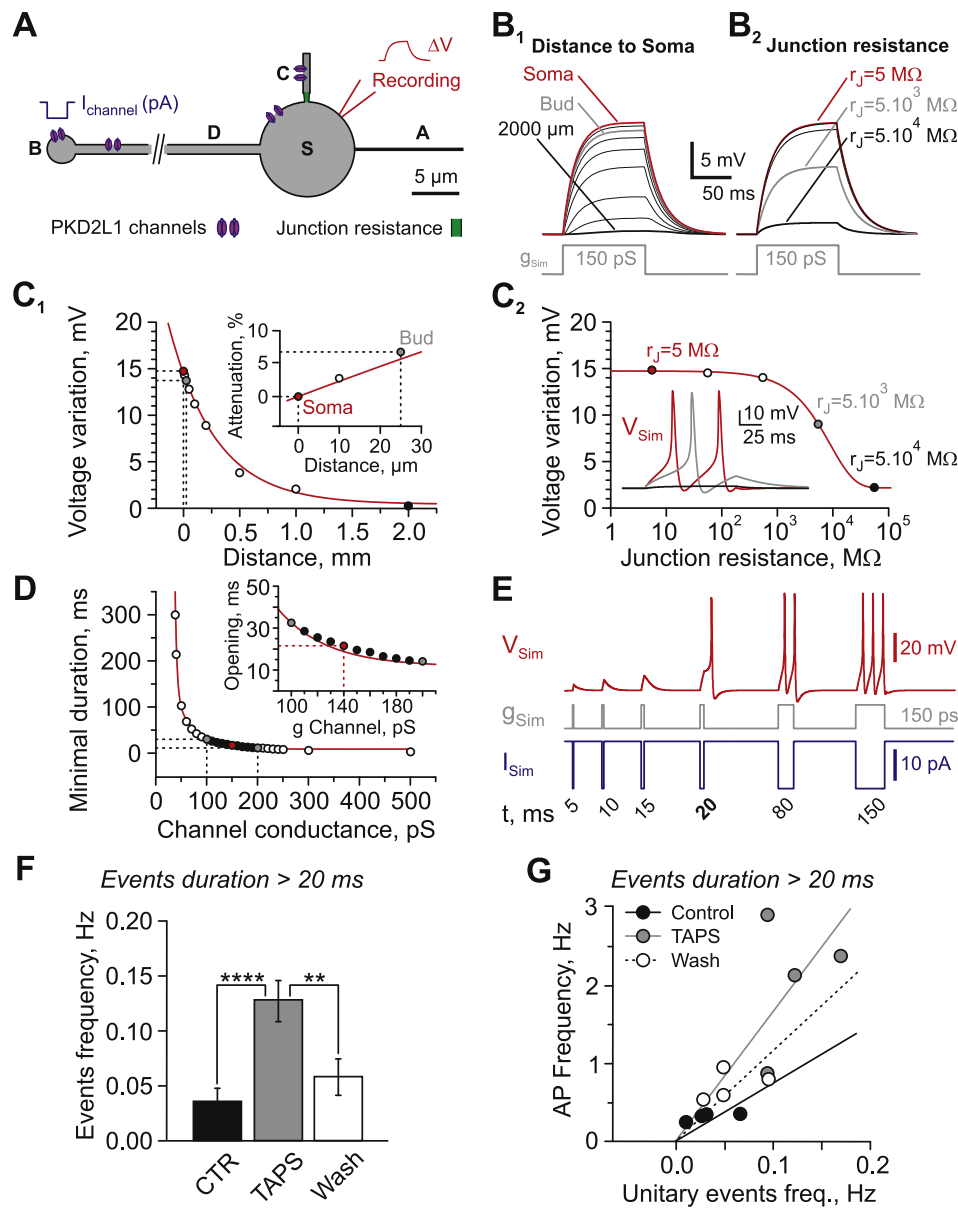


Fig. 7. Opening of a single PKD2L1 channel can trigger spikes in a realistic model of CSF-cNs. **A.** Drawing representing the model CSF-cN with its different compartments (S: soma; C: cilium; D: dendrite; B: bud and A: axon; scale bar: 5 μm). Violet symbols: one PKD2L1 channel carrying the unitary current (I_{channel}). Green box: junction compartment or resistance between cilium and soma. In the model neuron, the membrane potential variation was 'recorded' at the soma (ΔV recording or V_{sim}). **B₁**. Simulated voltage changes recorded at the soma of a *passive* model neuron in response to the opening of one PKD2L1 channel for increasing distance of the insertion site for PKD2L1 channel (red trace: Soma, 0 μm ; gray trace: Bud, 25 μm ; black trace: at 2 mm and along the dendrite). **B₂**. Simulated voltage changes recorded at the soma of a *passive* model neuron in response to the opening of one PKD2L1 channel inserted in the cilium for increasing junctional resistances between soma and cilium (R_j ; see color code) with one PKD2L1 channel inserted in the cilium. **C₁**. Plot of the voltage variation from the data in **B₁** vs. the distance to the soma (from 0 to 2000 μm). The red line represents the best fit of the data with a mono-exponential function and yielded an electrotonical length constant of 567 μm . The insert shows the attenuation in percent of the voltage response in the first 30 μm (dashed lines on the plot). **C₂**. Plot of the voltage variation from the data in **B₂** vs. the junctional resistance (from 1 to 10^5 $\text{M}\Omega$; Log scale) with the best fit of the data in red. The insert illustrates the voltage changes (V_{sim}) induced in one *active* model neurons upon activation of one PKD2L1 channel inserted in the cilium. In **C₁** and **C₂**, the symbols and traces color code refers to the traces highlighted in **B₁** and **B₂**, respectively. **D.** Plot of the minimal channel opening duration efficacious in triggering an AP in the soma as a function of the channel conductance with the best fit of the data in red (mono-exponential function). The insert presents an enlargement of the region labeled with dashed lines in the plot for a conductance between 100 and 200 pS (g Channel). **E.** Trace illustrating the voltage response (V_{sim} , red trace; Top) recorded at the soma of an *active* model neuron upon injection in the bud of a square conductance of 150 pS g_{sim} , gray trace; middle) for increasing duration (from 5 to 150 ms). The blue trace represents the corresponding unitary current I_{sim} generated in the model neuron with the *passive* properties of a real CSF-cNs (see Section 2.4 and Tables 2 and 3). **F.** Summary bar graphs of the average frequency for unitary currents with opening duration longer than 20 ms before (CTR), during (TAPS) and after (Wash) exposure to the alkaline solution (CTR, $n = 13$; TAPS and Wash; $n = 9$). ****: $p < 0.0001$; **: $p < 0.01$. **G.** Plot of the AP frequency against the frequency of unitary events with openings longer than 20 ms for 4 CSF-cNs. For each cell, data are given before (Control, black circle), during (TAPS, gray circle) and following (Wash, open circle) TAPS application and the lines represent the best fit with a linear regression function (Control, black line, $R^2 = 0.54$; TAPS, gray line, $R^2 = 0.64$ and Wash, dashed line, $R^2 = 0.64$). Note that TAPS application reversibly increases both the AP and the unitary events frequencies. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

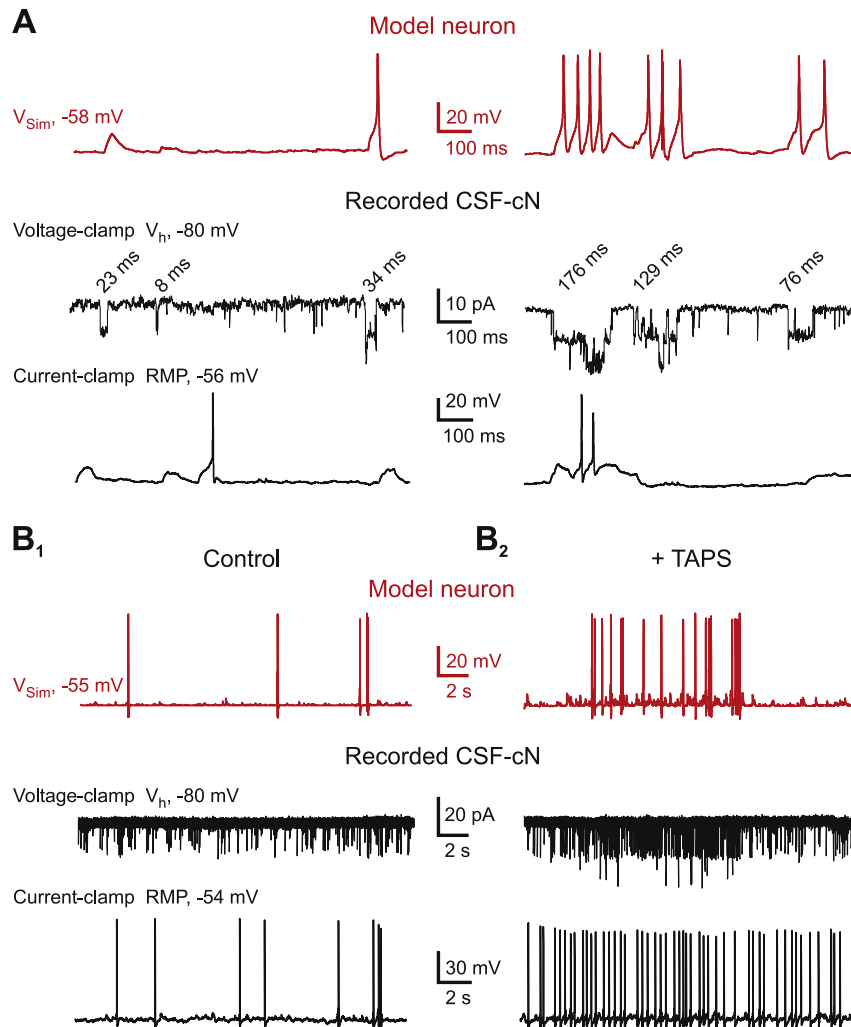


Fig. 8. The model reliably describes the firing of CSF-cNs both in control and following extracellular alkalization. **A.** Traces illustrating the voltage response recorded at the soma of an active model neuron V_{Sim} : -58 mV, red traces, Top) upon injection of current traces recorded in voltage-clamp mode at -80 mV, in a 'real' CSF-cNs (Recorded CSF-cN, Middle trace). The voltage traces recorded in current-clamp mode (RMP of -56 mV) in the same CSF-cN as the one illustrated in voltage-clamp mode are represented at the bottom. For each panels in A, opening duration of representative unitary events are indicated in milliseconds above the traces. Note that depending on the duration of channel openings short subthreshold depolarizations, single AP or even burst of AP can be elicited in the model. **B.** Traces illustrating the voltage responses elicited at the soma of an active model neuron (Model neuron, red traces; V_{Sim} , RMP: -55 mV) upon injection of current traces recorded in Control (**B₁**) and in the presence of the alkaline solution (**B₂**, + TAPS) in a 'real' CSF-cNs (V_h , -80 mV, Middle traces). The voltage traces recorded in current-clamp mode (RMP of -54 mV) in the same CSF-cN as the one illustrated in voltage-clamp mode are represented at the Bottom. Note that, in agreement with the responses recorded in the real CSF-cN, extracellular alkalization (+TAPS) elicited in the model neuron both an increase in the number of short depolarizing events and of the spiking activity. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

determining how the cellular localization (*i.e.* soma, dendrite, bud or cilium) of PKD2L1 channels affects their ability to trigger APs. They do neither provide evidence on the channel opening's minimal conditions necessary to trigger APs in CSF-cNs. To address these questions we therefore developed a simplified neuron model based on the morphological and biophysical properties of CSF-cNs (Fig. 7A, Table 2 and see Orts-Del'Immagine et al., 2012; Orts-Del'Immagine et al., 2014).

We first evaluated the electrotonic properties of CSF-cNs by inserting one PKD2L1 channel (modeled as a square conductance – see Section 2.4, Tables 2–4 and Fig. 7) in different sub-cellular compartments of a passive model neuron. Fig. 7B₁ illustrates the changes in the membrane potential recorded at the soma depending on the channel localization (from 0 μ m at the soma up to 2000 μ m). When inserted on the soma (0 μ m, red trace in Fig. 7B₁), the opening for 100 ms of one PKD2L1 channel with a conductance of 150 pS induced a +14.8 mV net variation in membrane potential,

and the amplitude decreased with the distance to reach a value of +0.4 mV (attenuation by 97%) when the channel was inserted 2000 μ m away from the soma (black trace in Fig. 7B₁). Thus the induced variation in somatic membrane potential decreased exponentially as a function of the distance between the PKD2L1 channel insertion site and the recording site (Fig. 7C₁). The fit of the simulated data with a mono-exponential function gave an electrotonical length constant of 567 μ m. If one considers a voltage change generated by the opening of one PKD2L1 channel located on the bud (distance of 25 μ m) and propagating along the dendrite, the induced voltage change at the soma would still be of +14 mV (gray trace in Fig. 7B₁) and would only be attenuated by ~7% (gray circle, in Fig. 7C₁ and inset). Therefore, with an RMP around -55 mV and an AP threshold of -40 mV (see Table 4) in a 'real' CSF-cN, a depolarization induced from any site of the somato-dendritic compartment by one PKD2L1 opening would be minimally reduced at the soma and might trigger an AP.

We recently reported that CSF-cNs possess a primary cilium attached to their soma (Orts-Del'Immagine et al., 2014). PKD2L1 channels have been shown to be expressed at the membrane of cilia in epithelial cells and the cilium was suggested to be electrically isolated from the soma due to a high resistance in the junctional compartment (DeCaen et al., 2013; Dellington et al., 2013). We therefore determined, in our *passive* neuron model, the impact of the junctional resistance (R_j) on the transmission to the soma of a depolarization generated by the opening of one PKD2L1 channel (100 ms, 150 pS conductance) located on the cilium. Fig. 7B₂ shows that for a R_j value of 5 M Ω (resistivity, $\rho = 10^2$ Ohm.cm), the voltage change generated in the cilium would be transmitted to the soma without attenuation (Fig. 7B₂ and C₂, red trace and red circle, respectively). A 100 times increase in R_j to 500 M Ω ($\rho = 10^4$ Ohm.cm) would attenuate the voltage change seen in the soma by only 5% to +14 mV while with a R_j value of 5 G Ω ($\rho = 10^5$ Ohm.cm) the somatic voltage variation would be reduced by 39% to +9 mV (gray trace and circle in Fig. 7B₂ and C₂, respectively). Finally, with a R_j of 50 G Ω ($\rho = 10^6$ Ohm.cm) the cilium would be nearly electrically isolated from the soma and the voltage variation generated would be reduced by 86% to reach only +2 mV in the soma (black trace and circle in Fig. 7B₂ and C₂, respectively). We next tested, in an *active* i.e. 'spiking' model neuron, to which extent an increase in the R_j value would prevent a subthreshold PKD2L1-dependent depolarization generated in the cilium from triggering APs in the soma. As can be seen in the inset of Fig. 7C₂, the opening of one PKD2L1 channel located in the cilium was still capable of generating an AP in the soma even with a R_j value of 5 G Ω and a voltage attenuation by 39% (see gray trace in the inset; traces color code with respect to the data shown in panels 7B₂ and 7C₂).

Having determined that any PKD2L1 channel location in the neuron could trigger AP, we further explored the impact on firing of one PKD2L1 channel opening located in the bud (25 μ m away from the soma) by varying its conductance and duration. As expected, the minimal threshold duration efficacious to trigger APs decreased exponentially with the increase in conductance (i.e. the increase in current amplitude) to reach a value below 15 ms for channel conductances higher than 200 pS (Fig. 7D). When considering an average conductance of 140 pS, as previously reported for PKD2L1 channel recorded in medullo-spinal CSF-cNs, the minimal efficient opening duration was of 22 ms (see red circle in the inset in Fig. 7D) indicating that in a 'real' CSF-cN one PKD2L1 channel would need to stay open for at least 20 ms to trigger an AP. We next determined the consequences on AP triggering and AP frequency of increasing channel opening duration (from 5 to 150 ms). The trace in Fig. 7E indicates that for opening durations smaller than 20 ms, channel activation would only generate small subthreshold depolarizations (see Left part of the trace in Fig. 7E). For durations longer than 20 ms, APs would be generated and the firing frequency would increase with the channel opening duration (see Right part of the trace in Fig. 7E). When injecting in the model neuron unitary current traces recorded in voltage-clamp mode from one 'real' CSF-cNs (Fig. 8A, Middle traces), we indeed observed that short channel openings only induced sub-threshold depolarization while longer ones triggered AP and even burst of AP (Fig. 8A, Top traces). This behavior of the model neuron was similar to that observed in a 'real' CSF-cNs where long depolarizing events triggering APs could be observed along with short sub-threshold depolarizing events with time course similar to those observed in the model neuron (Fig. 8A, Bottom traces and compare with traces on Top). Our data further indicate that single channel openings with duration below 5 ms would hardly depolarize the neuron and bring it to fire (see Fig. 8A).

The data presented above indicated that extracellular alkalization increases the firing rate in CSF-cNs by enhancing PKD2L1 channel activity (see Section 3.4 and Fig. 4). From the data of the

model, one would expect that this effect is mediated by an increase in the duration of channel openings in particular for events longer than 20 ms. We therefore determined if single channel openings lasting for at least 20 ms could be observed in CSF-cNs and at which frequency. This analysis indicates that indeed in CSF-cNs channel openings with duration of 20 ms or longer (efficacious unitary events) can be observed in CSF-cNs at a frequency of 0.04 ± 0.01 Hz (Fig. 7F; CTR, $n = 9$ and see Fig. 8A, current traces). Moreover, the frequency of efficacious unitary events was increased by ~ 3 times to 0.12 ± 0.02 Hz in the presence of the alkaline solution (TAPS) before returning to 0.05 ± 0.01 Hz, a value similar to that observed in control upon washout (Fig. 7F; Friedman statistical test: $p = 0.0004$, for CTR vs. TAPS; $p < 0.05$; for TAPS vs. Wash; $p < 0.05$, for Wash vs. CTR; ns; $n = 9$). Further, we measured in recordings from CSF-cNs the AP discharge frequency, represented it against the occurrence frequency of channels openings longer than 20 ms and determined how these two parameters were affected by extracellular alkalization (Fig. 7G; $n = 4$). This analysis indicates that extracellular alkalization reversibly increases the AP frequency by increasing the frequency of efficacious unitary events (durations >20 ms) (Fig. 7G). Finally, replaying 'real' unitary current traces recorded in control (Fig. 8B₁, traces in Middle) or upon extracellular alkalization (Fig. 8B₂, traces in Middle) in one CSF-cNs elicited a higher firing activity in the model neurons in the TAPS condition than in control (Fig. 8B red traces, Top, and compare panels 1 and 2). Note that in the TAPS condition there is a higher AP frequency along with the presence of a larger number of short sub-threshold depolarizing events compared to the control situation. As can be seen in Fig. 8B, this behavior of the model neuron is comparable to that observed in 'real' neurons either in control or in the TAPS (Fig. 8B₁ and 8B₂, respectively; Bottom traces).

Taken together the results obtained with the model neuron indicate that the opening of one single PKD2L1 channel inserted at any cellular subcompartment of CSF-cNs might generate in the soma a depolarization large enough to trigger AP discharge, provided the channel would stay open for at least 20 ms. These data further suggest that extracellular alkalization would increase CSF-cNs firing rate by increasing the frequency of efficacious unitary events. They finally support the idea that PKD2L1 activity, even at a single channel level, is capable of modulating CSF-cNs excitability by converting detection of chemical stimuli (i.e. channel activation) into an increase in AP frequency.

4. Discussion

In the present study, by comparing recordings in mice lacking PKD2L1 channels and their wild type littermates, we demonstrate that the unitary current recorded in medullar CSF-cNs is carried by PKD2L1 channels and thus we have extended our previous study (Orts-Del'Immagine et al., 2012). Next, we reveal that openings of a single channel are able to trigger APs and we suggest an important and new function for PKD2L1 as spike generator in CSF-cNs. Further, we provide evidence that spiking activity either spontaneous at normal pH or in response to extracellular alkalization is correlated to the activity of a few PKD2L1 channels and an increase in the number of efficacious unitary events. We also show that detection of strong extracellular acidification is mediated through ASIC activation and is not affected by PKD2L1 deletion. Finally, because CSF-cNs do not receive any excitatory synaptic input, pH-activated currents from channels such as ASICs and PKD2L1 would represent important excitatory inputs for CSF-cNs.

4.1. PKD2L1 expression, localization and activity in CSF-cNs

In our study, we recorded only few spontaneously active

PKD2L1 channels under whole-cell conditions and most of our recordings show only single level of activation (*i.e.* only one channel opened at a time). By calculating the channel NP_0 , we indicate that PKD2L1 had a low spontaneous activity characterized by short lasting openings (<5 ms) along with events with opening times of several tens of milliseconds. Because of the inherent experimental limitations associated with the recordings in whole-cell configuration in brain slices, it was not possible to go any further in the description of the channel kinetics (mean open and closed times). Considering the strong PKD2L1 immunoreactivity in the somato-dendritic compartment (Orts-Del'Immagine et al., 2014), such a low channel activity is surprising and raises the question of the channel localization in CSF-cNs. Channels might be inserted in the soma however at no occasion we observed unitary current in our somatic recordings carried out in cell-attached configuration. This suggests that PKD2L1 channels, if present at the somatic level, are indeed expressed at a very low density. On the other hand, PKD2L1 channel activity might not be detected by a recording electrode on the soma because channels are inserted either at distant sites (dendrite, bud) or on the primary cilium. Our modeling study does not support this hypothesis since it suggests that channel openings in any of these compartments (bud, primary cilium) would be detected at the somatic level due to the electrotonic compactness of CSF-cNs. Therefore the channel activity recorded in our condition actually reflects the number of functional channels expressed at the plasma membrane of CSF-cNs and indicates that this is extremely low. Similar low level of channel activity was reported under whole-cell recordings in HEK293T cells when expressing PKD2L1 channels as homomers (Shimizu et al., 2009, 2011). Concerning the ciliary localization of PKD2L1 channels, with our model, we aimed at determining under which conditions one PKD2L1 channel opening in the cilium would be capable of significantly affecting somatic RMP. Therefore, as a first approximation, we set all compartments to be iso-potential but that might not be the case. Delling and colleagues (2013) estimated that in the cilium the cytoplasm was >30 mV more positive than in the soma and that the cilium was connected to the soma by a high internal junctional resistance. The cilium would therefore be electrically isolated from the remaining of the cell. If these properties also applied to CSF-cNs, it is unlikely that an opening of PKD2L1 channel present on the cilium could depolarize the soma. Therefore, if one assumes that such a large junctional resistance exists between cilium and soma in CSF-cNs, PKD2L1 channels present on primary cilia might have a different function than that of spike generators (see below 4.2). One possible role, was suggested in recent studies where PKD2L1 was shown to associate with PKD1L1 (DeCaen et al., 2013) and to contribute to the high level of intracellular free calcium observed in primary cilia (Delling et al., 2013).

Although CSF-cNs might express PKD2L1 as homomeric channels, PKD2L1 is also known to co-assemble with protein partners, such as PKD1 (Murakami et al., 2005), PKD1L1 (DeCaen et al., 2013; Delling et al., 2013), PKD1L3 (Ishimaru et al., 2006, 2010) or RACK1 (Yang et al., 2012) that regulate its insertion and/or activity at the plasma membrane. Given the fact that these channels have a constitutive basal activity with a direct consequence on cell excitability (see below), a tight regulation of PKD2L1 trafficking to the plasma membrane and of its activity appears necessary to avoid an over-excitation of CSF-cNs that might lead to cell death. It would therefore be important to determine if CSF-cNs do express these regulatory proteins and under which conditions they interact with PKD2L1. Finally, PKD2L1 channels were shown to have an intracellular localization (Kaja et al., 2011) where they may act as intracellular calcium channels. Because of the strong immunoreactivity against PKD2L1, one cannot exclude that in CSF-cNs PKD2L1 has a function as intracellular calcium channel. These

hypotheses would have to be addressed in dedicated studies.

4.2. PKD2L1 channels as a spike generator and pH sensor in CSF-cNs

Opening of single channel is known to depolarize and to induce APs in high resistive cells such as olfactory cells (Lynch and Barry, 1989) and cultured embryonic hippocampal neurons (Johansson and Arhem, 1994; Arhem and Johansson, 1996). It has been hypothesized that single ionic channels, because they open stochastically, can function as cellular random generators potentially important for several neuronal processing such as development or neuronal plasticity (Johansson and Arhem, 1994; Arhem and Johansson, 1996). In our study, the neuron passive properties, their firing patterns and their morphology were identical in wild type and PKD2L1^{-/-} mice. It is therefore unlikely that PKD2L1 channel activity is essential for CSF-cN development. Nevertheless, here we show in adult animals that in CSF-cNs, having a high input resistance ($G\Omega$ range) and expressing channels of high conductance, a single PKD2L1 channel opening of sufficient duration triggers AP and thus acts as a spike generator. In fact, PKD2L1 channel activity appears to set CSF-cN spiking activity according to extracellular pH value. At neutral pH, PKD2L1 had a constitutive low activity and accordingly CSF-cNs spiked at low frequency. With the increase in extracellular pH (*i.e.* alkalization), channel activity increased and consequently spiking frequency rose. In contrast, in PKD2L1^{-/-} mice lacking functional PKD2L1 channels, CSF-cNs were mostly silent or presented a markedly reduced spiking frequency. In the latter case, stochastic openings of single ionic channels in these high resistive neurons may probably lead to random spontaneous spikes totally unrelated to PKD2L1 channel activity. On the other hand, detection of extracellular acidification by CSF-cNs appears more complex. Studies conducted in taste receptor cells have first suggested that acidification would be detected by an increased PKD2L1 channel activity, a role for PKD2L1 also proposed in spinal CSF-cNs (Huang et al., 2006). However this appears unlikely for several reasons. First, strong sour stimuli in PKD2L1-expressing taste cells were shown to be mediated by a proton conductance and not by a Na⁺ permeable PKD2L1 channel (Chang et al., 2010). Second, in medullar CSF-cNs we found that PKD2L1 channels were not activated by acidification but by alkalization as also reported by others (Chen et al., 1999; Shimizu et al., 2009, 2011). Third, we show that under voltage- or current-clamp mode responses to strong acidification were identical in PKD2L1^{-/-} and PKD2L1^{+/+} mice and mediated by ASIC1a containing channels (Diocot et al., 2007; Baron et al., 2008).

Demonstrating a correlation between channel opening rate and AP frequency is not that obvious. Due to the time necessary to charge cell membrane capacity, only long channel openings would induce spikes (see Fig. 7E and Fig. 8A). According, to our model, we estimated that one PKD2L1 channel opening for ~20 ms would be efficacious in depolarizing the membrane potential to the spike threshold (Fig. 7E). And indeed such long openings were observed under voltage- and current-clamp mode in medullar CSF-cNs (Fig. 7F and Fig. 8A). The fact that in CSF-cNs the alkaline-mediated increase in channel NP_0 is associated to an increase in the frequency of channel openings longer than 20 ms and an increase in AP frequency further supports this observation.

4.3. What gates PKD2L1 channel?

Protons are probably not the only factor that affects the gating of PKD2L1 channel. Its activity was shown to be sensitive to various factors such as voltage, temperature, osmolarity, cell volume, extracellular calcium concentration and high pressure (Chen et al.,

1999; DeCaen et al., 2013; Higuchi et al., 2014; Orts-Del'Immagine et al., 2012; Shimizu et al., 2009). One might speculate that a PKD2L1 channel represents a multimodal sensory spike generator and it would be interesting to investigate how variations of these stimuli within physiological ranges affect the gating of PKD2L1 channel and CSF-cN spiking activity. In addition, PKD2L1 was shown to be Ca^{2+} -permeable and its activity to be activated by Ca^{2+} (Chen et al., 1999; Li et al., 2002). But the action of Ca^{2+} is complex since the initial Ca^{2+} -dependent increase in PKD2L1 activity was followed by an inactivation of PKD2L1 in the prolonged exposure to high extracellular $[\text{Ca}^{2+}]$ (Chen et al., 1999). PKD2L1 protein has a Ca^{2+} -binding EF-hand motif which however does not appear to be involved in the Ca^{2+} -induced PKD2L1 activation and in the subsequent inactivation (Li et al., 2002). Neither Ca^{2+} homeostasis nor Ca^{2+} permeability of PKD2L1 channels are yet documented in mammalian CSF-cNs and these important issues will have to be addressed in the future. Interestingly, it was shown that various uridine and purine analogs (UDP, ATP and ADP) can increase the probability of channel opening and mean open times of PKD2L1/PKD1L1 heteromeric channels in primary cilia (DeCaen et al., 2013). Although neither the mechanisms of activation nor the type of receptor involved were characterized in this study, it is likely that a G-protein-coupled metabotropic purinergic receptor (P2Y) is involved. So far several ionotropic receptors have been identified in mammalian medullo-spinal CSF-cNs (Marichal et al., 2009; Orts Del'Immagine et al., 2012 and the present study) but evidence for the existence of metabotropic receptors in these cells are sparse (Brumovsky et al., 2006; Margeta-Mitrovic et al., 1999). The identification of the G-protein-coupled receptors expressed in CSF-cNs becomes now unavoidable and characterizing the consequences of their activation in CSF-cNs and on PKD2L1 gating may reveal novel mechanisms for the channel activity and regulation.

4.4. Alternative excitatory inputs to medullar CSF-cNs

The importance of PKD2L1 protein in increasing cell excitability raised also the question to know whether or not other excitatory inputs converge onto CSF-cNs. We addressed this question by first looking under voltage-clamp conditions for rapid effects mediated by classical excitatory neurotransmitters (ACh, ATP, glutamate and serotonin) through activation of ionotropic receptors. At no occasion, did we record rapid response following application of ATP (Orts-Del'Immagine et al., 2012) or serotonin (unpublished data) while glutamate and ACh induced at -80 mV fast inward currents in all medullar CSF-cNs tested that were mediated by activation of AMPA/kainate and nicotinic subtypes, respectively (Fig. 5). However, none of these receptors were involved in a synaptic transmission (Fig. 6). An observation further confirmed by the absence of any current activity in PKD2L1^{-/-} CSF-cNs once inhibitory neurotransmission was blocked. One might suggest that AMPA/kainate receptors are either involved in the detection of ambient glutamate which is known to be in the low submicromolar range in brain slice preparations (Cavelier and Attwell, 2005; Herman and Jahr, 2007) and in the CSF (Bendotti et al., 2001) or activated following glutamate spillover from neighboring synaptic pathways onto CSF-cNs. This does not appear to be the case. First, application of selective antagonists against AMPA/kainate receptors failed to induce any changes in the baseline current (Fig. 6D). Second, in conditions where GABAergic and glycinergic neurotransmission was blocked, we never observed any current activity triggered by a hyperosmotic shock (Fig. 6C). Similar conclusions can be drawn for ACh responses. Thus the function of these receptors is unclear and would need to be determined in a dedicated study. We recently indicated that medullar CSF-cNs receive synaptic GABA- and glycinergic entries (Orts-Del'Immagine et al., 2012) that are classically considered to

be inhibitory because of the hyperpolarized equilibrium potential for chloride ions. However, as reported by Marichal and colleagues (2009) for some CSF-cNs recorded in juvenile rats, one cannot exclude that GABAergic and/or glycinergic synaptic currents might be excitatory in murine medullar CSF-cNs especially when considering the intermediate state of maturity of these neurons (Orts-Del'Immagine et al., 2014). Although this possibility would need to be demonstrated, here we show that the pH-activated currents from channels such as ASICs and PKD2L1 play an important, if not major, role as excitatory inputs onto CSF-cNs.

5. Concluding remarks

The results of the present study add to the growing bulk of data and help to better characterize the physiology of CSF-cNs in mammals and of PKD2L1 channels in neurons. Our results suggest an important role for PKD2L1 channels as pH sensors and spike generators coding for changes in extracellular pH. Our study reinforces the idea that CSF-cNs are sensory neurons intrinsic to the central nervous system. This hypothesis was formulated decades ago by Kolmer (1921), who considered medullo-spinal CSF-cNs as a whole sensory organ called 'Sagittal Organ'. One future challenge will be to understand the role of PKD2L1 in neurons and to determine under which physiological and physio-pathological conditions these channels are activated. In particular one would need to determine if PKD2L1 is regulated by intracellular cascade following activation of G protein coupled receptors. The second and crucial challenge to demonstrate the function of CSF-cNs is to determine their homology.

Conflicts of interest

The authors declare no competing financial interests.

Acknowledgments

This research was supported by funding obtained from Aix-Marseille University (AMU), the "Région Provence-Alpes-Côte d'Azur", the "Conseil Général des Bouches-du-Rhône" (PACA, CG13 – Neuracid, JT), the PEPS 2010 from the CNRS INSB (Neuracil, NW) and La Ville de Marseille (Nanocan, JT). GE and MN were also supported by a France–Morocco APP Recherche 2013 Program. We would like to thank Drs CS Zuker, P Durbec and H Matsunami for sending us transgenic mice models and Drs S Diochot and E Lingueglia for generously offering the *Psalmopoeus cambridgei* toxin. We also acknowledge the AMU Microscopy Center (CP2M) for access to confocal microscopy. We thank the AVB (Analyse et Valorisation de la Biodiversité, iSm2, UMR 7313, Marseille) platform for access to genotyping instruments activities and K Poirot for genotyping the mice.

References

- Arhem, P., Johansson, S., 1996. Spontaneous signalling in small central neurons: mechanisms and roles of spike-amplitude and spike-interval fluctuations. *Int. J. Neural Syst.* 7, 369–376.
- Baron, A., Voilley, N., Lazdunski, M., Lingueglia, E., 2008. Acid sensing ion channels in dorsal spinal cord neurons. *J. Neurosci.* 28, 1498–1508.
- Basora, N., Nomura, H., Berger, U.V., Stayner, C., Guo, L., Shen, X., Zhou, J., 2002. Tissue and cellular localization of a novel polycystic kidney disease-like gene product, polycystin-L. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13, 293–301.
- Bendotti, C., Tortarolo, M., Suchak, S.K., Calvaresi, N., Carvelli, L., Bastone, A., Rizzi, M., Rattray, M., Mennini, T., 2001. Transgenic SOD1 G93A mice develop reduced GLT-1 in spinal cord without alterations in cerebrospinal fluid glutamate levels. *J. Neurochem.* 79, 737–746.
- Brumovsky, P., Hofstetter, C., Olson, L., Ohning, G., Villar, M., Hökfelt, T., 2006. The neuropeptide tyrosine Y1R is expressed in interneurons and projection neurons in the dorsal horn and area X of the rat spinal cord. *Neuroscience* 138,

- 1361–1376. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.11.069>.
- Bruni, J.E., Reddy, K., 1987. Ependyma of the central canal of the rat spinal cord: a light and transmission electron microscopic study. *J. Anat.* 152, 55–70.
- Cavelier, P., Attwell, D., 2005. Tonic release of glutamate by a DIDS-sensitive mechanism in rat hippocampal slices. *J. Physiol. (Lond)* 564, 397–410.
- Chang, R.B., Waters, H., Liman, E.R., 2010. A proton current drives action potentials in genetically identified sour taste cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 22320–22325.
- Chen, X.Z., Vassilev, P.M., Basora, N., Peng, J.B., Nomura, H., Segal, Y., Brown, E.M., Reeders, S.T., Hediger, M.A., Zhou, J., 1999. Polycystin-L is a calcium-regulated cation channel permeable to calcium ions. *Nature* 401, 383–386.
- Clapham, D.E., Julius, D., Montell, C., Schultz, G., 2010. Transient Receptor Potential Channels. IUPHAR Database (IUPHAR-db). Available at: <http://www.guidetopharmacology.org/GRAC/FamilyDisplayForward?familyId=78>.
- Cuajungco, M.P., Grimm, C., Heller, S., 2007. TRP channels as candidates for hearing and balance abnormalities in vertebrates. *Biochim. Biophys. Acta* 1772, 1022–1027.
- Dale, N., Roberts, A., Ottersen, O.P., Storm-Mathisen, J., 1987. The morphology and distribution of “Kolmer-Agduhr cells”, a class of cerebrospinal-fluid-contacting neurons revealed in the frog embryo spinal cord by GABA immunocytochemistry. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 232, 193–203.
- DeCaen, P.G., Delling, M., Vien, T.N., Clapham, D.E., 2013. Direct recording and molecular identification of the calcium channel of primary cilia. *Nature* 504, 315–318.
- Delling, M., DeCaen, P.G., Doerner, J.F., Fejvay, S., Clapham, D.E., 2013. Primary cilia are specialized calcium signalling organelles. *Nature* 504, 311–314.
- Diochot, S., Salinas, M., Baron, A., Escoubas, P., Lazdunski, M., 2007. Peptides inhibitors of acid-sensing ion channels. *Toxicol.* 49, 271–284.
- Djenoune, L., Khabou, H., Joubert, F., Quan, F.B., Nunes Figueiredo, S., Bodineau, L., Del Bene, F., Burcklé, C., Tostivint, H., Wyart, C., 2014. Investigation of spinal cerebrospinal fluid-contacting neurons expressing PKD2L1: evidence for a conserved system from fish to primates. *Front. Neuroanat.* 8, 26.
- Harris, P.C., Torres, V.E., 2014. Genetic mechanisms and signaling pathways in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J. Clin. Invest* 124, 2315–2324. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI72272>.
- Herman, M.A., Jahr, C.E., 2007. Extracellular glutamate concentration in hippocampal slice. *J. Neurosci.* 27, 9736–9741.
- Higuchi, T., Shimizu, T., Fujii, T., Nilius, B., Sakai, H., 2014. Gating modulation by heat of the polycystin transient receptor potential channel PKD2L1 (TRPP3). *Pflug. Arch.* 466, 1933–1940.
- Hines, M.L., Carnevale, N.T., 1997. The NEURON simulation environment. *Neural Comput.* 9, 1179–1209.
- Horio, N., Yoshida, R., Yasumatsu, K., Yanagawa, Y., Ishimaru, Y., Matsunami, H., Ninomiya, Y., 2011. Sour taste responses in mice lacking pkd channels. *PLoS One* 6, e20007.
- Huang, A.L., Chen, X., Hoon, M.A., Chandrashekar, J., Guo, W., Tränkner, D., Ryba, N.J.P., Zuker, C.S., 2006. The cells and logic for mammalian sour taste detection. *Nature* 442, 934–938.
- Inada, H., Kawabata, F., Ishimaru, Y., Fushiki, T., Matsunami, H., Tominaga, M., 2008. Off-response property of an acid-activated cation channel complex PKD1L3-PKD2L1. *EMBO Rep.* 9, 690–697.
- Ishii, S., Misaka, T., Kishi, M., Kaga, T., Ishimaru, Y., Abe, K., 2009. Acetic acid activates PKD1L3-PKD2L1 channel—a candidate sour taste receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 385, 346–350.
- Ishimaru, Y., Inada, H., Kubota, M., Zhuang, H., Tominaga, M., Matsunami, H., 2006. Transient receptor potential family members PKD1L3 and PKD2L1 form a candidate sour taste receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 12569–12574.
- Ishimaru, Y., Katano, Y., Yamamoto, K., Akiba, M., Misaka, T., Roberts, R.W., Asakura, T., Matsunami, H., Abe, K., 2010. Interaction between PKD1L3 and PKD2L1 through their transmembrane domains is required for localization of PKD2L1 at taste pores in taste cells of circumvallate and foliate papillae. *FASEB J.* 24, 4058–4067.
- Johansson, S., Arhem, P., 1994. Single-channel currents trigger action potentials in small cultured hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 1761–1765.
- Kaja, S., Hilgenberg, J.D., Rybalchenko, V., Medina-Ortiz, W.E., Gregg, E.V., Koulen, P., 2011. Polycystin-2 expression and function in adult mouse lacrimal acinar cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52, 5605–5611.
- Kolmer, W., 1921. Das “Sagittalorgan” der Wirbeltiere. *Z. Anat. Entwicklungs* 60, 652–717.
- Li, Q., Liu, Y., Zhao, W., Chen, X.-Z., 2002. The calcium-binding EF-hand in polycystin-L is not a domain for channel activation and ensuing inactivation. *FEBS Lett.* 516, 270–278.
- Li, Q., Dai, X.-Q., Shen, P.Y., Wu, Y., Long, W., Chen, C.X., Hussain, Z., Wang, S., Chen, X.-Z., 2007. Direct binding of alpha-actinin enhances TRPP3 channel activity. *J. Neurochem.* 103, 2391–2400.
- Liu, Y., Li, Q., Tan, M., Zhang, Y.-Y., Karpinski, E., Zhou, J., Chen, X.-Z., 2002. Modulation of the human polycystin-L channel by voltage and divalent cations. *FEBS Lett.* 525, 71–76.
- LopezJimenez, N.D., Cavenagh, M.M., Sainz, E., Cruz-Ithier, M.A., Battey, J.F., Sullivan, S.L., 2006. Two members of the TRPP family of ion channels, Pkd113 and Pkd211, are co-expressed in a subset of taste receptor cells. *J. Neurochem.* 98, 68–77.
- Lynch, J.W., Barry, P.H., 1989. Action potentials initiated by single channels opening in a small neuron (rat olfactory receptor). *Biophys. J.* 55, 755–768.
- Margeta-Mitrovic, M., Mitrovic, I., Riley, R.C., Jan, L.Y., Basbaum, A.I., 1999. Immunohistochemical localization of GABA(B) receptors in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 405, 299–321.
- Marichal, N., Garcia, G., Radmilovich, M., Trujillo-Cenóz, O., Russo, R.E., 2009. Enigmatic central canal contacting cells: immature neurons in “standby mode”? *J. Neurosci.* 29, 10010–10024.
- Murakami, M., Ohba, T., Xu, F., Shida, S., Satoh, E., Ono, K., Miyoshi, I., Watanabe, H., Ito, H., Iijima, T., 2005. Genomic organization and functional analysis of murine PKD2L1. *J. Biol. Chem.* 280, 5626–5635.
- Nauli, S.M., Alenghat, F.J., Luo, Y., Williams, E., Vassilev, P., Li, X., Elia, A.E.H., Lu, W., Brown, E.M., Quinn, S.J., Ingber, D.E., Zhou, J., 2003. Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat. Genet.* 33, 129–137.
- Nomura, H., Turco, A.E., Pei, Y., Kalaydjieva, L., Schiavello, T., Weremowicz, S., Ji, W., Morton, C.C., Meisler, M., Reeders, S.T., Zhou, J., 1998. Identification of PKDL, a novel polycystic kidney disease 2-like gene whose murine homologue is deleted in mice with kidney and retinal defects. *J. Biol. Chem.* 273, 25967–25973.
- Orts-Del'Immagine, A., Wanaverbecq, N., Tardivel, C., Tillement, V., Dallaporta, M., Trouslard, J., 2012. Properties of subependymal cerebrospinal fluid contacting neurones in the dorsal vagal complex of the mouse brainstem. *J. Physiol. (Lond)* 590, 3719–3741.
- Orts-Del'Immagine, A., Kastner, A., Tillement, V., Tardivel, C., Trouslard, J., Wanaverbecq, N., 2014. Morphology, distribution and phenotype of polycystin kidney disease 2-like 1-positive cerebrospinal fluid contacting neurones in the brainstem of adult mice. *PLoS One* 9, e87748.
- Roux, J., Wanaverbecq, N., Jean, A., Lebrun, B., Trouslard, J., 2009. Depolarization-induced release of endocannabinoids by murine dorsal motor nucleus of the vagus nerve neurons differentially regulates inhibitory and excitatory neurotransmission. *Neuropharmacology* 56, 1106–1115.
- Shimizu, T., Janssens, A., Voets, T., Nilius, B., 2009. Regulation of the murine TRPP3 channel by voltage, pH, and changes in cell volume. *Pflug. Arch.* 457, 795–807.
- Shimizu, T., Higuchi, T., Fujii, T., Nilius, B., Sakai, H., 2011. Bimodal effect of alkalization on the polycystin transient receptor potential channel, PKD2L1. *Pflug. Arch.* 461, 507–513.
- Shimosegawa, T., Koizumi, M., Toyota, T., Goto, Y., Yanaihara, C., Yanaihara, N., 1986. An immunohistochemical study of methionine-enkephalin-Arg6-Gly7-Leu8-like immunoreactivity-containing liquor-contacting neurons (LCNs) in the rat spinal cord. *Brain Res.* 379, 1–9.
- Stoeckel, M.-E., Uhl-Bronner, S., Hugel, S., Veinante, P., Klein, M.-J., Mutterer, J., Freund-Mercier, M.-J., Schlichter, R., 2003. Cerebrospinal fluid-contacting neurons in the rat spinal cord, a gamma-aminobutyric acidergic system expressing the P2X2 subunit of purinergic receptors, PSA-NCAM, and GAP-43 immunoreactivities: light and electron microscopic study. *J. Comp. Neurol.* 457, 159–174.
- Takumida, M., Anniko, M., 2010. Expression of transient receptor potential channel mucolipin (TRPML) and polycystine (TRPP) in the mouse inner ear. *Acta Otolaryngol.* 130, 196–203.
- Veldhuisen, B., Spruit, L., Dauwerse, H.G., Breuning, M.H., Peters, D.J., 1999. Genes homologous to the autosomal dominant polycystic kidney disease genes (PKD1 and PKD2). *Eur. J. Hum. Genet.* 7, 860–872. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200383>.
- Vigh, B., Manzano e Silva, M.J., Frank, C.L., Vincze, C., Czirok, S.J., Szabó, A., Lukáts, A., Szél, A., 2004. The system of cerebrospinal fluid-contacting neurons. Its supposed role in the nonsynaptic signal transmission of the brain. *Histol. Histopathol.* 19, 607–628.
- Vigh, B., Vigh-Teichmann, I., Manzano e Silva, M.J., van den Pol, A.N., 1983. Cerebrospinal fluid-contacting neurons of the central canal and terminal ventricle in various vertebrates. *Cell Tissue Res.* 231, 615–621.
- Wu, G., Hayashi, T., Park, J.H., Dixit, M., Reynolds, D.M., Li, L., Maeda, Y., Cai, Y., Coca-Prados, M., Somlo, S., 1998. Identification of PKD2L, a human PKD2-related gene: tissue-specific expression and mapping to chromosome 10q25. *Genomics* 54, 564–568. <http://dx.doi.org/10.1006/geno.1998.5618>.
- Yang, J., Wang, Q., Zheng, W., Tuli, J., Li, Q., Wu, Y., Hussein, S., Dai, X.-Q., Shafiei, S., Li, X.-G., Shen, P.Y., Tu, J.-C., Chen, X.-Z., 2012. Receptor for activated C kinase 1 (RACK1) inhibits function of transient receptor potential (TRP)-type channel Pkd2L1 through physical interaction. *J. Biol. Chem.* 287, 6551–6561.

**XI. Annexes 2: TRACE ELEMENTS DISTRIBUTION IN
THE BRAIN OF STRESSED RATS**

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/260243974>

TRACE ELEMENTS DISTRIBUTION IN THE BRAIN OF STRESSED RATS

Article · January 2012

DOI: 10.3844/ajnspp.2012.79.86

CITATIONS

0

READS

41

7 authors, including:



Mohamed Najimi

Université Sultan Moulay Slimane

66 PUBLICATIONS 331 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Mariama El Ouahli

University Sultan Moulay Sliman

9 PUBLICATIONS 21 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Fatiha Chigr

Université Sultan Moulay Slimane

65 PUBLICATIONS 340 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



Neurotoxicity of heavy metals and pesticides: neurodevelopmental aspects [View project](#)

TRACE ELEMENTS DISTRIBUTION IN THE BRAIN OF STRESSED RATS

¹Zerrouk Kamal, ²Mohamed Najimi, ²Mohammed Chigr,
¹Mariama El Ouahli, ¹Ghizlane Er-Raoui and ¹Fatiha Chigr

¹Genie Biologique Laboratory, Faculty of Sciences and Techniques,
²Département of Chemistry and Environnement, Faculty of Sciences and Techniques,
Sultan Moulay Slimane University, Béni-Mellal, Morocco

Received 2012-03-12, Revised 2012-09-02; Accepted 2012-09-14

ABSTRACT

Because of their ability to modulate the Gamma Aminobutyric Acid (GABA) a receptor complex, the principal aim of the current work is to assess two essential heavy metals: Iron (Fe) and zinc (Zn) by atomic absorption in different brain areas of stressed rats. To do so, we investigated the effect of acute immobilization stress (single 1-hour session) on the distribution and the densities of GABA_A receptors as well as the concentrations of Zn and Fe in several rat brain regions of the stressed rats. Animals were randomly assigned to either control or stress conditions and changes in specific binding of the GABA_A receptor as labelled with T-Butylbicyclophosphonothionate (TBPS) (ligand useful for GABA_A receptor) were assessed by in vitro quantitative autoradiography with the aid of a computer-assisted image analysis system whereas the assessment of Fe and Zn concentrations was done by atomic absorption spectrophotometry. Exposure to 1h immobilization stress led to a significant increase in [³⁵S]-TBPS binding site density in stressed rats compared to controls (30-40% increase in cortex, hypothalamus, hippocampus and substantia nigra). In the other analyzed brain structures, specific binding of [³⁵S]-TBPS remained unchanged in stressed rats. The spectrophotometer analysis showed significant decrease in Zn levels in the whole forebrain structures as well as the mesencephalon of stressed rats. The striking differences are noticed in hippocampus and mesencephalon. Furthermore, Fe endogenous concentrations display similar pattern following stress. The present study demonstrates that immobilization stress induces an increase in GABA_A receptors concomitant to a reduction of Zn and Fe content in the stress sensitive rat brain structures. Besides supporting the alteration of the modulatory function occurring at the GABA_A receptor level after stress, our data also reveal that the measured brain concentrations of the investigated heavy metals remain not sufficient to efficiently modulate the activity of with efficacy such complex receptor. This could explain the higher densities of GABA_A receptors observed after acute stress.

Keywords: Zinc, Iron, GABA_A, Stress, Brain

1. INTRODUCTION

Gamma Aminobutyric Acid (GABA) A receptors are ligand-gated ion channels, mediating fast synaptic inhibition in the Central Nervous System (CNS) (Mody, 2012; Farrant and Nusser, 2005). These receptors are the targets of a variety of pharmacologically and clinically important drugs such as benzodiazepines, depressant

barbiturates and neuroactive steroids (Smith *et al.*, 2007). Beside these major modulators, some metal cations are able to inhibit the GABA response of neurons in a variety of organisms (Chen and Yung, 2006). Among them zinc and at a lesser extent iron, have been reported to be the most potent (Rahman, 2007). Zn²⁺ ions inhibit GABA_A receptor function by an allosteric mechanism that is critically dependent on the receptor subunit

Corresponding Author: Fatiha Chigr, Laboratoire de Génie Biologique, Faculté des Sciences et Techniques, PO. Box: 523,
Sultan Moulay Slimane University, Béni-Mellal 23000, Morocco Tel: 212-523485112 Fax: 212-523485201

composition: $\alpha\beta$ -subunit combinations show the highest sensitivity to Zn^{2+} (Krishek *et al.*, 1998; Saxena and Macdonald, 1996). Zn^{2+} antagonism is also affected by α - subunit (Draguhn *et al.*, 1990; Smart *et al.*, 1991; White and Gurley, 1995). The inhibitory effect of Zn^{2+} is reduced by exchanging $\alpha 1$ -subunit for $\alpha 2$ - or $\alpha 3$ -subunits. Finally, Zn^{2+} as picrotoxin and pregnenolone sulfate, two endogenous modulators of GABA_A receptor, exert their effect directly binding in the ion channel (Hosie *et al.*, 2003; Krishek *et al.*, 1996). The mechanism involving the Gamma-Aminobutyric Acid (GABA) in stress is well known (Foddi *et al.*, 1997). Indeed, many reports suggest that GABA_A receptors may mediate responses to stressors and the physiological control of stress (Drugan *et al.*, 1993; Gunn *et al.*, 2011). Stress has also been shown to be associated with alterations in the capacity of ligand binding to the GABA_A receptor complex (Concas *et al.*, 1993; Barbaccia *et al.*, 1996; Serra *et al.*, 2000). GABA_A receptors density and modulation have been documented to significantly increase in density following the application of acute stress (Chigr *et al.*, 2001a; 2001b; 2002) probably as a consequence of an alteration of endogenous modulator levels. recently, several stress paradigms have been shown to induce significant reduction in serum zinc concentration (Cieslic *et al.*, 2011). Fe^{2+} was also reported to interact with Zn^{2+} especially in stressful situations. Psychological stress may cause decreased Fe^{2+} absorption and iron redistribution in body resulting in low iron concentrations in the bone marrow, an effect counterbalanced by zinc (Li *et al.*, 2012). Therefore, the aim of the present study was to evaluate the changes that may occur for the concentrations of the two heavy metals Zn^{2+} and Fe^{2+} in the brain of stressed rats and to correlate such alterations to the [³⁵S]-TBPS binding on the benzodiazepine/GABA chloride ionophore receptor complex.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. *In vitro* Autoradiography Procedures

The experiments were performed on male Wistar rats (n = 16, weighting initially 180-200 g). The animals were housed (3-4 per standard cage) under controlled laboratory conditions (12-h light/dark cycle, constant temperature: 22±2°C and humidity: 60±2%) with food and water freely available. These conditions are rigorously respected to avoid any other stress situations. All experimental procedures were conducted between 8:00 a.m. and 10:00 p.m. Animals were handled for 5 days (20 min day⁻¹) to habituate them to the stress of handling and assigned to either a control (no stress) (n =

8) or immobilization stress (one 1-h stress session) (n = 8). At the time of experiments, the rats of the experimental group were picked up from their cages and were immediately subjected to stress immobilization. Immobilization stress conducted under this protocol was done as previously described by Kvetnansky and Mikulaj (1970) with slight modifications. Stress was applied by placing the rats on a piece of wood and the front and hind legs of the rats were immobilized with plastic collars and adhesive tape on the boards of the wood. This allowed normal breathing and only restricted movements were possible (free movement of the head and tail). The animals were kept immobilized for 1 h. These experimental measures minimized the pain of the rats. Ten minutes after the single immobilization stress session animals were killed by decapitation. Control rats were killed after removal from the home cages without prior manipulations. In all experiments, the immobilization procedure and sacrifice were performed between 10 and 12 h, to avoid possible circadian variations in the receptor function. After sacrifice, the brains were removed, snap-frozen in dry ice and kept at -80°C until sectioning. Serial coronal 20 μ m thick sections from each brain were cut at -20°C in a cryostat (Figocut 2880, Reichert Jung), collected onto 2% gelatin-coated slides and kept at -20°C until used. [³⁵S] T-Butylbicyclophosphonothionate (TBPS) autoradiography was conducted as we previously described (Chigr *et al.*, 2002). Briefly, after a preincubation step of 30 min in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, brain slices were incubated with 3 nM [³⁵S]TBPS (100-140 Ci/mmol; NEN, Boston, MA) in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing 500 mM NaCl and 10⁻⁴ M ascorbic acid, for 3 h at room temperature, in the absence (total binding) or in the presence of the unlabelled compound (picrotoxin, Sigma Chemical Co., St Louis, MO). The slices were then rinsed, dried out in ambient air, transferred to cardboard film cassettes along with slides containing labelled plastic standard (Amersham, Les Ulis, France) and apposed onto [3H]Hyperilm (Amersham). After an exposure period of 36 h at 4°C, the films were developed and fixed. The obtained autoradiographic labelling was quantified in many brainstem structures by computerized densitometry (Biocom, Les Ulis, France). Data were measured in relative Optical Density (OD) units for displacement studies. Drug-inhibited [³⁵S]-TBPS binding was then plotted as a percentage of the specific binding obtained in the absence of the drugs. For non-displacement studies, the optical densities of each structure, were measured from the exposed film and converted into femtomoles/mg (fmol/mg), based on calibration curves of standards with known radioactivity (Miller, 1991). Specific binding was defined as total binding minus non-specific binding (binding in the

presence of 10^{-5} M picrotoxin). For all experiments, each point was the mean of measurements in five to eight sections for each individual animal, repeated with at least five animals for either control or stressed rats. The data were compared by Analysis Of Variance (ANOVA) followed by Scheffe's test. A P value of <0.05 was considered statistically significant.

2.2. Brain Zinc and Iron Determination

For zinc and iron determination, two other groups of rats ($n = 6$, for each group) assigned to stress or not, were euthanized by decapitation 24 h after the session of stress. Rat brains were then collected and dissected to obtain: frontal cortex, hippocampus, thalamus, hypothalamus and mesencephalon the brain regions dissected were frozen and stored at -20°C until analysis. Each sample was wet-digested with nitric acid and hydrogen peroxide (microwave digestion). The zinc and iron concentrations were determined using flame atomic absorption spectrometry. The equipment used was a Thermo scientific, ICE 3000 Spectrophotometer with deuterium background correction (air flow- 4.2 L min^{-1} , acetylene flow- 1.2 L min^{-1} , analytical wavelength- 213.9 nm). Relative Standard Deviation (RSD) of the method (the whole analytical procedure: digestion + metal determination) did not exceed 2.4%. Mean recovery of zinc and for iron was 99%. The aqueous standard solutions were obtained from Zn (Zinc Standard Solution, Merck, Germany) and FeNO_3 (Sigma Aldrich). The data obtained were analysed by Analysis Of Variance (ANOVA) followed by Scheffe's test. A P value of <0.05 was considered statistically significant.

3. RESULTS

The distribution of GABA_A receptors, using $[^{35}\text{S}]\text{-TBPS}$ as a ligand, showed a heterogeneous distribution in both stressed and unstressed rat brain. However, the quantification of the radioautographic labeling revealed the presence of significant differences in the density of $[^{35}\text{S}]\text{-TBPS}$ binding sites. As shown in **Fig. 1**, high significant densities were principally found in the forebrain of stressed rats (30-40% increase). This includes hypothalamus, hippocampus and cerebral cortex. Detailed analysis, demonstrates that significant differences were confirmed in areas known to be sensitive to stress, such as layer IV of the cerebral cortex, the dentate gyrus in hippocampus and the paraventricular nucleus in the hypothalamus. In all these structures, the $[^{35}\text{S}]\text{-TBPS}$ binding (2 nM) was increased significantly ($p < 0.05$, $n = 8$ for each group and 6-8 measurements for each rat) after 1 h session of immobilization stress. The other structures belonging to cerebral cortex (as layer VI), thalamus (for example paraventricular nucleus) and hypothalamus did not display any significant differences in TBPS binding. In the brainstem, the only striking difference was observed in the substantia nigra at the mesencephalic level in accordance with our previous results ($p < 0.05$, $n = 8$ for each group and 6-8 measurements for each rat) following 1 h of immobilization stress session (Chigr *et al.*, 2001a; 2001b). The binding observed in other structures as collucili and substantia gelatinosa was also not affected after stress (**Fig. 1**).

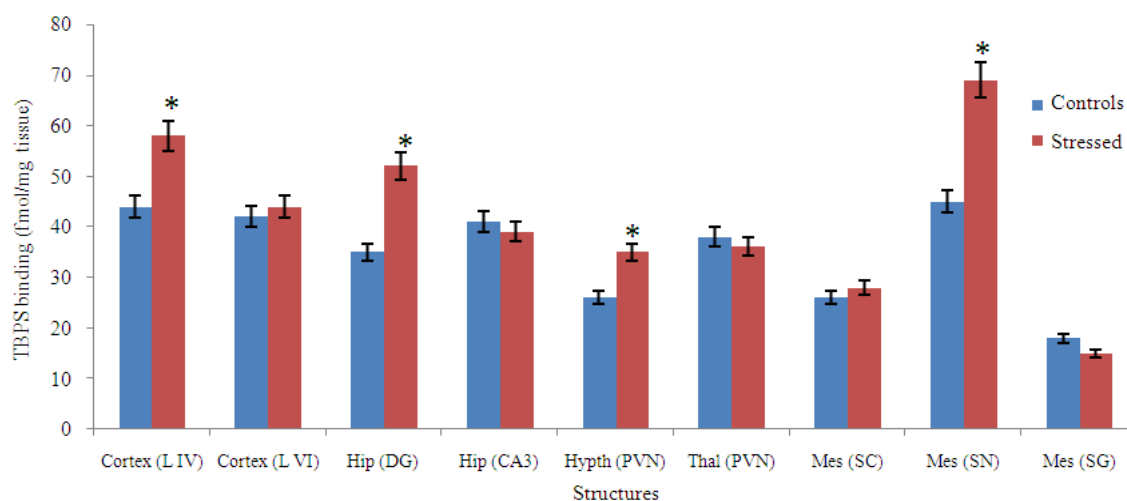


Fig. 1. Effect of 1h-immobilization on TBPS binding sites in different brain structures as determined by *in vitro* quantitative autoradiography

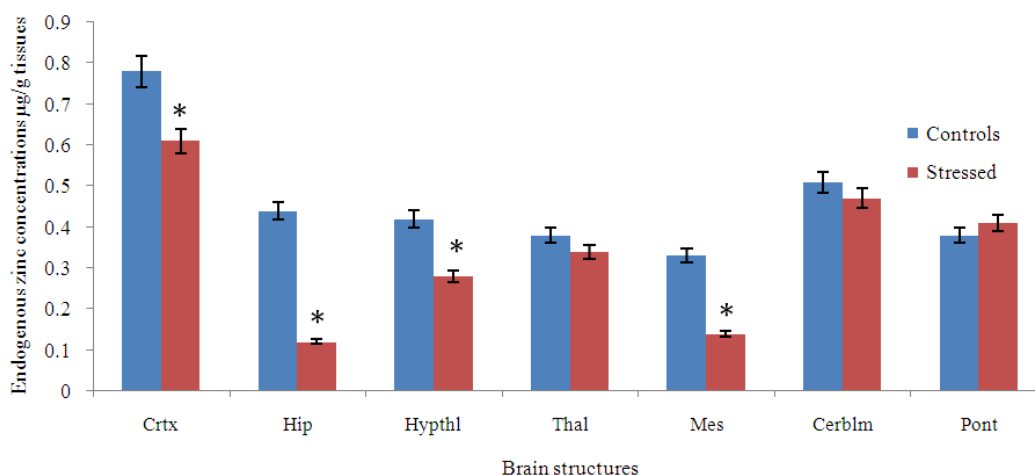


Fig. 2. Effect of 1h-immobilization on endogenous zinc concentrations in different brain structures as assessed by atomic absorption spectrophotometry

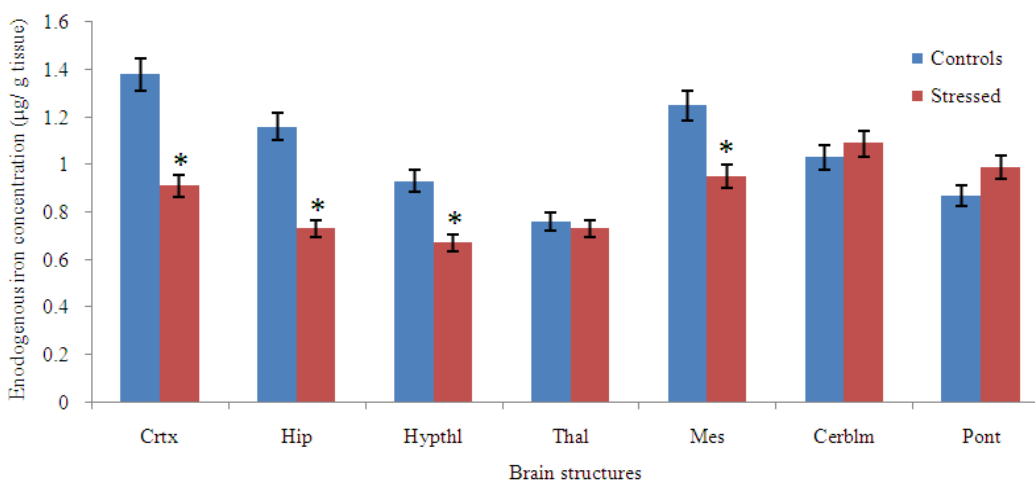


Fig. 3. Effect of 1h-immobilization on endogenous iron concentrations in different brain structures as assessed by atomic absorption spectrophotometry

In other stressed and unstressed rat groups ($n = 6$, for each group), we in parallel measured the endogenous brain levels of zinc and iron. The spectrophotometric analysis showed that the mean concentrations of Zn^{2+} are significantly decreased in all the sensitive structures reported to be sensitive to stress (displaying high TBPS binding). This effect on endogenous zinc concentrations is well displayed in forebrain structures, principally hippocampus; where the lowest concentrations were observed (25-65% decrease in stressed rats compared to controls, $p < 0.05$, $n = 6$ for each experimental group; **Fig. 2**). A significant decrease in Zn concentration was also measured in the mesencephalon (around 55% of decrease

in stressed rats compared to controls, $p < 0.05$, **Fig. 2**). Thalamus, cerebellum and pontine which did not display increase in TBPS binding, also did not show any significant fluctuation in zinc concentration. Fe levels analysis showed significant decrease in the forebrain region and mesencephalon of the stressed rats (20-35% decrease in stressed rats compared to controls, compared to controls, $p < 0.05$, **Fig. 3**). Similarly to endogenous zinc concentrations, stress does not affect significantly the endogenous iron concentrations in cerebellum and pontine (**Fig. 3**). Globally, the brain areas sensitive to stress, show both alterations in $GABA_A$ receptors and zinc and iron concentrations.

4. DISCUSSION

The present study examined the effects of immobilization stress on the brain concentrations of two essential heavy metals, i.e., zinc and iron, i.e., zinc and iron proposed as endogenous modulators of the GABA_A receptor complex (for review Rahman, 2007). We firstly assessed the influence of the stress paradigm we used on the in vitro autoradiography [³⁵S]-TBPS binding, a ligand that binds at or near the chloride channel of the GABA_A receptor complex (Atack *et al.*, 2007). The experiments presented herein revealed that the GABA_A receptor complex as labeled by [³⁵S]-TBPS was affected by a single exposure to stress (1-h immobilization) in the rat brain. These findings also show that stress effects were specifically noticed at specific regions of the rat brain. Indeed, some regions of the cerebral cortex, hippocampus, hypothalamus and substantia nigra were the structures sensitive to stress immobilization. No significant differences were observed in the other structures. Thereafter, we investigated the effect of acute immobilization stress on the endogenous metals concentration and demonstrated that a significant decrease in their brain levels. Unfortunately, while the autoradiography technique allows the fine anatomical determination of structures concerned by stress, this is not possible with spectrophotometry absorption technique that necessitates important brain punches. Thus, it was impossible to determine the Zn values for the layer IV of cerebral cortex or for the paraventricular nucleus of the hypothalamus. The values of metal concentrations concern the whole structure. This could not allow us to determine if other subdivisions in these structures account for the decrease observed or not.

The findings concerning stress effect on GABA_A receptors density reinforce the idea that the GABAergic system seems to be differentially affected by stress according to the brain area studied (Losada, 1989). The enhancement of [³⁵S]-TBPS binding could be explained by the reduced concentrations of endogenous GABA, occurring specifically after stress. Such responses may, in turn enhanced the GABA_A receptor sensitivity to other endogenous ligands. In addition, the present findings are different from previous data showing decreases in the binding of [³⁵S]-TBPS in many brain structures after stress (Drugan *et al.*, 1993). The discrepancy may be due to several procedural factors or to the stress type applied. The mechanism whereby stress alters TBPS binding sites also allows other hypotheses. Thus, it is possible that the individual brain region differences observed could be due to the subunit heterogenous distribution in these brain structures (Fritschy and Mohler, 1995). As a

consequence, the potency and magnitude of the stress effect could be influenced by the subunit composition of the GABA_A receptor. In this sense, the selectivity of the stress effect for certain sub-unit assemblies could not be excluded. The observed alterations might also result from changes in brain neuroactive steroid levels known to exert anxiolytic (Bitran *et al.*, 1991) and anti-stress (Barbaccia *et al.*, 1996) effects in brain. It is likely that by reducing the synthesis and the release of neurosteroids, acute stress will enhance the [³⁵S]-TBPS binding. Finally, it is not excluded that the observed changes could be due to the fact that in the stress paradigm used, the concentration range over which several modulators were able to counteract the impairment in GABAergic transmission (Barbaccia *et al.*, 1996; Concas *et al.*, 1998) has not yet been reached in the brain structures sensitive to stress. This could explain why the low concentrations of zinc obtained after stress, are not able to efficiently inhibit GABA_A receptor function. Indeed, the transition metal ion Zn²⁺ is concentrated into zinc-containing neurons in the CNS and is thought to be involved in modulating the sensitivity of GABA and glutamate receptors to their respective neurotransmitters (Frederickson, 1989; Frederickson and Bush, 2001). Zinc is known to inhibit and to reduce the spontaneous and the miniature inhibitory postsynaptic currents (Chen and Yung, 2006). The decrease in zinc concentrations leads probably to the alteration of the capacity of the metal to modulate the tonic GABAergic inhibition (Smart *et al.*, 2004). Among possible other explanations for this negative result is that synaptically released Zn²⁺ is confined to excitatory synapses and that Zn²⁺ spillover to GABAergic synapses is not sufficient to modulate the GABA_A receptors present (Ruiz *et al.*, 2003). Zinc as other active endogenous modulators of the GABA_A receptor, is negatively affected by stress which reduces its endogenous concentrations and could results probably in uncoupling of zinc and TBPS binding sites in the GABA_A receptor complex. As a consequence, the affinity of zinc towards its binding site in the GABA_A receptor complex will decrease. Finally it is not excluded that some of these changes may be explained by altered expression of subunits that affect the sensitivity of receptors to Zn²⁺. Zinc is known to exhibit antidepressant like activity (Hosie *et al.*, 2003) and any reduction in its endogenous levels leads to anxiety states (Huang *et al.*, 2012). This is an agreement with the anxiety behavior observed in stressed rats (Charrier *et al.*, 2006). Hence, supplementation of zinc was suggested to abolish or to reduce the anxiety-like state observed

following stressful conditions (Cope *et al.*, 2011). The supplemented zinc will reach the containing zinc neurons to probably reinforce the role of the endogenous zinc. Zinc supplementation was also reported to prevent stress effects and stress-induced decrease in iron levels (Li *et al.*, 2012). The data of the present investigations confirm low levels of endogenous cerebral iron after acute immobilization stress. This could be due to a changed systemic and brain iron homeostasis following the application of psychological stress (Ma *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008) occurring via regulation of iron transport (Moss and Morgan, 2004). The role of transferrin seemed to be of high importance since stress induced reduction in ferritin and the subsequent reduction in iron storage and utilization (Huang *et al.*, 2012).

Our findings and the mentioned reports support the fact that a reduction in endogenous level zinc disturbs iron homeostasis in brain, which seems to be highly sensitive to zinc levels. The reduction in serum zinc concentration has also been reported following stress which is concomitant with a decrease in BDNF expression in hippocampus (Cieslic *et al.*, 2011). Indeed, zinc treatment has been shown to induce cortical BDNF gene expression (Nowak *et al.*, 2004). The mechanism, by which the reduction of Zn influences that of BDNF expression, passes probably via the GABAergic system. GABA is reported to diminish the glutamate-stimulated expression of BDNF transcripts and inhibited the stimulatory effect of glutamate on BDNF peptide content (Marmigere *et al.*, 2003). The alteration of both GABA_A receptors and the two heavy metals in substantia nigra is of high interest, as it is a component of the basal ganglia, known to be involved principally in motor control. Furthermore, substantia nigra receives GABA projections from globus pallidus (Erlj *et al.*, 2012). Any alteration in this circuit impaired locomotor behavior and locomotor activity. Interestingly, the impairment of these functions occurs also following stressful situations (Tamburella *et al.*, 2012). Thus, the alterations observed in substantia nigra in this study, could explain these stress-induced motor dysfunctions and suggest that modulatory function of GABA_A receptor by heavy metals could be important for basal ganglia functions. The effect of stress seemed to be specific, as the other parts of basal ganglia did not show any difference in TBPS binding and Zn and Fe concentrations (data not shown).

Taken together, these results support the alteration of the modulatory function occurring at the GABA_A receptor level after a single session of immobilization stress. The concentration of the heavy metals investigated is too low to efficiently modulate the

GABA_A receptor function. This could explain the higher densities of GABA_A receptors observed after acute stress. Finally, these investigations pointed the potential role played by essential heavy metals in plasticity processes related to the stress response and in the regulation of the homeostasis.

5. CONCLUSION

Immobilization stress induces up regulation of GABA_A receptors which is concomitant to down regulation of endogenous zinc, a potent modulator of this receptor as well as endogenous concentrations of iron in brain structures sensitive to stress. Whether the alteration of the two heavy metals concentration could be considered as a consequence or the cause of GABA_A receptor dysfunction, other investigations are needed to elucidate these findings.

6. REFERENCES

- Atack, J.R., Y. Ohashi and R.M. McKernan, 2007. Characterization of [³⁵S]t-butylbicyclophosphorothionate ([³⁵S]TBPS) binding to GABA_A receptors in postmortem human brain. *Br. J. Pharmacol.*, 150: 1066-1074. DOI: 10.1038/sj.bjp.0707186
- Barbaccia, M. L., G. Roscetti, M. Trabucchi, M.C. Mostallino and A. Concas, 1996. Time-dependent changes in rat brain neuroactive steroid concentrations and GABA_A receptor function after acute stress. *Neuroendocrinology*, 63: 166-172. DOI: 10.1159/000126953
- Bitran, D., R.J. Hilvers and C.K. Kellog, 1991. Anxiolytic effects of 3 α -hydroxy-5 α [β]-pregnan-20-one: endogenous metabolites of progesterone that are active at the GABA_A receptor. *Brain Res.*, 561: 157-161. DOI: 10.1016/0006-8993(91)90761-J
- Charrier, C., F. Chigr, C. Tardivel, S. Mahaut and A. Jean *et al.*, 2006. BDNF regulation in the rat dorsal vagal complex during stress-induced anorexia. *Brain Res.*, 1107: 52-57. DOI: 10.1016/j.brainres.2006.05.099
- Chen, L. and W.H. Yung, 2006. Zinc modulates GABAergic neurotransmission in rat globus pallidus. *Neurosci. Lett.*, 409: 163-167. DOI: 10.1016/j.neulet.2006.09.033
- Chigr, F., S. Ba M'hamed and M. Najimi, 2001a. Allosteric modulation of GABA_A receptor by somatostatin is altered under stress in rat brainstem. *Folia Biologica.*, 47: 196-199. PMID: 11768776

- Chigr, F., S. Ba M'Hamed and M. Najimi, 2002. Modulation of [³⁵S]-tert-butylbicyclophosphorothionate binding by somatostatin in rat hypothalamus. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 29: 291-298. DOI: 10.1046/j.1440-1681.2002.03645.x
- Chigr, F., S. BaM'Hamed and M. Najimi, 2001b. Allosteric modulation of the gabaa receptor in rat hypothalamus by somatostatin is altered by stress. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 28: 329-330. DOI: 10.1046/j.1440-1681.2001.03447.x
- Cieslic, K., M. Sowa-Kucma, G. Ossowska, B. Legutko and M. Wolak *et al.*, 2011. Chronic unpredictable stress-induced reduction in the hippocampal brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene expression is antagonized by zinc treatment. *Pharmacol. Rep.*, 63: 537-543. PMID: 21602609
- Concas, A., E. Sanna, T. Cuccheddu and M. Paola, 1993. Carbon dioxide inhalation, stress and anxiogenic drugs reduce the function of GABA_A receptor complex in the rat brain. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 17: 651-661. DOI: 10.1016/0278-5846(93)90012-H
- Concas, A., M.C. Mostallino, P. Porcu, P. Follesa and M.L. Barbaccia *et al.*, 1998. Role of brain allopregnanolone in the plasticity of γ -aminobutyric acid type A receptor in rat brain during pregnancy and after delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95: 13284-13289. DOI: 10.1073/pnas.95.22.13284
- Cope, E.C., D.R. Morris, A.G. Scrimgeour, J.W. VanLandingham and C.W. Levenson, 2011. Zinc supplementation provides behavioral resiliency in a rat model of traumatic brain injury. *Physiol. Behav.*, 104: 942-947. DOI: 10.1016/j.physbeh.2011.06.007
- Draguhn, A., T.A. Verdorn, M. Ewert, P.H. Seeburg and B. Sakmann, 1990. Functional and molecular distinction between recombinant rat GABA_A receptor subtypes by Zn²⁺. *Neuron*, 5: 781-788. DOI: 10.1016/0896-6273(90)90337-F
- Drugan, R.C., S.M. Paul and J.N. Crawley, 1993. Decreased forebrain [³⁵S]TBPS binding and increased [³H]muscimol binding in rats that do not develop stress-induced behavioral depression. *Brain Res.*, 631: 270-276. DOI: 10.1016/0006-8993(93)91545-4
- Erlj, D., J. Acosta-Garcia, M. Rojas-Marquez, B. Gonzalez-Hernandez and E. Escartin-Perez, 2012. Dopamine D4 receptor stimulation in GABAergic projections of the globus pallidus to the reticular thalamic nucleus and the substantia nigra reticulata of the rat decreases locomotor activity. *Neuropharmacol.*, 62: 1111-1118. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2011.11.001
- Farrant, M. and Z. Nusser, 2005. Variations on an inhibitory theme: Phasic and tonic activation of GABA_A receptors. *Nat. Rev. Neurosci.*, 6: 215-29. DOI: 10.1038/nrn1625
- Foddi, M.C., M. Cinquanta and T. Mennini, 1997. Effect of psychological stress on [³⁵S]TBPS binding in rat brain. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 58: 373-377. DOI: 10.1016/S0091-3057(97)00253-0
- Frederickson, C.J. and A.I. Bush, 2001. Synaptically released zinc: physiological functions and pathological effects. *Biometals*, 14: 353-366. DOI: 10.1023/A:1012934207456
- Frederickson, C.J., 1989. Neurobiology of zinc and zinc-containing neurons. *Int. Rev. Neurobiol.*, 31: 145-238. DOI: 10.1016/S0074-7742(08)60279-2
- Fritschy, J.M., and H. Mohler, 1995. GABA_A-receptor heterogeneity in the adult rat brain: differential regional and cellular distribution of seven major subunits. *J. Comp. Neurol.*, 359: 154-194. DOI: 10.1002/cne.903590111
- Gunn, B.G., A.R. Brown, J.J. Lambert and D. Belelli, 2011. Neurosteroids and GABA_A receptor interactions: A focus on stress. *Front Neurosci.*, 5: 131-131. DOI: 10.3389/fnins.2011.00131
- Hosie, A.M., E.L. Dunne, R.J. Harvey and T. Smart, 2003. Zinc-mediated inhibition of GABA_A receptors: discrete binding sites underlie subtype specificity. *Nat. Neurosci.*, 6: 362-369. DOI: 10.1038/nn1030
- Huang, K., H. Li, H. Shen and M. Li, 2012. Psychological stress expands low molecular weight iron pool in cerebral cortex, hippocampus, and striatum of rats. *Biol. Trace. Elem. Res.*, 146: 79-85. PMID: 21993966
- Krishek, B.J., S.J. Moss and T.G. Smart, 1998. Interaction of H⁺ and Zn²⁺ on recombinant and native rat neuronal GABA_A receptors. *J. Physiol.*, 507: 639-652. DOI: 10.1111/j.1469-7793.1998.639bs.x
- Kvetnansky, R. and L. Mikulaj, 1970. Adrenal and urinary catecholamines in rats during adaptation to repeated immobilization stress. *Endocrinology*, 87: 738-743. PMID: 5453288
- Li, Y., Y. Zheng, J. Qian, X. Chen and Z. Shen *et al.*, 2012. Preventive effects of zinc against psychological stress-induced iron dyshomeostasis, erythropoiesis inhibition, and oxidative stress status in rats. *Biol. Trace. Elem. Res.*, 147: 285-291. PMID: 22274754
- Losada, M.E.O. 1989. Acute stress and GABAergic function in the rat brain. *Br. J. Pharmacol.*, 96: 507-512.

- Ma, L., W. Wang, M. Zhao and M. Li, 2008. Foot-shock stress-induced regional iron accumulation and altered iron homeostatic mechanisms in rat brain. *Biol. Trace. Elem. Res.*, 126: 204-213. PMID: 18709494
- Marmigere, F., F. Rage and L. Tapia-Arancibia, 2003. GABA–glutamate interaction in the control of BDNF expression in hypothalamic neurons. *Neurochem Int.*, 42: 353-358. DOI: 10.1016/S0197-0186(02)00100-6
- Miller, J.A., 1991. The calibration of ³⁵S or ³²P with ¹⁴C-labeled brain paste or ¹⁴C-plastic standards for quantitative autoradiography using LKB Ultrofilm or Amersham Hyperfilm. *Neurosci. Lett.*, 121: 211-214. DOI: 10.1016/0304-3940(91)90687-O
- Mody, I., 2012. Plasticity of GABA_A Receptors Relevant to Neurosteroid Action. In: Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies. Noebels, J.L. M. Avol, M.A. Rogawski, R.W. Olsen and A.V. Delgado-Escuta, (Eds.). Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US), pp: 1-9.
- Moss, T. and E.H. Morgan, 2004. The metabolism of neuronal iron and its pathogenic role in neurological disease: Review. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1012: 14-26. DOI: 10.1196/annals.1306.002
- Nowak, G., B. Legutko, B. Szewczyk, M. Papp and M. Sanak *et al.*, 2004. Zinc treatment induces cortical brain-derived neurotrophic factor gene expression. *Eur. J. Pharmacol.*, 492: 57-59. DOI: 10.1016/j.ejphar.2004.03.038
- Rahman, M., 2007. Effects of Neuroactive Steroids on the Recombinant GABAA Receptor in *Xenopus* Oocyte. 1st Edn., Umea University, Umea, ISBN-10: 9789172642737, pp: 72.
- Ruiz, A., M.C. Walker, R. Fabian-Fine and D.M. Kullmann, 2004. Endogenous zinc inhibits GABA_A receptors in a hippocampal pathway. *J. Neurophysiol.*, 91: 1091-1096. DOI: 10.1152/jn.00755.2003
- Saxena, N.C., and R.L. Macdonald, 1996. Properties of putative cerebellar gamma-aminobutyric acid A receptor isoforms. *Mol. Pharmacol.*, 49: 567-579. PMID: 8643098
- Serra, M., M.G. Pisu, M. Littera, G. Papi and E. Sanna, 2000. Social isolation-induced decreases in both the abundance of neuroactive steroids and GABAA receptor function in rat brain. *J. Neurochem.*, 75: 732-740. DOI: 10.1046/j.1471-4159.2000.0750732.x
- Smart, T.G., A.M. Hosie and P.S. Miller, 2004. Zn²⁺ ions: modulators of excitatory and inhibitory synaptic activity. *Neuroscientist*, 10: 432-42. DOI: 10.1177/1073858404263463
- Smart, T.G., S.J. Moss, X. Xie and R.L. Haganir, 1991. GABA_A receptors are differentially sensitive to zinc: dependence on subunit composition. *Br. J. Pharmacol.*, 103: 1837-1839. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1991.tb12337.x
- Smith, S. S., H. Shen, Q.H. Gong and X. Zhou, 2007. Neurosteroid regulation of GABAA receptors: Focus on the $\alpha 4$ and δ subunits. *Pharmacol. Ther.*, 116: 58-76. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2007.03.008
- Tamburella, A., G.M. Leggio, V. Micale, A. Navarria and C. Bucolo, 2012. Behavioural and neurochemical changes induced by stress-related conditions are counteracted by the neurokinin-2 receptor antagonist saredutant. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, 14: 1-11. PMID: 22695046
- Wang, L., W. Wang, M. Zhao M and L. Ma, 2008. Psychological stress induces dysregulation of iron metabolism in rat brain. *Neuroscience*, 155: 24-30. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2008.03.091
- White, G. and D. Gurley, 1995. Benzodiazepine site inverse agonists can selectively inhibit subtypes of the GABAA receptor. *Neuroreport*, 6: 1313-1316. PMID: 7669993

XII. Annexes 3: GABAB receptors modulate Ca^{2+} but not G protein-gated inwardly rectifying K^+ channels in cerebrospinal-fluid contacting neurones of mouse brainstem

GABA_B receptors modulate Ca²⁺ but not G protein-gated inwardly rectifying K⁺ channels in cerebrospinal-fluid contacting neurones of mouse brainstem

Nina Jurčić^{1,*} , Ghizlane Er-Raoui^{1,3,*} , Coraline Airault² , Jérôme Trouslard¹,
Nicolas Wanaverbecq^{1,†}  and Riad Seddik^{1,†} 

¹Aix Marseille Univ, CNRS, INT, Inst Neurosci Timone, Marseille, France

²Aix Marseille Univ, CNRS, LNC, Marseille, France

³Université Sultan Moulay Slimane, Laboratoire de Génie Biologique, Béni Mellal, Morocco

Edited by: David Wyllie & Tadashi Isa

Key points

- Medullo-spinal CSF contacting neurones (CSF-cNs) located around the central canal are conserved in all vertebrates and suggested to be a novel sensory system intrinsic to the CNS.
- CSF-cNs receive GABAergic inhibitory synaptic inputs involving ionotropic GABA_A receptors, but the contribution of metabotropic GABA_B receptors (GABA_B-Rs) has not yet been studied.
- Here, we indicate that CSF-cNs express functional GABA_B-Rs that inhibit postsynaptic calcium channels but fail to activate inhibitory potassium channel of the Kir3-type.
- We further show that GABA_B-Rs localise presynaptically on GABAergic and glutamatergic synaptic inputs contacting CSF-cNs, where they inhibit the release of GABA and glutamate.
- Our data are the first to address the function of GABA_B-Rs in CSF-cNs and show that on the presynaptic side they exert a classical synaptic modulation whereas at the post-synaptic level they have an atypical action by modulating calcium signalling without inducing potassium-dependent inhibition.

Abstract Medullo-spinal neurones that contact the cerebrospinal fluid (CSF-cNs) are a population of evolutionary conserved cells located around the central canal. CSF-cN activity has been shown to be regulated by inhibitory synaptic inputs involving ionotropic GABA_A receptors, but the contribution of the G-protein coupled GABA_B receptors has not yet been studied. Here, we used a combination of immunofluorescence, electrophysiology and calcium imaging to investigate the expression and function of GABA_B-Rs in CSF-cNs of the mouse brainstem. We found that CSF-cNs express GABA_B-Rs, but their selective activation failed to induce G protein-coupled inwardly rectifying potassium (GIRK) currents. Instead, CSF-cNs express primarily N-type voltage-gated calcium (Ca_v2.2) channels, and GABA_B-Rs recruit Gβγ

Nina Jurčić received her Master's degree in Biotechnology in Medicine at the University of Rijeka (Croatia). Currently, she is a PhD student at the Institute of Neuroscience (INT) at "La Timone", Aix-Marseille University, where she works under the supervision of Professor Jérôme Trouslard and Dr Nicolas Wanaverbecq. Her study aims at describing the physiological and functional properties of mammalian CSF-cNs using electrophysiological approaches together with calcium imaging. **Ghizlane Er-Raoui** is a graduate student from Sultan Mouly Sliman University (SMSU, Morocco), where she completed her Master's degree in Bioengineering. She has prepared her thesis on GABA_B receptor regulation in murine CSF-cNs under the supervision of Professor Mohamed Najimi (SMSU) and Professor Jérôme Trouslard (AMU).



*N. Jurčić and G. Er-Raoui contributed equally to this work.

†R. Seddik and N. Wanaverbecq contributed equally to this work as Principal Investigators (PIs).

subunits to inhibit Ca_V channel activity induced by membrane voltage steps or under physiological conditions by action potentials. Moreover, using electrical stimulation, we indicate that GABAergic inhibitory (IPSCs) and excitatory glutamatergic (EPSCs) synaptic currents can be evoked in CSF-cNs showing that mammalian CSF-cNs are also under excitatory control by glutamatergic synaptic inputs. We further demonstrate that baclofen reversibly reduced the amplitudes of both IPSCs and EPSCs evoked in CSF-cNs through a presynaptic mechanism of regulation. In summary, these results are the first to demonstrate the existence of functional postsynaptic GABA_B-Rs in medullar CSF-cNs, as well as presynaptic GABA_B auto- and heteroreceptors regulating the release of GABA and glutamate. Remarkably, postsynaptic GABA_B-Rs associate with Ca_V but not GIRK channels, indicating that GABA_B-Rs function as a calcium signalling modulator without GIRK-dependent inhibition in CSF-cNs.

(Received 28 September 2018; accepted after revision 8 November 2018; first published online 12 November 2018)

Corresponding authors R. Seddik: Aix-Marseille Université, CNRS, INT, Institut de Neurosciences de la Timone, Marseille, France. Email: riad.seddik@univ-amu.fr;

N. Wanaverbecq: Aix-Marseille Université, CNRS, INT, Inst Neurosci Timone, Marseille, France. Email: nicolas.wanaverbecq@univ-amu.fr

Introduction

GABA_B receptors (GABA_B-Rs) belong to family 3 (or family C) G-protein coupled receptors and mediate the slow inhibitory response to GABA by activating $G_{i/o}$ protein-dependent signalling pathways (Padgett & Slesinger, 2010; Pinard *et al.* 2010). The core structure of GABA_B-Rs consists of two principal subunits, GABA_{B1} and GABA_{B2} that assemble into heteromeric functional receptors at pre- and postsynaptic sites of the synapse (Möhler & Fritschy, 1999; Bettler *et al.* 2004; Pin & Bettler, 2016). Presynaptic GABA_B-Rs are positioned at axon terminals of both excitatory (heteroreceptors) and inhibitory (autoreceptors) neurones, where their activation suppresses neurotransmitter release through inhibition of voltage-dependent calcium channels (Ca_V), although other mechanisms have been implicated (Scanziani *et al.* 1992; Chen & van den Pol, 1998; Barral *et al.* 2000; Sakaba & Neher, 2003). Postsynaptic GABA_B-Rs are expressed in somatodendritic compartments of neurones and evoke a slow inhibitory postsynaptic current by gating G protein-coupled inwardly rectifying potassium (GIRK) channels, which hyperpolarises the membrane and inhibits neuronal excitability (De Koninck & Mody, 1997; Lüscher *et al.* 1997). Postsynaptic GABA_B-Rs additionally down-regulate Ca_V channels, thus controlling calcium-dependent neuronal processes such as dendritic Ca^{2+} -spike propagation and synaptic plasticity (Pérez-Garci *et al.* 2006; Booker *et al.* 2018). Finally, GABA_B-Rs can influence pre- and postsynaptic functions by inhibiting adenylyl cyclase, though the physiological consequences of this modulation are poorly understood (Padgett & Slesinger, 2010). In addition to their diverse signalling pathways, GABA_B-Rs are widely expressed throughout the central nervous system

including the hindbrain and the spinal cord, thereby playing pivotal roles in numerous physiological processes (Margeta-Mitrovic *et al.* 1999; Bettler *et al.* 2004).

Medullo-spinal neurones that contact the cerebrospinal fluid (CSF-cNs) constitute a peculiar neuronal population located around the central canal (CC) of all vertebrates (Vigh *et al.* 2004; Djenoune *et al.* 2014). They feature a bipolar morphology with a short dendritic process projecting toward the CC and ending in its lumen with a terminal protrusion or 'bud', suggesting a role in sensing CSF flow or composition (Stoeckel *et al.* 2003; Marichal *et al.* 2009; Orts-Del'Immagine *et al.* 2012, 2014). Consistent with this hypothesis, CSF-cNs express selectively the polycystic kidney disease 2-like 1 (PKD2L1) channel, a sensory transduction protein sensitive to extracellular variation of pH and osmolarity and sensing CSF flow and spinal cord torsion (Huang *et al.* 2006; Orts-Del'Immagine *et al.* 2012, 2016; Böhm *et al.* 2016; Jalalvand *et al.* 2016). PKD2L1 channels are non-selective cationic channels that produce enough depolarisation to trigger action potentials and therefore they contribute to setting the excitability of CSF-cNs (Orts-Del'Immagine *et al.* 2012, 2016). Moreover, CSF-cNs are embedded in a neuronal network, receiving primarily inhibitory synaptic inputs from yet-unidentified presynaptic partners (Orts-Del'Immagine *et al.* 2012). Inhibition of CSF-cNs was shown to be mediated by the amino acids GABA and glycine, which activate ionotropic GABA_A and glycine receptors, respectively (Marichal *et al.* 2009; Orts-Del'Immagine *et al.* 2012). In addition, previous immunohistochemical studies revealed the presence of GABA_B-Rs in neurones of rat spinal cord surrounding the central canal and with morphological properties of CSF-cNs (Margeta-Mitrovic *et al.* 1999). However, their function, as well as their signalling effectors in CSF-cNs, remain unknown.

In the present study, we assessed the expression and functional properties of GABA_B-Rs in CSF-cNs of the mouse brainstem. Double immunohistofluorescence staining with the selective marker PKD2L1 for CSF-cNs show that the GABA_{B1} subunit localises in the soma and the dendrite of medullar CSF-cNs. Using patch-clamp recordings and calcium imaging we demonstrate that post-synaptic GABA_B-Rs in CSF-cNs function by inhibiting Ca_v channels through recruitment of Gβγ but surprisingly they do not activate GIRK channels in these neurones. CSF-cNs in the mouse brainstem were initially thought to be under the sole control of inhibitory synaptic inputs, but here, using an electrical stimulation protocol, we demonstrate that CSF-cNs also receive glutamatergic excitatory inputs involving AMPA/kainate receptors. Finally, we show that GABA_B-Rs, presumably localised on both GABAergic and glutamatergic terminals, have an inhibitory action on GABA and glutamate release onto CSF-cNs.

Methods

Animal ethics

All experiments were conducted in conformity with the rules set by the EC Council Directive (2010/63/UE) and the French 'Direction Départementale de la Protection des Populations des Bouches-du-Rhône (DDPP13)' (Licence No. 13.435 held by J.T. and No. 13.430 by N.W.). Experiments were performed using 98 C57BL/6J mice (*Mus musculus*) of both sexes aged 8–18 weeks old (25–30 g, obtained from Envigo, Gannat, France). All animals were housed at constant temperature (21°C), in an enriched environment, under a standard 12 h light–12 h dark cycle, with food (pellet AO4, UAR, Villemoisson-sur-Orge, France) and water provided *ad libitum*. Every precaution was taken to reduce to the minimum the number of animals used and to minimise animal stress during housing and prior to experiments. We understand the ethical principles under which *The Journal of Physiology* operates, and our work complies with the journal's animal ethics checklist.

Histological procedures and confocal imaging

Adult mice were anaesthetised intraperitoneally with a combination of 100 mg kg⁻¹ ketamine (Carros, France) and 15 mg kg⁻¹ xylazine (Puteau, France). Animals were then transcardially perfused first with 0.1 M PBS and then by 4% paraformaldehyde in PBS (PFA; Sigma-Aldrich). Tissues were immediately removed, post-fixed for 30 min to 1 h in PFA at room temperature followed by overnight washing in PBS at 4°C. Tissues were finally cryoprotected for 24–48 h in 30% sucrose in PBS at 4°C and frozen in isopentane (–40°C). Coronal

brainstem thin sections (40 μm) were obtained using a cryostat (Leica CM3050, Wetzlar, Germany) and collected serially in twelve-well plates containing 0.1 M PBS. Sections were then incubated for 1 h in PBS containing 0.3% Triton X100 (Sigma-Aldrich) and 2% donkey serum with 1% bovine serum albumin (BSA), followed by an overnight incubation at 4°C with rabbit anti-PKD2L1 IgG (1:700; AB9086, Millipore-Chemicon, Fontenay-sous-Bois, France) and then a 24 h incubation at room temperature with mouse anti-GABA_{B1} IgG (1:100, AB55051, Abcam Biomedicals, Paris, France). Sections were then washed in PBS and incubated for 2 h with secondary antibodies conjugated to either AlexaFluor 488 (PKD2L1: 1:400; Millipore-Chemicon) or 594 (GABA_{B1}: 1:1000; Millipore-Chemicon). Sections were mounted on gelatine-coated slides and coverslipped with home-made mowiol mounting medium for fluorescence microscope examination. Confocal images were captured with a Zeiss LSM 700 laser scanning microscope before processing with ZEN 2009 light Edition (Zeiss, Jena, Germany) and ImageJ 1.8.0 software (NIH).

Acute brainstem slice preparation

Coronal brainstem slices (from the caudal part up to the 4th ventricle) were prepared as previously described by (Orts-Del'Immagine *et al.* 2012). Briefly, 8- to 12-week-old mice were anaesthetised with the ketamine-xylazine solution, decapitated, and the brain rapidly removed and submerged in ice-cold (0–4°C), oxygenated (95% O₂–5% CO₂) and low calcium-high magnesium cutting solution containing (in mM): NaCl 75, NaHCO₃ 33, NaH₂PO₄ 1.25, KCl 3, CaCl₂ 0.5, MgCl₂ 7, glucose 15, sucrose 58, ascorbic acid 2, sodium pyruvate 2, *myo*-inositol 3 (pH 7.3–7.4; osmolality 300–310 mosmol kg⁻¹). Coronal brainstem slices (250 μm thick) were cut with a vibratome (Leica VT1000S) and incubated for 15–20 min at 35°C in a submerged chamber filled with oxygenated artificial CSF (aCSF) containing (in mM): NaCl 115, NaHCO₃ 23, NaH₂PO₄ 1.25, KCl 3, CaCl₂ 2, MgCl₂ 2, glucose 15, ascorbic acid 2, sodium pyruvate 2, *myo*-inositol 3 (pH 7.3–7.4; osmolality 300–310 mosmol kg⁻¹). Slices were then maintained in oxygenated aCSF at room temperature prior to recording. After a recovery period of at least 1 h, slices were transferred to the recording chamber superfused with aCSF at 1.5–2.5 ml min⁻¹.

Electrophysiology

Neurones around the central canal were visualised under infrared illumination using oblique or DIC optics mounted on a Scientifica SliceScope Pro 1000 or Zeiss AxioScope S1 microscope, respectively. Whole-cell patch-clamp recordings were performed at room temperature (~20°C) in current- and/or voltage-clamp

mode using a Multiclamp 700B or Axopatch 200A patch-clamp amplifier (Molecular Devices, San Jose, CA, USA). Patch pipettes (4–6 M Ω) were pulled from borosilicate glass capillaries (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) using a P-97 Flaming/Brown type micropipette puller (Sutter Instrument Co, Novato, CA, USA). In all experiments, 10 μ M Alexa Fluor 594 (Invitrogen) was included in the patch pipettes for identifying the typical morphology of neurones in contact with the cerebrospinal fluid (CSF-cNs) during the whole-cell recording (Orts-Del'Immagine *et al.* 2012, 2016). Series resistance (10–20 M Ω) was monitored throughout each experiment and unstable recordings were discontinued. For voltage-gated calcium currents recordings, series resistance was compensated by 70–80%. Data were filtered at 2–2.4 kHz and digitised at 10 kHz using a Digidata 1322A or 1440A interface (Molecular Device) driven by pClamp 9.2 or 10.7, respectively (Molecular Device). The liquid junction potential was left uncorrected.

Recording of voltage-gated calcium currents. For the characterisation of postsynaptic voltage-gated calcium (Ca²⁺) channels (Ca_v) and the study of their modulation by GABA_B-Rs, electrodes were filled with a solution containing (in mM): CsCl 3, caesium acetate 100, NaCl 5, MgCl₂ 1, CaCl₂ 1, TEA-Cl 20, EGTA 10, HEPES 10, disodium phosphocreatine 10, Mg-ATP 4, Na₃GTP 0.2 (adjusted to pH 7.36 with CsOH; osmolality of 290–295 mosmol kg⁻¹). Calcium currents were elicited by 100–200 ms voltage steps (V_{Step} , 10 mV increments) from a holding potential of –70 mV while the neurone was perfused with oxygenated aCSF supplemented with 10 μ M gabazine (GABA_A receptor antagonist), 1 μ M strychnine (glycine receptor antagonist), 0.5 μ M tetrodotoxin (TTX, inhibitor of sodium channels) and 20 mM tetraethylammonium chloride (TEA-Cl, blocker of potassium channels). The current-voltage relationship was constructed for each cell by plotting the Ca²⁺ peak current recorded for a given V_{Step} and the properties and voltage-dependence of Ca²⁺ current were analysed with a Boltzmann fit using the following equation: $I(V) = g_{\text{max}} (V - V_{\text{rev}}) / [1 + \exp((V_{50} - V)/k)]$; where I represents the current amplitude as a function of voltage (V), g_{max} is the maximum whole-cell channel conductance, V_{rev} is the current reversal potential, V_{50} is the voltage for half-maximal channel activation and k (the slope) is equal to $RT/z_g F$ where z_g is the valency of the voltage sensor of the calcium channel.

Calcium current inhibition by postsynaptic GABA_B-Rs was assessed on Ca²⁺ peak current (elicited with a 100 ms V_{Step} to +10 mV every 30 s over a 10 min period) by application of baclofen (100 μ M, 30 s), a selective agonist for GABA_B-Rs, using a pressure application pipette (~1 μ m tip diameter) positioned at

~50 μ m from the recorded cells and connected to a pressure application system (Toohey Company, Hollis, NH, USA). The molecular mechanism by which GABA_B-R activation modulates Ca²⁺ currents was studied with a triple-pulse voltage protocol (recorded every 30 s for 10 min) consisting of two 50 ms test pulses to +10 mV from a holding potential of –70 mV, separated by a 50 ms conditioning pulse to +100 mV. The inhibition of calcium currents induced by application of baclofen was then compared before (prepulse) and after (postpulse) the large depolarising conditioning pulse (Herlitze *et al.* 1996; Ikeda, 1996).

Recording of inwardly rectifying (GIRK/Kir3) potassium currents. To record postsynaptic GABA_B-mediated Kir3-type K⁺ currents (GIRK), patch pipettes were filled with a solution containing (in mM): potassium gluconate 140, NaCl 4, HEPES 5, MgCl₂ 2, EGTA 1.1, Na₂ATP 2, disodium phosphocreatine 5, Na₃GTP 0.6 (adjusted to pH 7.35 with KOH; osmolality 285 mosmol kg⁻¹). Kir3-type K⁺ currents were evoked by pressure application of baclofen (100 μ M, 40 s) at –50 mV in the presence of 10 μ M gabazine, 1 μ M strychnine and 20 μ M DNQX (AMPA/kainate receptor antagonist).

Recording of synaptic currents. Electrically evoked inhibitory (IPSCs) and excitatory (EPSCs) postsynaptic currents were recorded with patch electrodes filled with (in mM): CsCl 130, NaCl 4, MgCl₂ 2, EGTA 1.1, HEPES 1.1, disodium phosphocreatine 5, Na₂ATP 2, Na₃GTP 0.6, lidocaine *N*-ethyl chloride 5 (adjusted to pH 7.35 with CsOH; osmolality 285 mosmol kg⁻¹). IPSCs and EPSCs were elicited at 0.1 Hz by voltage pulses with a stimulus isolator (100 μ s, 50–60 V stimuli; ISO-Flex, A.M.P.I., Jerusalem, Israel) through a stimulating electrode filled with aCSF and positioned at 50–100 μ m from the soma of the recorded cell. GABA_A receptor-mediated IPSCs were recorded at –60 mV and were isolated by including 1 μ M strychnine and 20 μ M DNQX to the external solution. To record glutamatergic receptor-mediated EPSCs, the external solution was supplemented with 1 μ M strychnine and 10 μ M gabazine. EPSCs were recorded at holding potential of –60 mV. GABA_B-R-mediated inhibition of IPSCs and EPSCs was assessed by bath application of baclofen (20 or 100 μ M, see Results). For paired-pulse ratio analysis, stimuli were delivered in pairs with 70 ms interpulse intervals and a frequency of 0.1 Hz.

Calcium imaging

Calcium imaging experiments were performed in CSF-cNs patched with electrodes containing (in mM): KCl 3, potassium gluconate 120, NaCl 5, MgCl₂ 1, CaCl₂ 0.25, EGTA 2, HEPES 10, disodium phosphocreatine 10, Mg-ATP 4, Na₃GTP 0.2 (adjusted to pH 7.33 with KOH;

osmolality 290–295 mosmol kg⁻¹). Cells were loaded with the fluorescent Ca²⁺ probe Fluo-4 (50 μM, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) through the patch pipette and the preparation was illuminated (490 nm, excitation bandpass filter: 490 ± 30 nm; Chroma, Bellows Falls, VT, USA) using the CoolLED epifluorescence system (p1 PreciExcite, Andover, UK). The emitted light (520 nm, emission bandpass filter: 535 ± 30 nm and a dichroic mirror set at 515 nm; Chroma) was collected with a HQ2 CoolSnap CCD camera (Standard mode at 10 MHz and Gain 1, Photometrics) connected to a PC through a frame grabber (CoolSNAP LVDS interface card, Photometrics, Tucson, AZ, USA) and controlled by MetaView software (Molecular Devices). To optimise imaging conditions and reduce fluorescence quenching, a square region of interest (ROI) was drawn around the recorded neurones, the illumination intensity was set at 25% of the maximum power. Images were acquired in time laps mode with 2 × 2 binning for 100 ms every 0.2 s over a 1 min period (151 images). CSF-cNs were recorded in current-clamp mode from the resting membrane potential (RMP) and after a period of baseline recording, 5 consecutive trains of action potentials (APs) (0.5 Hz) were triggered with a 500 ms DC current pulse (+20 pA) to induce Ca²⁺ influx following membrane depolarisation and monitor the elicited elevation in intracellular Ca²⁺. To test whether the Ca²⁺ elevations were effectively mediated through Ca_v activation, recordings were also carried out in voltage-clamp mode with an intracellular solution containing (mM): CsCl 3, caesium acetate 100, NaCl 5, MgCl₂ 1, CaCl₂ 1 TEA-Cl, 20, EGTA 2, HEPES 10, disodium phosphocreatine 10, Mg-ATP 4, Na₃GTP 0.2, with 50 μM Fluo-4 (adjusted to pH 7.36 with CsOH; osmolality 290–295 mosmol kg⁻¹). CSF-cNs were depolarised to +10 mV for 100 ms from a holding potential set at -70 mV and the increase in fluorescence simultaneously recorded.

Reagents

All reagents were purchased from Sigma-Aldrich except: Tetrodotoxin (TTX) from Latoxan (Portes-lés-Valence, France). 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione disodium salt (DNQX) from Abcam Biochemicals. (R)-baclofen and gabazine (SR 95531) from Tocris Bioscience (Bristol, UK). ω-conotoxin GVIA, ω-agatoxin IVA and nifedipine from Alomone labs (Jerusalem, Israel). CGP54626A (CGP) was a gift from Bernhard Bettler (University of Basel, Switzerland) and was initially produced by Novartis Pharma AG (Basel, Switzerland).

Data analysis and statistics

Data analysis. Current and potential responses were analysed using the Clampfit 10 suite (Molecular Devices Inc.) and Excel 2016 (Microsoft). In our analysis, the peak

and the mean amplitudes were considered for current and voltage responses, respectively (see below). The RMP was determined in current-clamp mode at $I = 0$ just after the whole-cell configuration was achieved as well as by averaging in the current-clamp recordings a ~1 s period in the absence of action potentials (APs) and of current injection ($I_{\text{injection}} = 0$ pA). AP properties were analysed either from recordings of the spontaneous discharge activity (10–30 s periods) or from trains of APs elicited by the injection of a +20 pA DC current pulse for 500 ms using the ‘threshold detection’ routine from Clampfit 10 with a threshold set at 0 mV. In each condition, the principal parameters of APs (amplitude, overshoot, 10–90% rise time and level of after hyperpolarisation) were determined, as well as AP frequency.

Over the period used to record Ca²⁺ current (~10 min) we consistently observed a decrease in the Ca²⁺ current amplitude, known as rundown (see Discussion). Therefore, to account for this phenomenon when comparing Ca²⁺ current amplitude over time, we fitted the baseline data points (control) before drug application (Ca²⁺ channel blockers, toxins or baclofen) recorded for each cell with a linear regression function ($y = ax + b$; where y and x are the recorded peak current and time, respectively, and a and b are constants). The current amplitude in the presence of the drug was measured from the raw data and compared to the value in control calculated at the same time points from the linear regression; this procedure avoided an overestimation for the degree of inhibition.

To measure changes in fluorescence, i.e. intracellular calcium concentrations ($[Ca^{2+}]_i$), regions of interest (ROI) were drawn over the CSF-cN soma (ROI Cell, Fig. 5A) and the background (ROI Bkg, Fig. 5A) on the recorded images. The average fluorescence intensity was measured over time from these two ROIs and subsequently, the background fluorescence intensity was subtracted from the somatic data to compute the net fluorescence (F). The average fluorescence intensity before stimulus application (Ca_v activation or train of APs), the so-called basal intensity or F_0 , was then calculated over 30–40 images. Finally, the net rise from baseline in cell fluorescence was calculated as the $(F - F_0)/F_0$ or $\Delta F/F_0$ ratio and expressed as a percentage. The average fluorescence intensity was then plotted over time to illustrate Ca²⁺ transients and the peak amplitude of the fluorescence rise measured and compared between the control and the test situations. Fluorescence signal when using imaging with epifluorescence and diffusion of Fluo-4 into the cell through the patch pipette exhibits a progressive decrease in intensity over time, a phenomenon known as fluorescence bleaching or quenching. We therefore computed the amount of quenching over time by fitting the baseline data with a linear regression function ($y = ax + b$; where y and x are the $\Delta F/F_0$ value and

time, respectively, and a and b are constants) and subtracted these data from the raw data points in a point to point manner. To compare the amplitude of the rise in fluorescence, in control *vs.* baclofen, the maximum amplitude recorded after the 5th train of APs was normalised against that of the 1st train for each recording.

The inhibitory effect of GABA_B-R activation on IPSCs and EPSCs was determined by comparing current amplitudes of 30 averaged traces including failures before and during application of baclofen or CGP. The paired-pulse ratio (PPR) was calculated as the ratio of the second postsynaptic current (PSC) over the first PSC. The decay times of EPSCs and IPSCs were obtained by fitting the decay phase of the current with a single exponential equation using Clampfit 10. Rise times (10–90%) of synaptic currents were calculated using the statistics tool of Clampfit 10. In all figures showing EPSCs and IPSCs, stimulus artifacts were blanked for clarity.

Statistical analysis. Data were expressed as means \pm SD in text and represented as box-whisker plot using Tukey's method with Prism 6 (GraphPad) software or RStudio 1.1.456 (R Studio Team, 2018), as previously described (Orts-Del'Immagine *et al.* 2017). Briefly, for each data set, the median and the 25th to the 75th percentiles (lower and upper limits of each bar, respectively) are calculated. Next, the interquartile distance (IQR) is determined as the difference between the 25th and 75th percentiles and the whiskers limits or 'inner fences' calculated as the 75th percentile plus 1.5 times IQR and the 25th percentile minus 1.5 times IQR. All data with values either higher or lower than the inner fences are represented as individual data points and considered as outliers. In all the figures where data are presented with box-and-whiskers plots, the thick horizontal line represents the median. For all electrophysiological data and histological experiments, n refers to the number of recorded cells and to the number of mice examined, respectively. All data were tested for normal distribution using the Shapiro-Wilk test with Prism 6 software or R statistics. Data with normal distributions were analysed with a one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison *post hoc* test for the statistical comparison of multiple groups or with a Student's two-tailed paired t test for the comparison of two groups (Prism 6, GraphPad, La Jolla, CA, USA). Data without normal distributions were analysed with a Friedman or Kruskal-Wallis test followed by a *post hoc* Dunn's multiple comparisons test when comparing multiple groups; Mann-Whitney or Wilcoxon matched-pairs signed rank test when comparing two groups (Prism 6, GraphPad or R statistics).

For the statistical analysis of Ca²⁺ current blockade (use of blockers or toxins) and modulation by baclofen, as well as the reduction in the level of intracellular calcium elevation following activation of GABA_B-Rs,

we had to consider dependent (data within a group) and independent (data between groups) variables. For a given cell, the measured parameter or variable (current amplitude or Ca²⁺ elevation) and its inhibition/modulation by a drug is considered as a variable dependent on the condition (baseline or drug) within a given group while the same variable represents an independent factor when considered between different groups (control and drug of different types). Therefore, the statistical analyses require the use of a mixed effect model considering in a hierarchical way both dependent and independent variables. The drug effects within a group and between different groups on the analysed variable represent fixed factors (Condition and Group). Finally, because the choice of the cell recorded for this study was done randomly among all those available, it was necessary to implement a statistical model with a factor corresponding to this random effect. The statistical analyses were carried out using the 'linear mixed effect' (lme version 3.1-128) routine (Pinheiro *et al.* 2016). The lme model was subsequently tested using an ANOVA (ANOVA.lme) followed by a *post hoc* Dunn's multiple comparisons test. Wherever an interaction between the variables and the conditions was statistically significant we reported the P value. In the statistical analysis, the differences were considered significant when $P < 0.05$. Figures were prepared and finalised using CorelDraw 2018 (Corel Corporation, Ottawa, ON, Canada).

Results

CSF-cNs express the B₁ subunit of the GABA_B receptor

A previous publication has shown a strong labelling for GABA_{B1} subunits in cells of rat spinal cord with morphological hallmarks of CSF-cNs, that is a small round cell body with a single process extending toward the CC (Margeta-Mitrovic *et al.* 1999). To confirm that GABA_{B1} is expressed in CSF-cNs, we performed in the hind-brain dorsal vagal complex double immunofluorescence labelling against GABA_{B1} and PKD2L1 channel, a specific marker for medullospinal CSF-cNs of mouse (Orts-Del'Immagine *et al.* 2012, 2014). As described previously (McDermott *et al.* 2001; Liu & Wong-Riley, 2005), cell bodies with a marked immunostaining for GABA_{B1} subunits were observed in the dorsal motor nucleus of the vagus nerve (DMNX) and the hypoglossal nucleus (XII, Fig. 1A; $n = 3$). In addition, an observation at higher magnification revealed the presence of immunoreactivity against GABA_{B1} subunits (arrows) in the soma of small round cells present around the CC and presenting a projection towards the CC (open arrowhead, Fig. 1B; $n = 3$). These cells around the CC were positively immunolabelled by antibodies against the PKD2L1 channel, a selective marker of medullo-spinal CSF-cNs (Fig. 1C; $n = 3$). Therefore, our results indicate that medullar

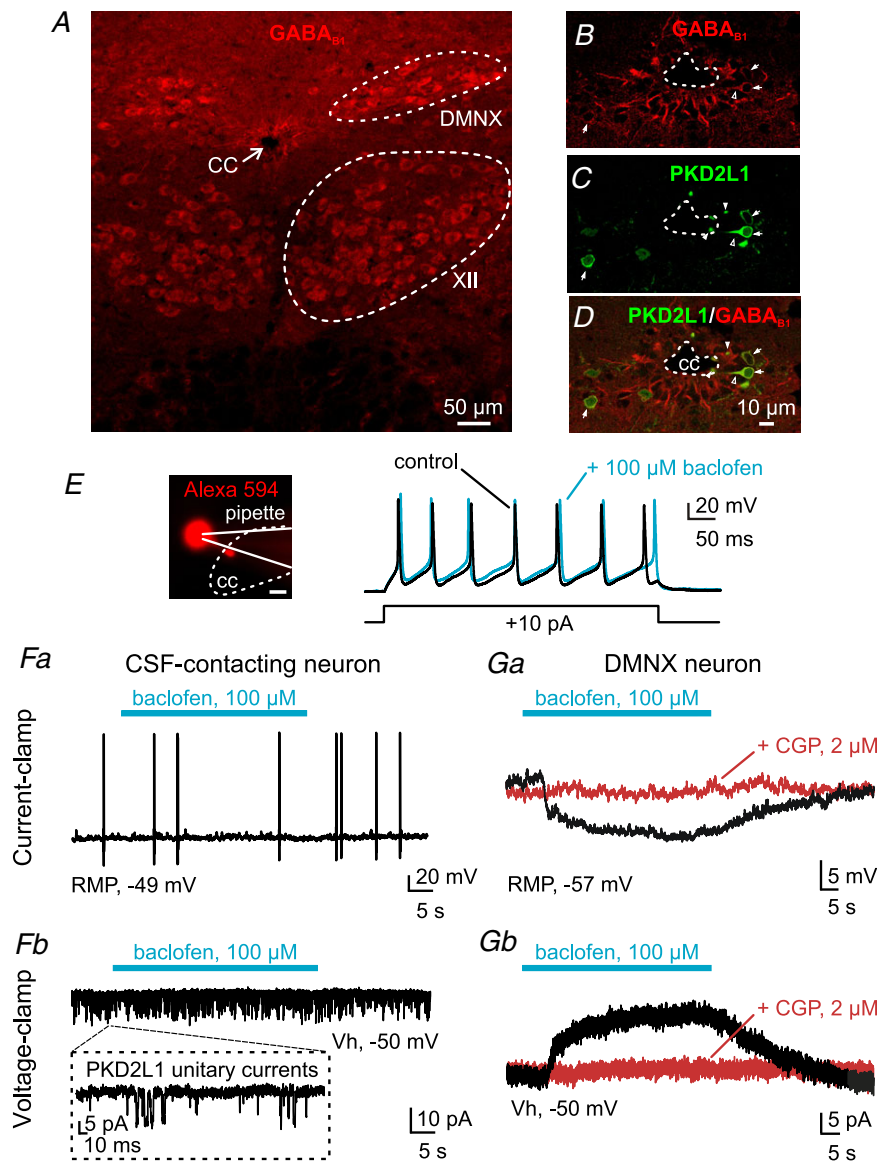


Figure 1. GABA_B receptors are expressed in CSF-cNs but their activation does not mediate Kir3-type potassium currents

A, image of the mouse brainstem showing immunoreactivity for GABA_{B1} subunit in the dorsal motor nucleus of the vagus (DMNX), the hypoglossal nucleus (XII) and around the central canal (CC). B–D, colocalisation of GABA_{B1} subunit (red, panel B) with PKD2L1 channel (green, panel C; merged image in panel D) in neurones in contact with the cerebrospinal fluid (CSF-cNs). GABA_{B1} staining was visualised in soma (arrows) and dendrites (open arrowheads) of CSF-cNs, but at low levels in their terminal dendritic protrusion or bud (closed arrowheads). E, left: micrograph showing the typical morphology of CSF-cNs after whole-cell dialysis with Alexa 594 (10 μM). CSF-cNs have a round cell body and extend a dendrite ending with a bud in proximity to the CC. Scale bar, 10 μm. E, right: action potentials evoked by a 500 ms depolarising current pulse (+10 pA) in identified CSF-cNs had the same properties in controls (black trace) and in the presence of 100 μM baclofen (blue trace). F, in CSF-cNs, pressure application of 100 μM baclofen for 40 s did not induce either a hyperpolarisation under current-clamp recording (a), or an increase in the holding current under voltage-clamp mode (b). Note the single-channel activity (inset in Fb) mediated by the PKD2L1 channel, as previously described in CSF-cNs. G, in DMNX neurones, application of baclofen (100 μM, 40 s) evoked a hyperpolarisation under current-clamp recording (a), or an outward current when the cell was recorded in voltage-clamp mode (b). Current and voltage responses were abolished by bath application of the selective GABA_B receptor antagonist CGP (2 μM; red traces).

Table 1. Electrophysiological properties of CSF-cNs before and after the activation of GABA_B receptors with baclofen

	Control	Baclofen	P value
Resting potential (mV)	-57.08 ± 7.39 (n = 12)	-53.08 ± 6.70 (n = 11)	0.1079
Threshold potential (mV)	-37.41 ± 4.37 (n = 8)	-35.54 ± 4.92 (n = 7)	0.4290
AP amplitude (mV)	102.30 ± 7.74 (n = 8)	98.73 ± 8.58 (n = 7)	0.2183
AP frequency (Hz)	17.68 ± 5.89 (n = 8)	19.67 ± 5.80 (n = 7)	0.7345
AP half-width (ms)	3.78 ± 0.67 (n = 8)	3.83 ± 0.66 (n = 7)	0.8245

In the presence of 100 μM baclofen, the resting membrane and threshold potential as well as action potentials (APs) parameters are not significantly different from control (two-tailed paired Student's t-test for all comparisons). APs were evoked by +10 pA current pulses of 500 ms duration.

CSF-cNs express GABA_{B1} subunits (Fig. 1D; n = 3). GABA_{B1} coexpressed with PKD2L1 in the somatodendritic compartment of CSF-cNs (arrows and open arrowheads; Fig. 1C and D; n = 3) but a clear labelling for GABA_{B1} was difficult to observe in the bud (closed arrowheads; Fig. 1C and D), suggesting a low expression of the protein in the dendritic terminal protrusion. Altogether, these data suggest that medullar CSF-cNs possess GABA_B-Rs.

GABA_B receptors do not mediate Kir3-type potassium currents in CSF-cNs

We next investigated the functional properties of GABA_B-Rs in CSF-cNs. In different neuronal models, including the hindbrain, activation of GABA_B-Rs was shown to elicit Kir3-type potassium currents (GIRK). We therefore assessed whether a similar response is generated in medullar CSF-cNs. Using whole-cell patch-clamp recordings in current-clamp conditions, we showed that local application of baclofen (100 μM, for 30–40 s), a selective agonist for GABA_B-Rs, changed neither the properties of APs evoked by a depolarising current pulse (Fig. 1E and Table 1) nor the CSF-cN intrinsic properties (Table 1). Further, at a holding potential of -50 mV, in all CSF-cNs tested, baclofen activation of GABA_B receptors failed to elicit either a hyperpolarisation of the resting membrane potential (RMP, current-clamp recording, Fig. 1Fa; n = 10) or an increase in the holding current (voltage-clamp recording, Fig. 1Fb; n = 22). Since DMNX neurones also express GABA_B-Rs (Fig. 1A) and were shown to have GABA_B-mediated potassium currents (Browning & Travagli, 2001), we tested, as an internal control in the same slice preparation, whether GABA_B-R-mediated response can be recorded. In all DMNX neurones, pressure application of baclofen (100 μM, 40 s) induced a hyperpolarisation of the membrane potential by 9.45 ± 4.12 mV in current-clamp mode (Fig. 1Ga; n = 6) or an outward potassium current under voltage-clamp mode with an average amplitude of 23.67 ± 25.21 pA (Fig. 1Gb; n = 6). Both responses were fully blocked in the presence of CGP54626A (CGP), a GABA_B-R selective antagonist (Fig. 1Ga and Gb; n = 3).

These data show that GABA_B-Rs activate Kir3-type potassium channels in DMNX neurones but not in CSF-cNs.

Characterisation of voltage-gated calcium channels in CSF-cNs

In juvenile rats, CSF-cNs were suggested to express calcium voltage-dependent channels (Ca_v) (Marichal *et al.* 2009) but so far, no functional data are available in adult mice and the type of Ca_v expressed is unknown. To address this point in our model, we carried out voltage-clamp recordings in conditions enabling selective isolation of the Ca²⁺ current (see Methods, Recording of voltage-gated calcium currents) and applied voltage steps (V_{step} from -60 to +30 mV, 10 mV increments) for 100 ms from a holding potential of -70 mV to evoke inward currents of increasing amplitude (Fig. 2A). The evoked currents exhibit fast activation at the start of the voltage steps followed by a sustained current showing little inactivation and ending with a fast tail current. As illustrated from the average current–voltage relationship (I–V curve, Fig. 2B) and the fit of the experimental data using a Boltzmann function (red line in Fig. 2B), the current activates for membrane potentials more depolarised than -40 mV, reaches a peak amplitude of -129.72 ± 54.91 pA at a membrane potential of +11.60 ± 0.43 mV (Fig. 2B; n = 13). These properties of the recorded current are in agreement with those reported for high voltage activated Ca²⁺ currents (Catterall, 2011) and this assumption is confirmed by the full block of the current observed in the presence of 200 μM cadmium (Cd²⁺), a selective blocker of Ca_v (peak current amplitudes: -177.00 ± 38.36 pA in control and +7.25 ± 21.32 pA in Cd²⁺; Fig. 2C, n = 12; P < 0.01, Wilcoxon matched-pairs signed ranked test). Next, we characterised the nature of Ca_v expressed by CSF-cNs and underlying the observed current using selective toxins or inhibitors for the principal Ca_v subtypes. In the presence of 500 nM ω-conotoxin GVIA (ω-CnTx GVIA), a selective blocker for Ca_v2.2 (or N-type Ca²⁺ channels), the amplitude of the recorded current was strongly reduced (peak current amplitudes: -141.71 ± 19.59 pA in control and -52.57 ± 28.14 pA in ω-CnTx

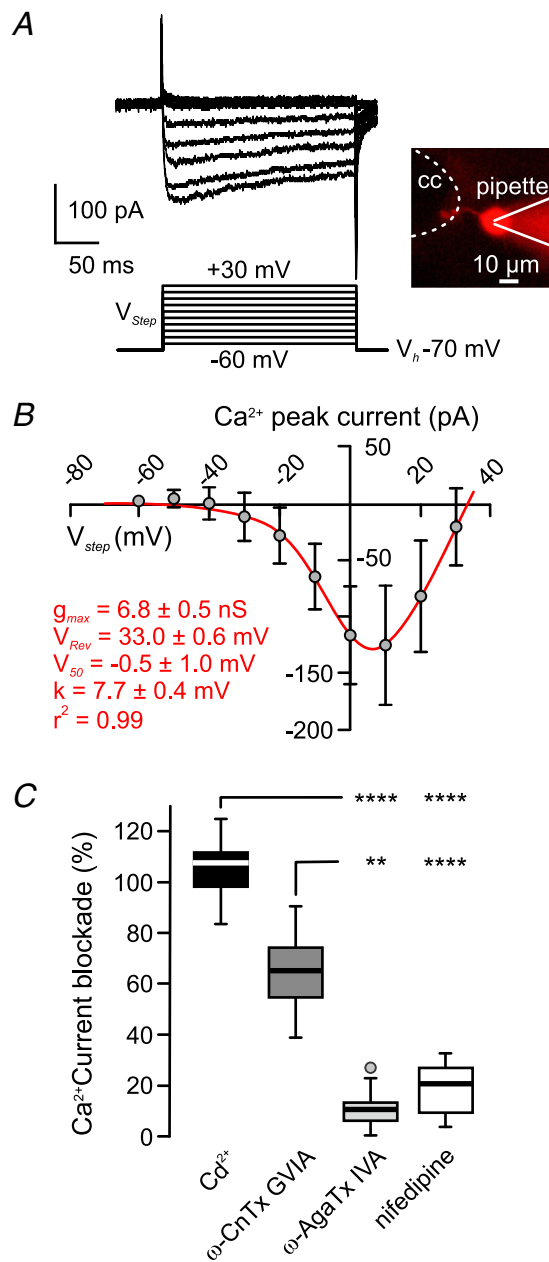


Figure 2. CSF-cNs express N-type voltage-gated Ca²⁺ channels

A, representative whole-cell current traces recorded in response to voltage steps from -60 mV to $+30$ mV (V_{step} , $+10$ mV increments, protocol illustrated under the current traces) from a holding potential of -70 mV (V_h) to elicit Ca²⁺ current in a CSF-cN. The inset represents the recorded CSF-cN after cell dialysis with Alexa 594 (10μ M) to confirm the morphology. CC: central canal. **B**, average current-voltage relationship for the Ca²⁺ currents recorded in CSF-cNs ($n = 13$). Data are fitted using a Boltzmann function (red trace, see Methods for more details). The inset in red gives the values defining the properties of the Ca²⁺ current in CSF-cNs obtained from the Boltzmann fit of the average data (see text for details). **C**, summary box-and-whiskers plots of the averaged percentage of Ca²⁺ current blockade in the presence of cadmium (Cd²⁺; $105 \pm 3\%$; black box, $n = 12$), ω -conotoxin GVIA (ω -CnTx GVIA; $64 \pm 6\%$; grey box, $n = 7$), ω -agatoxin IVA (ω -AgaTx IVA; $11 \pm 2\%$, light grey box, $n = 11$), and nifedipine ($14 \pm 3\%$; white box, $n = 9$). Ca²⁺

GVIA⁺; Fig. 2C, $n = 12$; $P < 0.05$, Wilcoxon matched-pairs signed ranked test). In contrast, in the presence of 500 nM ω -agatoxin IVA (ω -AgaTx VIA), a blocker of Ca_v2.1 (P/Q type), or 1μ M nifedipine, a blocker of Ca_v1.2 and 1.3 (neuronal L type), there was only a small decrease in the Ca²⁺ current amplitude (peak current amplitudes: -162.64 ± 75.60 pA in control and -144 ± 60.84 pA in ω -AgaTx VIA, $n = 11$; -123.17 ± 49.39 pA in control and -97.33 ± 29.37 pA in nifedipine, $n = 6$; $P < 0.01$ and $P < 0.05$, respectively, Wilcoxon matched-pairs signed ranked test). Taken together, our results demonstrate that medullar CSF-cNs express functional voltage-dependent Ca²⁺ channels that are primarily of the Ca_v2.2 type (N type).

GABA_B receptors are functional in CSF-cNs and modulate voltage-gated calcium channels

Classically GABA_B-R activation has been shown to inhibit Ca_v both at pre- and postsynaptic levels and therefore to modulate cellular activity and synaptic transmission (see below), respectively. To assess whether GABA_B-Rs activation modulates Ca_v in CSF-cNs, we elicited peak Ca²⁺ currents (holding potential of -70 mV, voltage step to $+10$ mV) and tested the effect of baclofen on the current amplitude. Figure 3A and B illustrates representative traces showing the effect of baclofen on Ca²⁺ current recorded in two CSF-cNs in the absence and presence of CGP. In all tested CSF-cNs, baclofen application (100μ M, for 30 s) induced a rapid and long-lasting inhibition of Ca²⁺ currents (Fig. 3C and D; $n = 13$) that slowly reversed upon baclofen wash out. In the presence of CGP, the baclofen-mediated Ca²⁺ current inhibition was strongly reduced (Fig. 3A–D; $n = 14$).

G protein coupled receptors (GPCR) of the $G\alpha_{i/o}$ type primarily inhibit Ca²⁺ current through the direct binding of the $G\beta\gamma$ subunits to the channel. This inhibition is voltage dependent and can be removed by a strong depolarisation (Herlitze *et al.* 1996; Ikeda, 1996). To test whether the observed effect on Ca²⁺ currents following GABA_B-R activation is mediated through a similar mechanism in CSF-cNs, we used the classical triple pulse protocol (see Methods, Recording of voltage-gated calcium currents). In controls, the Ca²⁺ current elicited by the prepulse and the postpulse had similar average amplitudes of -176.83 ± 99.62 pA and -149.43 ± 65.48 pA, respectively (Fig. 4Aa; $n = 9$, $P = 0.3719$ pre- vs. postpulse amplitude in control, ANOVA.lme/post hoc Dunn's multiple comparison test) and the pre/postpulse

current sensitivity to cadmium and ω -CnTx GVIA is significantly higher compared to that observed in the presence of ω -agatoxin IVA ($****P < 0.0001$, $**P < 0.01$; Kruskal-Wallis/Dunn's post hoc multiple comparison test).

ratio was around 95% (Fig. 4D; $n = 9$). As illustrated for a representative recording (Fig. 4Aa and Ba), baclofen application strongly reduced the peak amplitude of the Ca^{2+} current activated during the prepulse (average peak amplitude: -61.76 ± 44.41 pA, $n = 9$; ANOVA.lme/*post hoc* Dunn's test, $P < 0.0001$ compared to control; see above; (1) in Fig. 4Aa, Ba, C and D). Note that the level of inhibition was similar to that reported in Fig. 3 (inhibition: $51 \pm 24\%$; $n = 13$, in Fig. 3D for single pulse protocol; $52 \pm 24\%$; $n = 9$, in Fig. 4D for triple pulse protocol; Mann-Whitney test, $P = 0.8409$). However, following the depolarisation to $+100$ mV, the current inhibition mediated by baclofen was strongly reduced for the postpulse compared to the prepulse in the same conditions and the average peak amplitude was similar to that observed for the postpulse recordings in controls (control postpulse: -149.43 ± 65.48 pA; baclofen postpulse: -114.66 ± 63.99 pA, $P = 0.078$ and prepulse vs. postpulse in baclofen, $P < 0.01$, ANOVA.lme/*post*

hoc Dunn's multiple comparison test; $n = 9$; (2) in Fig. 4Aa, Ba and C; $n = 9$). Accordingly, the pre/postpulse ratio decreased by around 40% compared to the control situation (Fig. 4D; $n = 9$). In the presence of CGP, the inhibition of the Ca^{2+} current by baclofen was strongly reduced for the current elicited by the pre- and postpulse (average peak amplitude: -179.59 ± 72.86 pA and -166.84 ± 79.71 pA for the prepulse ($P = 0.9591$) and -154.22 ± 60.94 pA and -144.32 ± 59.82 pA for the postpulse ($P = 0.9901$) in CGP in the absence or presence of baclofen, respectively, $n = 10$; $P = 0.0703$ and 0.9801 for the pre- and postpulse in baclofen in the absence ($n = 9$) or presence ($n = 10$) of CGP; ANOVA.lme/*post hoc* Dunn's multiple comparison test; see (2) in Fig. 4Ab, Bb, and C). In the presence of CGP alone and with baclofen, the pre/postpulse ratio was similar to that observed in control and close to 100% (Fig. 4D; $n = 10$). Altogether, these results show that GABA_B -Rs are functional in CSF-cNs and inhibit Ca^{2+} current through a $\text{G}\beta\gamma$ -mediated effect.

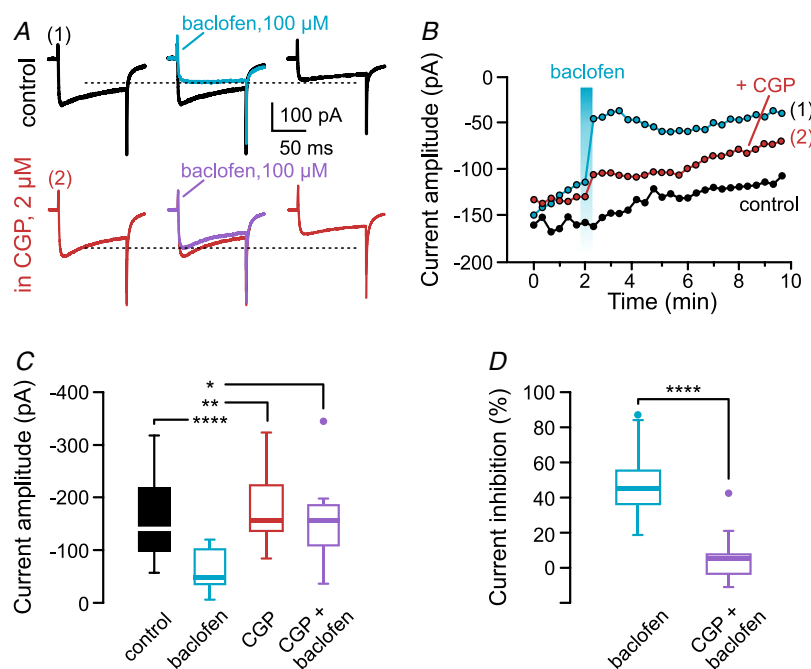


Figure 3. Activation of GABA_B receptors by baclofen inhibits Ca^{2+} current

A, representative peak Ca^{2+} currents traces elicited with a voltage step to $+10$ mV from a holding potential of -70 mV and recorded in two different CSF-cNs in control (top, 1, black traces) or in the presence of $2 \mu\text{M}$ CGP (bottom, 2, red traces) and in the presence of $100 \mu\text{M}$ baclofen (top 1, blue trace) alone or with CGP (bottom, 2, violet trace). B, time course of the Ca^{2+} current peak amplitude for one recording in control (black circles) and the recordings presented in A in the absence (1, blue circles) and presence (2, red circles) of $2 \mu\text{M}$ CGP. Baclofen was applied at $100 \mu\text{M}$ by pressure for 30 s, as indicated by the blue bar. C, summary box-and-whiskers plots for the average Ca^{2+} current peak amplitude before and during baclofen application and in the absence or presence of CGP (control, black box: -159.33 ± 87.18 pA, $n = 13$; baclofen, blue open box: -60.63 ± 39.44 pA, $n = 13$; CGP, red open box: -172.56 ± 66.74 , $n = 14$ and baclofen in CGP, violet open box: -154.65 ± 72.62 , $n = 14$; $****P < 0.0001$, $**P < 0.01$, $*P < 0.05$; ANOVA.lme/Dunn's *post hoc* multiple comparison test). D, summary box-and-whiskers plots for the Ca^{2+} current inhibition induced by baclofen in the absence (blue open box) and presence (violet open box) of CGP. Baclofen produced a significant inhibition of the Ca^{2+} current peak amplitude, while in the presence of CGP this inhibitory effect was abolished (baclofen: $49 \pm 6\%$, $n = 13$; baclofen in CGP: $7 \pm 4\%$, $n = 14$; $****P < 0.0001$, Mann-Whitney test).

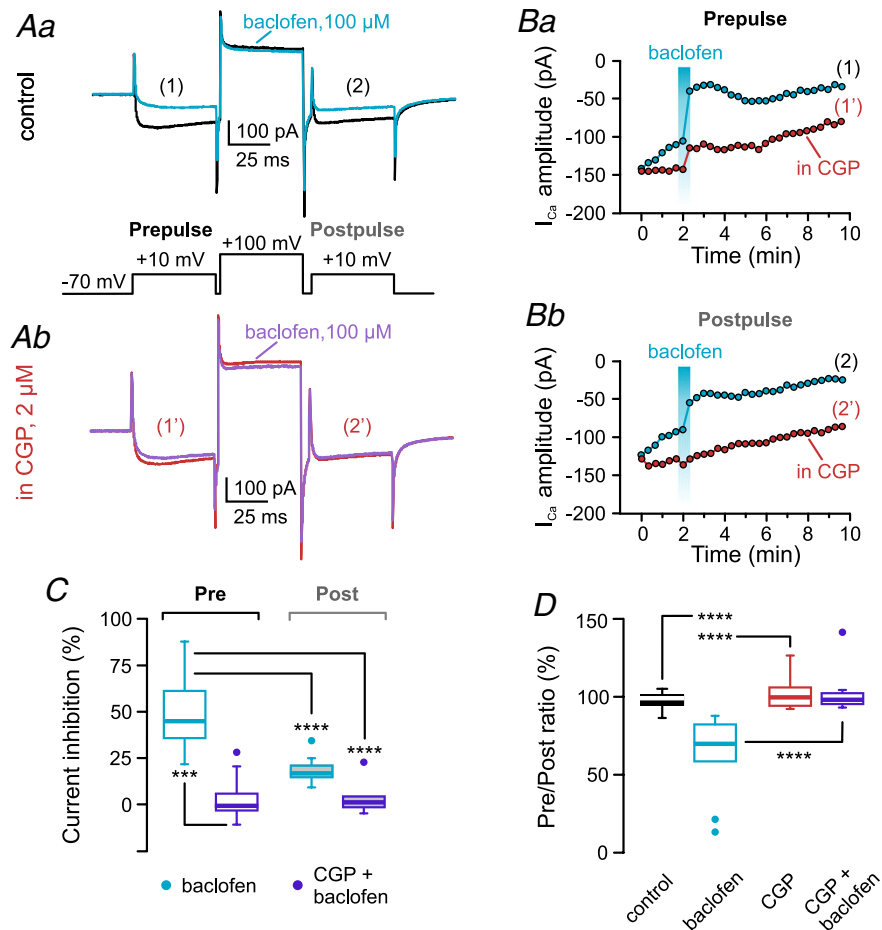


Figure 4. GABA_B receptors inhibit voltage-gated Ca²⁺ channels through a Gβγ-mediated mechanism

A, representative traces illustrating the peak Ca²⁺ current recorded in two CSF-cNs in control (a) or in the presence of 2 μM CGP (b) using a triple pulse protocol where 2 voltage steps to +10 mV (50 ms) from a holding potential of -70 mV are applied and separated by a depolarising step to +100 mV for 50 ms. The recording protocol is illustrated below the traces in panel a and the pulses before and after the depolarisation to +100 mV represent the prepulse (black font) and postpulse (grey font), respectively. Aa, current traces recorded in control (black trace) in the presence of baclofen (blue trace) and elicited by the prepulse (1) and the postpulse (2). Ab, recordings in the presence of 2 μM CGP before (red trace) and during baclofen application (violet trace) for the prepulse (1') and the postpulse (2'). B, time course of the Ca²⁺ current peak amplitude for the neurones illustrated in Aa and Ab and illustrating the baclofen effect on the amplitude of the Ca²⁺ current elicited by the prepulse (a) and the postpulse (b) in the absence (1 and 2, blue circles) and the presence of 2 μM CGP (1' and 2', red circles). Baclofen was pressure applied at 100 μM for 30 s as indicated by the blue bars. C, summary box-and-whiskers plots for the Ca²⁺ current inhibition induced by baclofen in the absence (blue box) and presence (violet box) of 2 μM CGP for the prepulse (open box) and the postpulse (grey box) as indicated above the graph. Baclofen produced a significant inhibition of the peak Ca²⁺ current amplitude elicited by the prepulse that was larger than that observed for the postpulse Ca²⁺ current (baclofen: 52 ± 24% for the prepulse and 19 ± 8% for the postpulse, *n* = 9). In the presence of CGP, the baclofen inhibitory effect was strongly and significantly reduced and there was no significant difference between the inhibition observed for the pre- and postpulse currents (baclofen in CGP: 4 ± 12% for the prepulse and 3 ± 7% for the postpulse, *n* = 10). D, summary box-and-whiskers plots for the prepulse/postpulse ratio recorded in control (black box), in baclofen (blue open box), in CGP (red open box) and in baclofen with CGP (violet open box). In the presence of baclofen alone, the prepulse/postpulse ratio was strongly reduced (control: 98 ± 6%, baclofen: 62 ± 27%, *n* = 9). In the presence of CGP, baclofen failed to reduce the prepulse/postpulse ratio (CGP: 102 ± 11%, baclofen in CGP: 103 ± 14%, *n* = 10; *P* = 0.9998). The prepulse/postpulse ratios calculated in the presence of CGP and baclofen with CGP were both significantly higher than that calculated for baclofen alone (see above; *****P* < 0.0001 for the ratio with baclofen alone compared to CGP alone and CGP with baclofen, respectively). Statistical test: ANOVA.lme/Dunn's *post hoc* multiple comparison test; *****P* < 0.001, *****P* < 0.0001.

GABA_B receptor activation reduces action potential evoked intracellular calcium rises

Following activation of Ca_V, the Ca²⁺ influx will induce an elevation in the intracellular Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_i). Using combined electrophysiology and Ca²⁺ imaging with Fluo-4, we tested the consequence of GABA_B-R activation on [Ca²⁺]_i increase induced by a short depolarisation. First, when Ca²⁺ currents are elicited in voltage-clamp mode (from -70 mV to +10 mV for 100 ms), the Fluo-4 fluorescence, i.e. [Ca²⁺]_i in CSF-cN

soma increased by 560 ± 313% (n = 5; data not shown) from baseline. This result confirms that activation of Ca_V elicits a large elevation in [Ca²⁺]_i. Next, to reproduce a more physiological condition, we elicited [Ca²⁺]_i elevation using 5 consecutive trains of APs by injecting in current-clamp mode +20 pA DC current from the CSF-cN RMP (Fig. 5A and B; see Methods, Calcium imaging). As expected, [Ca²⁺]_i increased by 14 ± 14% (ΔF/F₀; n = 12) from baseline on the first AP train and subsequent trains of APs induced a cumulative rise in [Ca²⁺]_i to reach on average an amplitude of 38 ± 43%

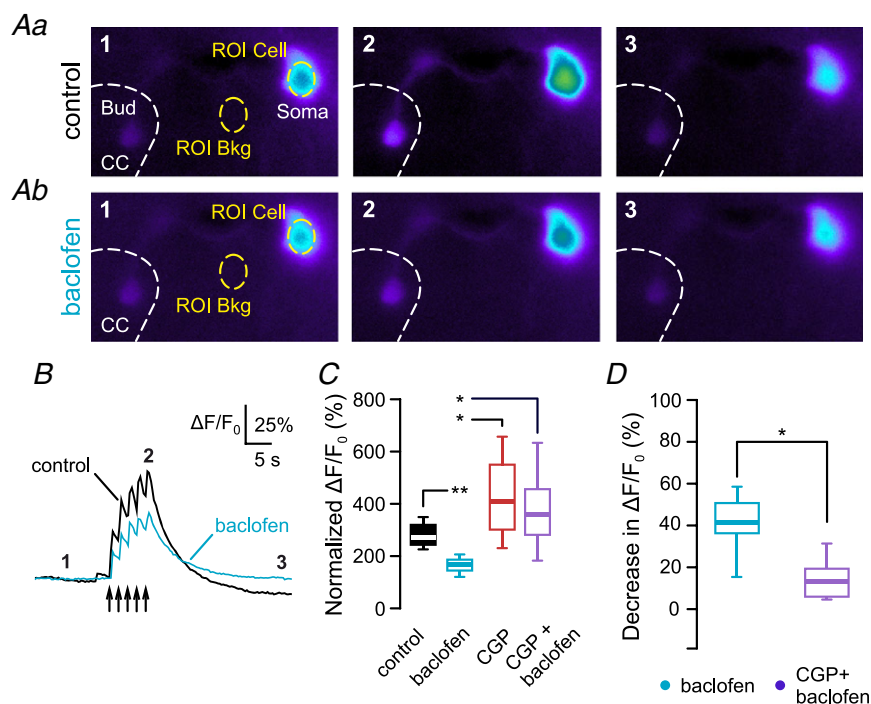


Figure 5. GABA_B receptor activation inhibits intracellular Ca²⁺ increase induced by Ca_V activation

A, representative average images illustrating in control (a) and in the presence of baclofen (b, 100 μM) the baseline fluorescence (1) acquired in one CSF-cN recorded in current-clamp mode at the resting membrane potential (RMP: -56 mV) and dialysed (whole-cell configuration) with 50 μM Fluo-4, a Ca²⁺-sensitive fluorescent probe, (2) the maximum fluorescence increase after 5 consecutive trains of action potentials (APs) and (3) the fluorescence at the end of the recovery period (see also control and baclofen in panel B, black and blue lines respectively). Images are presented in pseudocolour (black: low fluorescence; red: high fluorescence) and each average was obtained from 5 consecutive images (~1 s) in the different conditions. Dashed white line delineates the central canal (CC) and yellow dashed lines represent the regions of interest (ROI) drawn in the background (ROI Bkg) and on the CSF-cN soma (ROI Cell). These two ROIs were used to calculate the net average fluorescence intensity (ΔF/F₀; see Methods) and generate the fluorescence time course, i.e. the calcium transient. The 5 trains of APs were triggered with a DC current injection pulse of +20 pA for 500 ms delivered at 0.5 Hz. B, time course of the net fluorescence changes acquired in control (black trace) and in the presence of 100 μM baclofen applied during the AP train (blue trace) from the cell illustrated in A. The arrows under the traces represent the time point when each train of APs was triggered. Trace was corrected for fluorescence quenching. C, summary box-and-whiskers plots for the normalised fluorescence increase recorded after the 5th train of APs in control (black box), in baclofen (blue open box), in CGP (red open box) and in baclofen with CGP (violet open box). In the presence of baclofen alone, the net increase in fluorescence was significantly reduced while that effect was abolished when CGP was bath applied (control: 282 ± 51% and baclofen: 166 ± 35%, n = 6; CGP: 429 ± 170% and baclofen in CGP: 379 ± 158%, n = 7; **P < 0.01, *P < 0.05, ANOVA.lme/Dunn's *post hoc* multiple comparison test). D, summary box-and-whiskers plots for the decrease in the normalised fluorescence rise recorded after the 5th train of APs in the presence of baclofen alone (open blue box, n = 6) and in the presence of baclofen with CGP (open violet box, n = 7). In the presence of CGP, the decrease in the recorded fluorescence rise was significantly reduced (baclofen alone: 40 ± 15%, n = 6; baclofen in CGP: 9 ± 18%, n = 7; *P < 0.05, Mann-Whitney test).

from baseline on the 5th train (Fig. 5Aa and B; $n = 12$). This $[Ca^{2+}]_i$ elevation corresponded to $292 \pm 70\%$ when normalised to the increase recorded for the 1st AP train (Fig. 5C; $n = 12$). At the end of the 5th train of APs, the $[Ca^{2+}]_i$ slowly decreased in an exponential manner to return after several seconds to a value similar to the baseline value (3 in Fig. 5A and B). As illustrated in Fig. 5Ab and B for a representative recording, in the presence of baclofen, the amplitude of the $[Ca^{2+}]_i$ elevation, recorded on the 5th train of APs, was reduced by nearly half (Fig. 5C and D; $n = 6$). We reproduced the same protocol in the presence of CGP and, in 7 out of 9 cells recorded, baclofen application failed to reduce the $[Ca^{2+}]_i$ elevation (Fig. 5C and D; $n = 7$). Our results, therefore, indicate that CSF-cN depolarisation following a train of APs induces an elevation of $[Ca^{2+}]_i$ through activation of Ca_v2.2 and that GABA_B-R activation leads to a reduction in this rise.

Inhibitory synaptic transmission is modulated by GABA_B receptors in CSF-cNs

Activation of GABA_B-Rs inhibits synaptic transmission by acting on voltage-gated calcium channels at a variety of central synapses. Therefore, we studied in CSF-cNs the effect of baclofen on postsynaptic inhibitory (IPSCs) and excitatory synaptic currents (EPSCs) evoked by local electrical stimulation. Our previous work has demonstrated the presence of spontaneous inhibitory synaptic transmission (Orts-Del'Immagine *et al.* 2012) but electrically evoked IPSCs have never been recorded in CSF-cNs. Thus, we first characterised evoked IPSCs in medullar CSF-cNs. In the presence of DNQX (20 μ M) and strychnine (1 μ M) to block respectively glutamatergic and glycinergic receptors, electrical stimulation (50–60 V, 100 μ s) at a frequency of 0.1 Hz elicited postsynaptic inward currents in CSF-cNs voltage-clamped at -60 mV (Fig. 6Aa and b). Postsynaptic inward currents were reversibly reduced by bath application of gabazine, (GBZ, 10 μ M), a selective GABA_A receptor antagonist, with a percentage of inhibition of $98 \pm 6\%$ (Fig. 6Aa, Ab and B; $n = 10$). In addition, the reversal potential of postsynaptic inward currents determined by measuring the current amplitudes at different holding potentials from -60 to $+40$ mV (with 20 mV increments) was -9.75 ± 3.15 mV (Fig. 6C and D; $n = 6$), which is close to the calculated equilibrium potential for chloride ions ($+3.2$ mV). These results show that evoked IPSCs recorded in CSF-cNs were mediated by GABA_A receptors. We next checked whether baclofen has an inhibitory effect on evoked IPSCs. Bath application of the selective GABA_B receptor agonist baclofen (100 μ M) powerfully reduced the amplitudes of evoked IPSCs recorded in CSF-cNs at a holding potential of -60 mV, with a percentage inhibition of $82 \pm 12\%$ (Fig. 6Ea, Eb and F; $n = 6$). The inhibitory effect of baclofen was reversed by bath application of 2 μ M CGP

(Fig. 6Ea, Eb and F; $n = 6$). Therefore, our data show that GABA_B-R activation inhibits the GABA_A-dependent inhibitory synaptic transmission in CSF-cNs.

GABA_B receptors inhibit excitatory synaptic transmission in CSF-cNs

We previously reported that CSF-cNs express AMPA/kainate receptors but stimulation of neurotransmitter release with a hypertonic shock did not evoke EPSCs and therefore we suggested that CSF-cNs do not receive excitatory synaptic inputs (Orts-Del'Immagine *et al.* 2016). However, the mechanisms involved in the enhancement of the transmitter release by hypertonic shocks are not yet known and in neurones the enhancement is not dependent on calcium entry into presynaptic terminals (Rosenmund & Stevens, 1996; Mochida *et al.* 1998). In this study, we therefore tested whether EPSCs can be induced in CSF-cNs following presynaptic calcium influx induced by electrical stimulation. In the presence of gabazine and strychnine to block, respectively, GABA_A- and glycine receptor-dependent synaptic transmission, electrical stimulation (50–60 V, 100 μ s) at a frequency of 0.1 Hz and from a holding potential of -60 mV induced fast postsynaptic inward currents in CSF-cNs that were reversibly inhibited by bath application of DNQX (20 μ M), an AMPA/kainate receptor antagonist (Fig. 7Aa, Ab and B). The percentage of inhibition of EPSCs by DNQX was $95 \pm 6\%$ ($n = 7$). Moreover, the reversal potential determined by recording postsynaptic currents at a holding potential ranging from -60 to $+40$ mV (20 mV increments) was 0.60 ± 7.10 mV (Fig. 7C and D, $n = 5$), consistent with the multiple cationic permeability of AMPA/kainate receptors. These data show that electrical stimulation evoked EPSCs mediated by AMPA/kainate receptors in CSF-cNs. We further studied the effect of GABA_B-R activation on excitatory synaptic transmissions in CSF-cNs. At a holding potential of -60 mV, bath application of baclofen (100 μ M) had a marked inhibitory effect on the amplitudes of EPSCs recorded in CSF-cNs, with a percentage of inhibition of $63 \pm 16\%$ (Fig. 7Ea, Eb and F; $n = 7$). Bath application of the antagonist CGP reversed the inhibitory effect of baclofen on EPSCs (Fig. 7Ea, Eb and F; $n = 7$). These results show for the first time that CSF-cNs receive excitatory glutamatergic inputs and that activation of GABA_B receptors has an inhibitory effect on the excitatory synaptic transmission.

Presynaptic action for GABA_B receptor-mediated inhibition of inhibitory and excitatory synaptic transmission

We then examined whether the baclofen-mediated inhibition of EPSCs and IPSCs in CSF-cNs is caused by a pre- or postsynaptic mechanism. For this purpose, we first

evoked synaptic responses by paired-pulse stimulation and we compared the paired-pulse ratio (PPR: amplitude of the second postsynaptic current/amplitude of the first postsynaptic current) before and during application of baclofen and CGP. At a stimulus interval of 70 ms (50–60 V, 100 μ s for each pulse) and from a holding potential of -60 mV, bath application of baclofen (20 μ M) significantly increased the PPR of both IPSCs (Fig. 8A and

C) and EPSCs (Fig. 8B and D) by, respectively, $65 \pm 37\%$ ($n = 7$) and $92 \pm 70\%$ ($n = 7$), largely due to a reduction in the amplitude of the first response (see lower traces in Fig. 8A and B). Bath application of CGP (2 μ M) reversed the increase in PPR induced by baclofen of both IPSCs (Fig. 8A and C) and EPSCs (Fig. 8B and D). To confirm further the presynaptic locus of GABA_B receptor-mediated inhibition, we next checked whether there is a postsynaptic

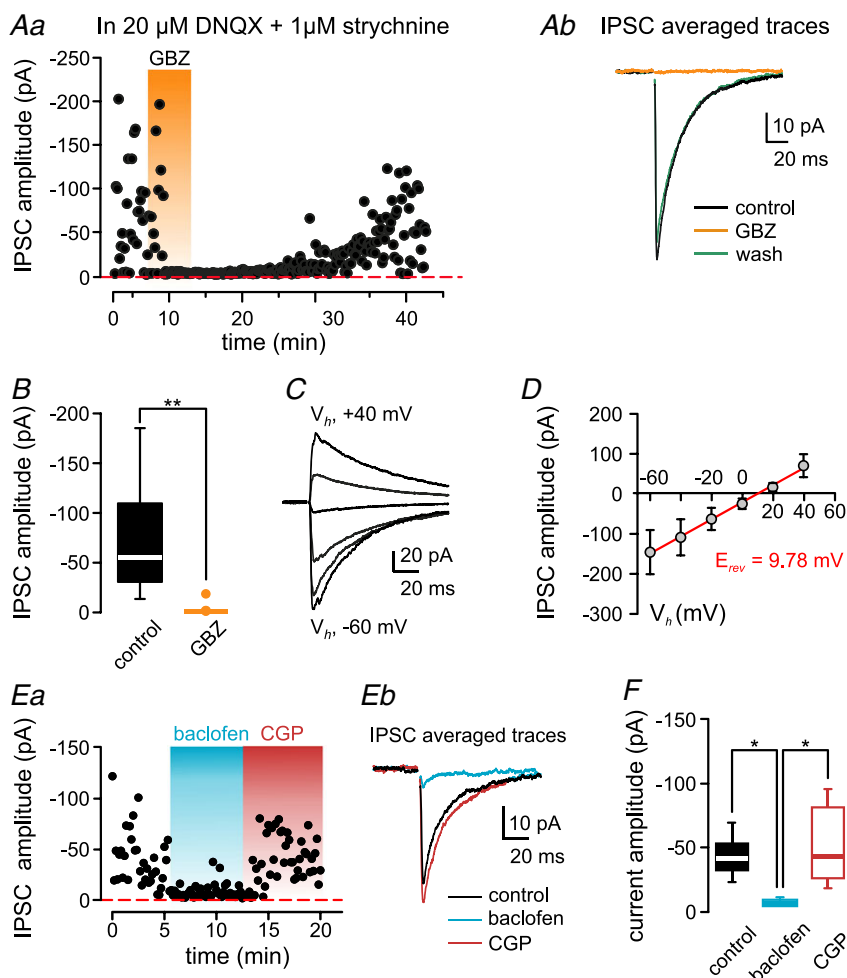


Figure 6. Baclofen inhibits evoked inhibitory synaptic transmission in CSF-cNs

A, IPSC peak amplitudes plotted versus time (a) and representative averaged traces (b) before (black trace), during (orange trace) and after (green trace) bath application of the selective GABA_A receptor antagonist gabazine (GBZ, 10 μ M). IPSCs were evoked every 10 s at a holding potential of -60 mV and in the presence of 20 μ M DNQX (an AMPA/kainite antagonist) and 1 μ M strychnine (a glycine receptor antagonist). B, box-and-whisker plots of IPSCs peak amplitudes in control and in the presence of gabazine. Gabazine had a significant inhibitory effect on IPSC amplitude (control: -71.39 ± 58.04 pA, $n = 10$; gabazine: -1.84 ± 5.60 pA, $n = 10$; $**P < 0.01$, Wilcoxon matched-pairs signed rank test). C, averaged IPSCs traces in response to voltage-step applications from -60 mV to $+40$ mV using 20 mV increments. D, IPSC mean peak amplitudes plotted against the holding potential. The indicated reversal potential was determined from the linear regression of the current-potential relationship ($R^2 = 0.99$). E, time course of peak IPSCs amplitudes (a) and representative averaged traces (b) before (black trace) after bath application of 100 μ M baclofen (selective agonist of GABA_B receptors, blue trace) and 2 μ M CGP (selective antagonist of GABA_B receptors, red trace). IPSCs were evoked at 0.1 Hz and at -60 mV. F, box-and-whisker plots of IPSCs amplitudes in control and in the presence of baclofen and CGP. Baclofen significantly reduced the amplitude of IPSCs and the inhibitory effect was reversed with CGP (control: -42.82 ± 15.82 pA, $n = 6$; baclofen: -6.38 ± 1.97 pA, $n = 6$; CGP: -50.78 ± 30.12 pA, $n = 6$; $*P < 0.05$, Friedman/Dunn *post hoc* multiple comparison test).

interaction between GABA_B receptors and GABA_A or AMPA/kainate receptors by analysing the kinetics of evoked IPSCs and EPSCs, respectively. We found that application of baclofen (20 μ M) did not affect either the decay time or the 10–90% rise time of IPSCs (Fig. 8E and G) and EPSCs (Fig. 8F and H). Therefore, these results suggest that inhibition of both inhibitory and excitatory synaptic transmission by baclofen is mediated by activation of presynaptic GABA_B receptors.

Discussion

Over the last few years, substantial advances have been made in identifying membrane proteins expressed in medullar CSF-cNs and involved in the control of their excitability. Excitation in CSF-cNs was shown to be mediated by pH sensitive PKD2L1 and ASICs channels whereas inhibition involves ionotropic GABA_A and glycine receptors (Orts-Del'Imagine *et al.* 2012, 2016). In

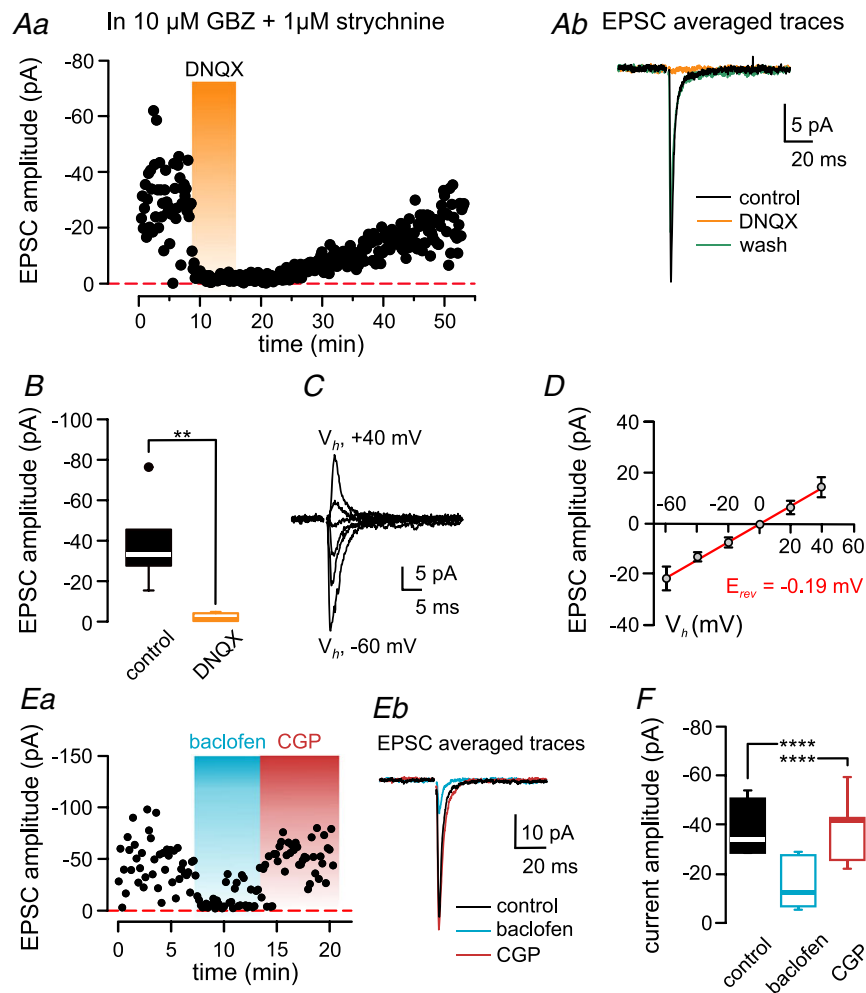


Figure 7. Evoked excitatory synaptic transmission is inhibited by baclofen in CSF-cNs

A, time course of peak EPSCs (a) and representative averaged traces (b) before (black trace), during (orange trace) and after (green trace) bath application of the selective antagonist of AMPA/kainate receptors DNQX (20 μ M). EPSCs were recorded every 10 s at a holding potential of -60 mV and in the presence of gabazine (10 μ M) and strychnine (1 μ M). B, box-and-whisker plots of EPSCs amplitudes summarising the inhibitory effect of DNQX (control: -38.43 ± 19.51 pA, $n = 7$; DNQX: -1.57 ± 1.91 pA, $n = 7$; $**P < 0.01$, Student's two-tailed paired t test). C, averaged EPSCs traces recorded at different holding potentials (from -60 to $+40$ mV). D, plot of the mean current amplitude of EPSC against the holding membrane potential. EPSCs had a linear relationship to holding membrane potential and linear regression analysis showed an extrapolated reversal potential close to 0 mV ($R^2 = 0.99$). E, EPSC peak amplitudes plotted versus time (a) and representative averaged traces (b) before (black trace) and after bath application of 100 μ M baclofen (blue trace) and 2 μ M CGP (red trace). EPSCs were evoked at 0.1 Hz and at -60 mV. F, summary box-and-whisker plots showing the effect of baclofen on EPSC amplitudes. Baclofen had a significant inhibitory effect on EPSC amplitudes that was reversed with CGP (control: -37.96 ± 10.64 pA, $n = 7$; baclofen: -14.86 ± 9.79 pA, $n = 7$; CGP: -37.59 ± 12.99 pA, $n = 7$; $****P < 0.0001$, repeated measures ANOVA/Tukey *post hoc* multiple comparison test).

the present study, we provide additional insights into the functional properties of CSF-cNs by analysing the contribution of metabotropic GABA_B-Rs in the control of CSF-cNs activity. We demonstrate that GABA_B-Rs are present in CSF-cNs, but they do not activate the canonical GIRK pathway. In contrast, CSF-cNs express primarily N-type voltage-gated Ca²⁺ channels (Ca_v2.2). Activation of GABA_B receptors recruits Gβγ subunits to inhibit Ca_v2.2 activity and reduces the increase in intracellular Ca²⁺. Our study further shows, for the first time in rodents, that CSF-cNs have AMPA/kainate receptors that are engaged in a synaptic transmission, which demonstrates that CSF-cNs receive an additional

excitatory control through glutamatergic inputs. Finally, we found that GABA_B receptors are located presynaptically on both GABAergic and glutamatergic terminals and their activation inhibits the release of GABA and glutamate onto CSF-cNs. The schematic illustration in Figure 9 summarises the overall results.

Absence of GIRK-dependent inhibition in CSF-cNs

The most intriguing result reported here is the lack of GABA_B-mediated GIRK response in CSF-cNs. Indeed, our data revealed that the application of baclofen, the selective agonist of GABA_B-Rs, had no effect in all cells tested,

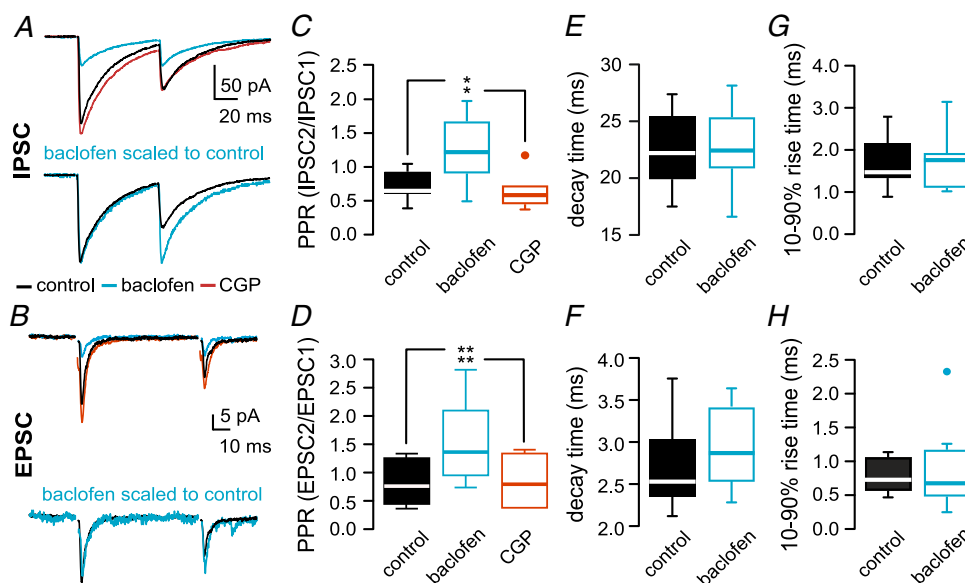


Figure 8. Baclofen increases the paired-pulse ratio of both IPSCs and EPSCs but has no effect on their kinetics

A, upper traces: representative averaged IPSCs recorded by a paired-pulse stimulation at an interstimulus interval of 70 ms before (black) and in the presence of 20 μ M baclofen (blue) and 2 μ M CGP (red). IPSCs were recorded at 0.1 Hz from CSF-cNs voltage-clamped at -60 mV in aCSF containing DNQX (20 μ M) and strychnine (1 μ M). A, lower traces: IPSCs recorded without (black) or in the presence of baclofen (blue) were scaled to the first response. B, upper traces: representative paired-pulse EPSCs averaged traces evoked at an interstimulus interval of 70 ms before (black) and in the presence of 20 μ M baclofen (blue) and 2 μ M CGP (red). EPSCs were recorded every 10 s at -60 mV and with aCSF containing gabazine (10 μ M) and strychnine (1 μ M). B, lower traces: EPSCs recorded without (black) or in the presence of baclofen (blue) were scaled to the first response. C, summary box-and-whisker plots showing the effect of baclofen on the paired-pulse ratio of IPSCs (PPR: amplitude of the second IPSC/amplitude of the first IPSC). Baclofen significantly increased the PPR of IPSCs and its effect was reversed with CGP (control: 0.72 ± 0.23 , $n = 7$; baclofen: 1.22 ± 0.50 , $n = 5$; CGP: 0.65 ± 0.26 , $n = 7$; $*P < 0.05$, repeated measures ANOVA/Tukey *post hoc* multiple comparison test). D, summary box-and-whisker plots showing that baclofen significantly increased the paired-pulse ratio of EPSCs (PPR: amplitude of the second EPSC/amplitude of the first EPSC). The baclofen-mediated increase of the PPR was reversed with CGP (control: 0.85 ± 0.40 , $n = 7$; baclofen: 1.52 ± 0.73 , $n = 7$; CGP: 0.86 ± 0.43 , $n = 7$; $**P < 0.01$, repeated measures ANOVA/Tukey *post hoc* multiple comparison test). E and F, summary box-and-whisker plots showing that IPSCs (E) and EPSCs (F) had similar decay times between control (IPSC: 22.35 ± 3.01 ms, $n = 11$; EPSC: 2.71 ± 0.50 ms, $n = 9$) and 20 μ M baclofen (IPSC: 23.07 ± 3.26 ms, $n = 11$; $P = 0.5305$, Student's two-tailed paired *t* test; EPSC: 2.82 ± 0.48 ms, $n = 9$; $P = 0.6106$, Student's two-tailed paired *t* test). For both IPSCs and EPSCs, decay time constants were obtained from a monoexponential fit to the decay phase of synaptic currents. G and H, box-and-whisker plots summarising the effect of baclofen (20 μ M) on the 10–90% rise time of evoked IPSCs (G) and EPSCs (H). Baclofen had no significant effect on the 10–90% rise time of IPSCs (control: 1.68 ± 0.55 ms, $n = 11$; baclofen: 1.68 ± 0.63 ms, $n = 11$; $P = 0.9810$, Student's two-tailed paired *t* test) and EPSCs (control: 0.79 ± 0.25 ms, $n = 9$; baclofen: 0.89 ± 0.63 ms, $n = 9$; $P = 0.6065$, Student's two-tailed paired *t* test).

neither on holding currents when CSF-cNs were recorded in voltage-clamp mode, nor on membrane potentials under current-clamp recordings. However, GABA_B-Rs had an inhibitory effect on Ca_V channels mediated by Gβγ activation, indicating that GABA_B-Rs are functional at the membrane of CSF-cNs and able to activate the G protein-dependent signalling cascade. Furthermore, GABA_B-R activation induced classical outward K⁺ currents in other neurones of the brainstem such as DMNX neurones, as previously shown (Browning & Travagli, 2001), which rules out eventual bias in our recording conditions of GIRK responses.

Postsynaptic GABA_B-Rs express after birth but they do not open GIRK channels in developing brain in the first days of life (Gaiarsa & Porcher, 2013). GABA_B-R-mediated GIRK currents establish in brain rodents after the first postnatal week (Luhmann & Prince, 1991; Gaiarsa *et al.* 1995) or at the latest between the third and the fifth postnatal week (Nurse & Lacaille, 1999; Lei & McBain, 2003). In our study, we recorded CSF-cNs in 8- to 12-week-old adult mice, therefore in a time window in which GABA_B-Rs are supposed to be fully mature and trigger GIRK currents. However, CSF-cNs were shown to retain some immature features in adulthood because they continue to exhibit immature markers such as the expression of doublecortin or Nkx6.1 proteins, as well as a high resting potential and input resistance (Orts-Del'Immagine *et al.* 2012, 2014, 2017). As GIRK inhibition has been shown to appear in mature neurones (Mongiati *et al.* 2009; Gonzalez *et al.* 2018), one could suggest that the lack of GABA_B-R-mediated GIRK inhibition in CSF-cNs is the consequence of their persistent immature state. The physiological conditions in which CSF-cNs terminate their development, as well as

the underlying mechanisms, are still unknown, but the expression of GIRK inhibition concomitantly with the full maturation of CSF-cNs may strongly change their excitability properties (Mongiati *et al.* 2009). Interestingly, in developing brain regions where GABA_B-Rs do not control cell excitability by gating GIRK channels, it was shown that the receptor is coupled to signalling pathways involved in neuronal development (Bony *et al.* 2013; Gaiarsa & Porcher, 2013; Giachino *et al.* 2014). One could therefore hypothesise that GABA_B-Rs might be involved in maturation processes of CSF-cNs, but further studies will need to address this potential function for GABA_B-Rs in CSF-cNs.

CSF-cNs express voltage-gated Ca²⁺ channels and they are inhibited by GABA_B receptors

To date there is little information about the Ca_V expression and function in medullo-spinal CSF-cNs, nor about the isoform(s) expressed. Classically, depending on the α-subunit forming the channel, Ca_V can be subdivided in high (Ca_V1 and 2) and low voltage-activated (Ca_V3) channel classes comprising different isoforms based on channel electrophysiological properties (Catterall, 2011). Here, using a selective pharmacological approach, we conducted the first characterisation of Ca_V expression in CSF-cNs from adult mice. Our results indicate that CSF-cNs express primarily the N-type Ca²⁺ channels (Ca_V2.2; around 80% of the total current) along with Ca_V2.1 (P/Q-type) and Ca_V1.2 and 1.3 (neuronal L-type), although at a lower level (<20% of the total current). All identified isoforms are the neuronal forms of high-voltage activated Ca²⁺ channels (Catterall, 2011), a result consistent with the neuronal nature of CSF-cNs.

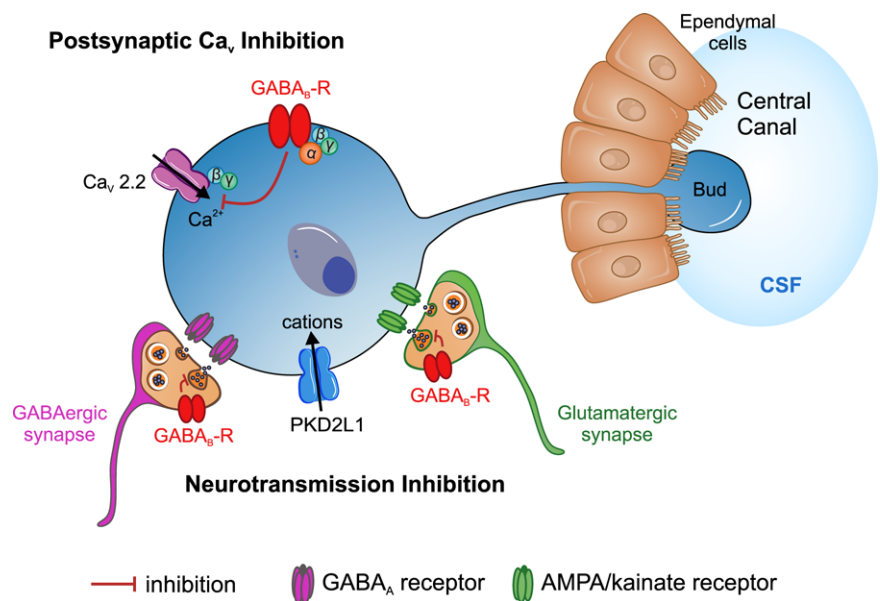


Figure 9. Cartoon summarising the function of GABA_B-Rs in CSF-cNs

CSF-cNs express GABA_B-Rs that inhibit voltage-gated calcium (Ca_V) channels through the recruitment of Gβγ-subunits. Note that following GABA_B-R activation no G protein-activated inwardly rectifying K⁺ (GIRK) response could be observed. GABA_B-Rs are also localised presynaptically on GABAergic and glutamatergic axon terminals forming synapses onto CSF-cNs, and their activation inhibits the release of GABA and glutamate, respectively.

Marichal and colleagues (2009) indicated that CSF-cNs recorded from juvenile rats express T-type Ca^{2+} channels (Ca_V3). This subtype is characterised by an activation around -60 mV (low-voltage) and a fast inactivation around -40 mV (Fox *et al.* 1987; Ikeda & Dunlap, 2007; Catterall, 2011). Our results suggest that CSF-cNs from adult mice do not express the Ca_V3 subtype. Indeed, in adult mouse CSF-cNs, Ca^{2+} currents could only be activated for membrane potentials higher than -40 mV and we did not observe in the current-voltage relationships the characteristic shoulder (between -60 and -40 mV) underlying Ca_V3 activation.

The characterisation of Ca_V subtypes expressed in CSF-cNs and the analysis of their modulation following GABA_B -R activation typically required 10 min long recordings, a period over which we observed a decrease in the Ca^{2+} current amplitude by $35.8 \pm 9\%$ ($n = 13$), even in the presence of 10 mM intracellular EGTA as Ca^{2+} buffer (slow kinetics), while the access resistance and the holding current remained unchanged over the same period of time (data not shown). Calcium currents have been reported to undergo rundown when recorded over long periods in the whole-cell configuration and this phenomenon is largely due to a Ca^{2+} -dependent mechanism (Belles *et al.* 1988). In the presence of 10 mM BAPTA, another type of Ca^{2+} buffer with faster binding kinetics and higher buffering capacity, we observed a similar phenomenon (amplitude decreased by $24.2 \pm 4\%$, $n = 11$; $P = 0.706$ when compared to recordings with EGTA, Mann-Whitney test; data not shown). This result would suggest that the observed rundown is not Ca^{2+} dependent and would involve some other regulatory processes. On the other hand, CSF-cNs are small neurones ($\sim 10 \mu\text{m}$ diameter) with little cytosolic space, and one could suggest that recordings performed under whole-cell configuration would lead to massive dialysis of intracellular compounds necessary for Ca^{2+} channel activity. To characterise the molecular basis of the observed rundown, one would need to carry out a set of specific experiments but, since this is beyond the scope of the present study, it was not further addressed.

In the past decades, numerous studies have demonstrated that Ca^{2+} channels, especially $\text{Ca}_V2.2$ in neurones, are inhibited by activation of metabotropic receptors primarily of the $\text{G}_{i/o}$ type (Pertussis toxin sensitive) (Ikeda & Dunlap, 1999, 2007; Dolphin, 2003) through the direct binding to the channel of the $\text{G}\beta\gamma$ dimers (Bean, 1989; Ruiz-Velasco & Ikeda, 2000; Dolphin, 2003; Zamponi & Currie, 2013). Medullar CSF-cNs receive GABA_A ergic synaptic entries that would activate both synaptic ionotropic GABA_A and metabotropic GABA_B receptors. The latter GABA_B ergic receptor subtype was shown in different neuronal populations to inhibit both pre- and postsynaptic Ca^{2+} channels (Pérez-Garci *et al.* 2006; Booker *et al.* 2018). Consistent with the literature, we demonstrate in medullar CSF-cNs that GABA_B -Rs

strongly and selectively inhibit $\text{Ca}_V2.2$ and we show that this inhibition is mediated by a voltage-dependent $\text{G}\beta\gamma$ mechanism. As a consequence, GABA_B -R-mediated Ca_V inhibition leads to a decrease in the Ca^{2+} influx and thus in the intracellular Ca^{2+} concentration. Except for its role in triggering neurotransmission, Ca^{2+} plays crucial functions in the regulation of neuronal physiology and activity. First, at the genomic level, Ca^{2+} was shown to stimulate Ca^{2+} -regulated-kinase-cascades and phosphorylation of AMP-response element binding protein (CREB) and to play a role in gene transcription (Gallin & Greenberg, 1995; West *et al.* 2001). Thus, variation in intracellular Ca^{2+} might recruit basal transcription machinery in CSF-cNs, leading to an activity-dependent protein expression. Second, several reports indicate that Ca^{2+} is capable of activating or modulating sodium, potassium (Shah *et al.* 2006) and chloride (Frings *et al.* 2000) ionic conductance and/or of regulating postsynaptic receptors through Ca^{2+} -dependent phosphorylation processes (Booker *et al.* 2018). Similar mechanisms might exist in CSF-cNs to regulate their activity and excitability. Finally, PKD2L1 channels were shown to be regulated by intracellular Ca^{2+} (Chen *et al.* 1999; DeCaen *et al.* 2016) and to act as a sensory receptor modulating CSF-cN excitability (Orts-Del'Immagine *et al.* 2016; Jalalvand *et al.* 2016). Thus, in CSF-cNs, variation in intracellular Ca^{2+} would affect PKD2L1 activity and in turn CSF-cN excitability. Considering that GABA_B -R activation reduces Ca^{2+} influx in CSF-cNs, one would expect a reduced activation or stimulation of the previously mentioned signalling cascades and, as a consequence, a modulation of CSF-cN activity and physiology. Similarly, bioactive compounds circulating in the CSF or released by synaptic partners might activate other GPCR subtypes expressed in CSF-cNs and targeting Ca^{2+} signalling to regulate CSF-cN activity. The identification of such regulatory pathways represents one of the future challenges in the demonstration for the role and modulation of medullo-spinal CSF-cNs in the central nervous system.

CSF-cNs receive synaptic glutamatergic inputs

As the spontaneous synaptic activity is very low in rodent CSF-cNs, we used in our previous works the application of a hypertonic solution to increase the synaptic release of neurotransmitters and found that hypertonic shocks induce in CSF-cNs inhibitory GABA_A and glycinergic synaptic currents, but not excitatory glutamatergic synaptic currents (Orts-Del'Immagine *et al.* 2012, 2016). In neurones, the mechanisms underlying the increase of synaptic release following hypertonic shocks are not well known and more importantly they do not involve calcium entry into the presynaptic compartment (Rosenmund & Stevens, 1996; Mochida

et al. 1998). For a more accurate analysis of synaptic transmission, we therefore used in this study a physiologically relevant approach using electrical stimulations to evoke calcium-dependent synaptic transmission. We found that local electrical stimulations indeed evoked in CSF-cNs glutamatergic synaptic currents (EPSCs), showing that, in addition to GABAergic and glycinergic synaptic inputs, CSF-cNs receive also functional glutamatergic synaptic inputs. Evoked EPSCs were almost fully inhibited by DNQX, a selective antagonist of AMPA/kainate receptors, indicating that EPSCs in CSF-cNs do not have a NMDA receptor component. These results are consistent with our previous data showing that CSF-cNs express functional kainate and AMPA receptors but not NMDA receptors (Orts-Del'Immagine *et al.* 2016). Indeed, currents evoked by local application of glutamate in medullar CSF-cNs were inhibited by DNQX but not by the NMDA receptor antagonist AP-5 and application of NMDA failed to induce any currents, even at more depolarised potentials to remove the magnesium block (Orts-Del'Immagine *et al.* 2016). Note that spinal CSF-cNs in lower vertebrates such as lampreys have been shown to exhibit glutamatergic transmission engaging both AMPA and NMDA receptors (Jalalvand *et al.* 2016). Whether this difference is the consequence of NMDA receptor loss of expression in mammalian CSF-cNs during evolution or more simply a different glutamatergic signalling between CSF-cNs localised in brainstem and spinal cord remains an open question.

GABA_B receptors inhibit both the release of GABA and glutamate onto CSF-cNs

We demonstrated that activation of GABA_B-Rs by baclofen inhibits the amplitude of evoked IPSCs and EPSCs recorded in CSF-cNs. The inhibitory effect of baclofen on the synaptic transmission in CSF-cNs is most likely mediated by the activation of GABA_B-Rs located pre-synaptically on terminals of GABAergic and glutamatergic inputs and by interfering with the neurotransmitter release machinery, as shown in many brain regions (Pinard *et al.* 2010). Two results in our study support this assumption. First, we show that baclofen enhanced the paired-pulse ratio of two consecutive IPSCs or EPSCs, an observation consistent with an alteration of the neurotransmitter release probability, as reported in a variety of different synapses (Manabe *et al.* 1993; Wilcox & Dichter, 1994; Fioravante & Regehr, 2011). Second, we show that baclofen had no effects on IPSC and EPSC kinetics (rise and decay times), therefore ruling out eventual interactions between postsynaptic GABA_B-Rs and postsynaptic GABA_A or AMPA/kainate receptors. Studying the effect of baclofen on the frequency of miniature IPSCs and EPSCs would be a suitable approach to further confirm the presynaptic terminal localisation of GABA_B-Rs on GABAergic

and glutamatergic inputs to CSF-cNs. However, such experiments would be difficult to achieve in CSF-cNs since the frequency of spontaneous synaptic events is very low in these neurones (Orts-Del'Immagine *et al.* 2012, 2016).

Conclusion

In the present study, we characterise for the first time in mouse medullar CSF-cNs their synaptic connectivity and show that they receive both GABAergic and AMPA/kainate glutamatergic inputs. Further we indicate that GABA_B-Rs are functional and act as modulators of CSF-cN activity both at the pre- and postsynaptic level where they target Ca²⁺ channels. These results add to the growing bulk of data on CSF-cN physiology and give the first insights into CSF-cN regulation through synaptic partners. In future studies, one will first need to identify the localisation of the GABAergic and glutamatergic neuronal partners connected to medullar CSF-cNs and to determine how they modulate their activity. It will then be necessary to identify whether they receive synaptic projections from other neuronal populations. Together, the expected results of these studies will form a basis for understanding the function of this unique neuronal population.

References

- Barral J, Toro S, Galarraga E & Bargas J (2000). GABAergic presynaptic inhibition of rat neostriatal afferents is mediated by Q-type Ca²⁺ channels. *Neurosci Lett* **283**, 33–36.
- Bean BP (1989). Neurotransmitter inhibition of neuronal calcium currents by changes in channel voltage dependence. *Nature* **340**, 153–156.
- Belles B, Malécot CO, Hescheler J & Trautwein W (1988). “Run-down” of the Ca current during long whole-cell recordings in guinea pig heart cells: role of phosphorylation and intracellular calcium. *Pflugers Arch* **411**, 353–360.
- Bettler B, Kaupmann K, Mosbacher J & Gassmann M (2004). Molecular structure and physiological functions of GABA_B receptors. *Physiol Rev* **84**, 835–867.
- Böhm UL, Prendergast A, Djenoune L, Nunes Figueiredo S, Gomez J, Stokes C, Kaiser S, Suster M, Kawakami K, Charpentier M, Concordet J-P, Rio J-P, Del Bene F & Wyart C (2016). CSF-contacting neurons regulate locomotion by relaying mechanical stimuli to spinal circuits. *Nat Commun* **7**, 10866.
- Bony G, Szczurkowska J, Tamagno I, Shelly M, Contestabile A & Cancedda L (2013). Non-hyperpolarizing GABA_B receptor activation regulates neuronal migration and neurite growth and specification by cAMP/LKB1. *Nat Commun* **4**, 1800.
- Booker SA, Loreth D, Gee AL, Watanabe M, Kind PC, Wyllie DJA, Kulik Á & Vida I (2018). Postsynaptic GABA_BRs inhibit L-type calcium channels and abolish long-term potentiation in hippocampal somatostatin interneurons. *Cell Rep* **22**, 36–43.
- Browning KN & Travagli RA (2001). Mechanism of action of baclofen in rat dorsal motor nucleus of the vagus. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **280**, G1106–G1113.

- Catterall WA (2011). Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**, a003947.
- Chen G & van den Pol AN (1998). Presynaptic GABA_B autoreceptor modulation of P/Q-type calcium channels and GABA release in rat suprachiasmatic nucleus neurons. *J Neurosci* **18**, 1913–1922.
- Chen XZ, Vassilev PM, Basora N, Peng JB, Nomura H, Segal Y, Brown EM, Reeders ST, Hediger MA & Zhou J (1999). Polycystin-L is a calcium-regulated cation channel permeable to calcium ions. *Nature* **401**, 383–386.
- DeCaen PG, Liu X, Abiria S & Clapham DE (2016). Atypical calcium regulation of the PKD2-L1 polycystin ion channel. *Elife* **5**, e13413.
- De Koninck Y & Mody I (1997). Endogenous GABA activates small-conductance K⁺ channels underlying slow IPSCs in rat hippocampal neurons. *J Neurophysiol* **77**, 2202–2208.
- Djenoune L, Khabou H, Joubert F, Quan FB, Nunes Figueiredo S, Bodineau L, Del Bene F, Burcklé C, Tostivint H & Wyart C (2014). Investigation of spinal cerebrospinal fluid-contacting neurons expressing PKD2L1: evidence for a conserved system from fish to primates. *Front Neuroanat* **8**, 26.
- Dolphin AC (2003). G protein modulation of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev* **55**, 607–627.
- Fioravante D & Regehr WG (2011). Short-term forms of presynaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol* **21**, 269–274.
- Fox AP, Nowycky MC & Tsien RW (1987). Kinetic and pharmacological properties distinguishing three types of calcium currents in chick sensory neurones. *J Physiol* **394**, 149–172.
- Frings S, Reuter D & Kleene SJ (2000). Neuronal Ca²⁺-activated Cl⁻ channels – homing in on an elusive channel species. *Prog Neurobiol* **60**, 247–289.
- Gaiarsa J-L & Porcher C (2013). Emerging neurotrophic role of GABA_B receptors in neuronal circuit development. *Front Cell Neurosci* **7**, 206.
- Gaiarsa JL, Tseeb V & Ben-Ari Y (1995). Postnatal development of pre- and postsynaptic GABA_B-mediated inhibitions in the CA3 hippocampal region of the rat. *J Neurophysiol* **73**, 246–255.
- Gallin WJ & Greenberg ME (1995). Calcium regulation of gene expression in neurons: the mode of entry matters. *Curr Opin Neurobiol* **5**, 367–374.
- Giachino C, Barz M, Tchorz JS, Tome M, Gassmann M, Bischofberger J, Bettler B & Taylor V (2014). GABA suppresses neurogenesis in the adult hippocampus through GABA_B receptors. *Development* **141**, 83–90.
- Gonzalez JC, Epps SA, Markwardt SJ, Wadiche JI & Overstreet-Wadiche L (2018). Constitutive and synaptic activation of GIRK channels differentiates mature and newborn dentate granule cells. *J Neurosci* **38**, 6513–6526.
- Herlitze S, Garcia DE, Mackie K, Hille B, Scheuer T & Catterall WA (1996). Modulation of Ca²⁺ channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature* **380**, 258–262.
- Huang AL, Chen X, Hoon MA, Chandrashekar J, Guo W, Tränkner D, Ryba NJP & Zuker CS (2006). The cells and logic for mammalian sour taste detection. *Nature* **442**, 934–938.
- Ikedo SR (1996). Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature* **380**, 255–258.
- Ikedo SR & Dunlap K (1999). Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels: role of G protein subunits. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* **33**, 131–151.
- Ikedo SR & Dunlap K (2007). Calcium channels diversify their signaling portfolio. *Nat Neurosci* **10**, 269–271.
- Jalalvand E, Robertson B, Wallén P & Grillner S (2016). Ciliated neurons lining the central canal sense both fluid movement and pH through ASIC3. *Nat Commun* **7**, 10002.
- Lei S & McBain CJ (2003). GABA_B receptor modulation of excitatory and inhibitory synaptic transmission onto rat CA3 hippocampal interneurons. *J Physiol* **546**, 439–453.
- Liu Q & Wong-Riley MTT (2005). Postnatal developmental expressions of neurotransmitters and receptors in various brain stem nuclei of rats. *J Appl Physiol* **98**, 1442–1457.
- Luhmann HJ & Prince DA (1991). Postnatal maturation of the GABAergic system in rat neocortex. *J Neurophysiol* **65**, 247–263.
- Lüscher C, Jan LY, Stoffel M, Malenka RC & Nicoll RA (1997). G protein-coupled inwardly rectifying K⁺ channels (GIRKs) mediate postsynaptic but not presynaptic transmitter actions in hippocampal neurons. *Neuron* **19**, 687–695.
- McDermott CM, Abrahams TP, Partosoedarso E, Hyland N, Ekstrand J, Monroe M & Hornby PJ (2001). Site of action of GABA_B receptor for vagal motor control of the lower esophageal sphincter in ferrets and rats. *Gastroenterology* **120**, 1749–1762.
- Manabe T, Wyllie DJ, Perkel DJ & Nicoll RA (1993). Modulation of synaptic transmission and long-term potentiation: effects on paired pulse facilitation and EPSC variance in the CA1 region of the hippocampus. *J Neurophysiol* **70**, 1451–1459.
- Margeta-Mitrovic M, Mitrovic I, Riley RC, Jan LY & Basbaum AI (1999). Immunohistochemical localization of GABA_B receptors in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* **405**, 299–321.
- Marichal N, García G, Radmilovich M, Trujillo-Cenóz O & Russo RE (2009). Enigmatic central canal contacting cells: immature neurons in “standby mode”? *J Neurosci* **29**, 10010–10024.
- Mochida S, Yokoyama CT, Kim DK, Itoh K & Catterall WA (1998). Evidence for a voltage-dependent enhancement of neurotransmitter release mediated via the synaptic protein interaction site of N-type Ca²⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 14523–14528.
- Möhler H & Fritschy JM (1999). GABA_B receptors make it to the top – as dimers. *Trends Pharmacol Sci* **20**, 87–89.
- Mongiati LA, Espósito MS, Lombardi G & Schinder AF (2009). Reliable activation of immature neurons in the adult hippocampus. *PLoS One* **4**, e5320.
- Nurse S & Lacaille JC (1999). Late maturation of GABA_B synaptic transmission in area CA1 of the rat hippocampus. *Neuropharmacology* **38**, 1733–1742.

- Orts-Del'Imagine A, Kastner A, Tillement V, Tardivel C, Trouslard J & Wanaverbecq N (2014). Morphology, distribution and phenotype of polycystin kidney disease 2-like 1-positive cerebrospinal fluid contacting neurons in the brainstem of adult mice. *PLoS One* **9**, e87748.
- Orts-Del'Imagine A, Seddik R, Tell F, Airault C, Er-Raoui G, Najimi M, Trouslard J & Wanaverbecq N (2016). A single polycystic kidney disease 2-like 1 channel opening acts as a spike generator in cerebrospinal fluid-contacting neurons of adult mouse brainstem. *Neuropharmacology* **101**, 549–565.
- Orts-Del'Imagine A, Trouslard J, Airault C, Hugnot J-P, Cordier B, Doan T, Kastner A & Wanaverbecq N (2017). Postnatal maturation of mouse medullo-spinal cerebrospinal fluid-contacting neurons. *Neuroscience* **343**, 39–54.
- Orts-Del'Imagine A, Wanaverbecq N, Tardivel C, Tillement V, Dallaporta M & Trouslard J (2012). Properties of subependymal cerebrospinal fluid contacting neurones in the dorsal vagal complex of the mouse brainstem. *J Physiol* **590**, 3719–3741.
- Padgett CL & Slesinger PA (2010). GABA_B receptor coupling to G-proteins and ion channels. *Adv Pharmacol* **58**, 123–147.
- Pérez-Garci E, Gassmann M, Bettler B & Larkum ME (2006). The GABA_{B1b} isoform mediates long-lasting inhibition of dendritic Ca²⁺ spikes in layer 5 somatosensory pyramidal neurons. *Neuron* **50**, 603–616.
- Pin J-P & Bettler B (2016). Organization and functions of mGlu and GABA_B receptor complexes. *Nature* **540**, 60–68.
- Pinard A, Seddik R & Bettler B (2010). GABA_B receptors: physiological functions and mechanisms of diversity. *Adv Pharmacol* **58**, 231–255.
- Pinheiro J, DebRoy S, Sarkar D & R Core Team (2016). nlme: Linear and nonlinear mixed effects models. Available at: <https://cran.r-project.org/web/packages/nlme/citation.html> [Accessed October 4, 2016].
- Rosenmund C & Stevens CF (1996). Definition of the readily releasable pool of vesicles at hippocampal synapses. *Neuron* **16**, 1197–1207.
- Ruiz-Velasco V & Ikeda SR (2000). Multiple G-protein $\beta\gamma$ combinations produce voltage-dependent inhibition of N-type calcium channels in rat superior cervical ganglion neurons. *J Neurosci* **20**, 2183–2191.
- Sakaba T & Neher E (2003). Direct modulation of synaptic vesicle priming by GABA_B receptor activation at a glutamatergic synapse. *Nature* **424**, 775–778.
- Scanziani M, Capogna M, Gähwiler BH & Thompson SM (1992). Presynaptic inhibition of miniature excitatory synaptic currents by baclofen and adenosine in the hippocampus. *Neuron* **9**, 919–927.
- Shah VN, Chagot B & Chazin WJ (2006). Calcium-dependent regulation of ion channels. *Calcium Bind Proteins* **1**, 203–212.
- Stoeckel M-E, Uhl-Bronner S, Hugel S, Veinante P, Klein M-J, Mutterer J, Freund-Mercier M-J & Schlichter R (2003). Cerebrospinal fluid-contacting neurons in the rat spinal cord, a gamma-aminobutyric acidergic system expressing the P2X2 subunit of purinergic receptors, PSA-NCAM, and GAP-43 immunoreactivities: light and electron microscopic study. *J Comp Neurol* **457**, 159–174.
- Vígh B, Manzano e Silva MJ, Frank CL, Vincze C, Czirok SJ, Szabó A, Lukáts A & Szél A (2004). The system of cerebrospinal fluid-contacting neurons. Its supposed role in the nonsynaptic signal transmission of the brain. *Histol Histopathol* **19**, 607–628.
- West AE, Chen WG, Dalva MB, Dolmetsch RE, Kornhauser JM, Shaywitz AJ, Takasu MA, Tao X & Greenberg ME (2001). Calcium regulation of neuronal gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 11024–11031.
- Wilcox KS & Dichter MA (1994). Paired pulse depression in cultured hippocampal neurons is due to a presynaptic mechanism independent of GABA_B autoreceptor activation. *J Neurosci* **14**, 1775–1788.
- Zamponi GW & Currie KPM (2013). Regulation of Ca_v2 calcium channels by G protein coupled receptors. *Biochim Biophys Acta* **1828**, 1629–1643.

Additional information

Competing interests

The authors declare no competing financial interests.

Author contributions

All authors approved the final version of the manuscript and agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. All persons designated as authors qualify for authorship, and all those who qualify for authorship are listed. Conception of the work (R.S., J.T. & N.W.); Acquisition, analysis and interpretation of data for the work (C.A., N.J., G.E.-R., R.S. & N.W.); Drafting the work and revising it for critically intellectual content (C.A., N.J., G.E.-R., R.S., J.T. & N.W.).

Funding

This research was supported by funding obtained from Aix-Marseille University, the “Région Provence-Alpes-Côte d’Azur” and the “Conseil Général des Bouches-du-Rhône” (PACA, CG13 - Neuracid, J.T.), PEPS 2010 from the CNRS INSB (Neuracil, N.W.), La Ville de Marseille (Nanocan, J.T.), l’Agence National pour la Recherche et la Deutsche Forschung Gemeinschaft (ANR-DFG PRCI- MOTAC80C/A134/AN16HRJ NMF, N.W.). G.E.-R. was supported by scholarship from a France-Morocco Neurosciences program. N.J. is recipient of an A*Midex AMU PhD scholarship from the ‘Integrative and Clinical PhD international program’.

Acknowledgements

We thank the Aix Marseille University (AMU) Microscopy Centre (CP2M) for access to confocal microscopy and Kévin Poirot for his assistance in image acquisition.