



Thèse de Doctorat de l'Université de Strasbourg En Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie Mention

NEUROSCIENCES

Présentée par Xavier Rezaï en vue de l'obtention du grade de Docteur de l'Université de Strasbourg

ACTIVATION ET INTERNALISATION

DU RECEPTEUR AUX OPIOIDES DELTA

EN TRANCHE AIGUE HIPPOCAMPIQUE DE SOURIS

Thèse soutenue publiquement le 10 Octobre 2011 A l'Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire

Membres du Jury :

Dr. Dominique MASSOTTE Pr. Pierrick POISBEAU Dr. Stéphane ALLOUCHE Dr. Olivier RAINETEAU Pr. Brigitte KIEFFER Dr. Michel ROUX Directeur de thèse, Strasbourg Rapporteur interne, Strasbourg Rapporteur externe, Caen Rapporteur externe, Zurich Membre invité, Strasbourg Membre invité, Strasbourg

Remerciements

Le travail présenté dans ce manuscrit a été réalisé sous la direction du Docteur Dominique Massotte, dans l'équipe dirigée par le Professeur Brigitte Kieffer. Je tiens avant tout à remercier le Professeur Brigitte Kieffer pour son soutien, et pour m'avoir permis d'effectuer ma thèse au sein de son laboratoire.

Je tiens à remercier vivement le docteur Dominique Massotte pour avoir encadré mon travail de thèse et pour m'avoir aidé pendant la rédaction. A titre plus personnel, j'ai beaucoup appris de votre rigueur scientifique et de votre positivisme.

Je tiens également à remercier le docteur Michel Roux, qui a supervisé la partie électrophysiologie de mon travail avec calme et rationalité. Merci aussi pour ton honnêteté et ta disponibilité.

Je tiens à remercier le Professeur Pierrick Poisbeau, et les Docteurs Oliviers Raineteau et Stéphane Allouche pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse, et ainsi d'évaluer mon travail.

Je remercie également la plateforme d'imagerie : Marc Koch, Pascal Kessler, Jean-Daniel Fauny, Marcel Boeglin, Yves Lutz et Jean-Luc Vonesch pour leur aide précieuse, tout long de ma thèse. Merci également à Gilles et Djemo de l'animalerie pour leur sympathie et leur aide.

Merci à Yann Humeau d'avoir pensé à moi pour effectuer une collaboration aussi rapide qu'agréable, et qui m'a permis de faire mon entrée sur PubMed.

Je remercie tous les membres du labo, en commençant par « les gens du 2^{ème} » qui m'ont accueilli et chouchouté pendant 4 ans: Merci Aline pour ta disponibilité et ton soutien, merci Anne pour tous les délires au coin de la paillasse, merci Yvan, Armenak, Marios et Emilien, Perceval et Karadock.

Merci aux autres membres du laboratoire, passé ou présent, pour leur aide et pour les bons moments passés ensemble : Abdel, Amynah, Audrey, Carolina, Célia, Chihiro, Claire, Clara, David, Dom, Eric, Jerome, Julie, Katia, Lauren, Manu, Olivier, Pascale, Paul, Pauline, Pierre-Eric, Raphaël. Merci Sercan pour ton aide et ton soutien durant ces quatre ans, mais surtout pour les bons moments passés à bricoler au labo. Malheureusement, même la Xavier & Sercan Corp. délocalise sa production. Merci Anne-Sophie, la plus geek des biologistes moléculaires à talon, pour ta présence, ton amitié et ton sourire tous les midi. Merci aussi Guillaume pour les soirées du Lundi, et les smoothies cubain (??). Merci William Cobalt, j'ai été heureux de t'apprendre le peu que je savais lors de ma première année de thèse sur le patch-clamp. Merci aussi à mes autres amis strasbourgeois : Alexis, Alex, Marie, Geoffroy, Jean pour les moments de détente aux 12 apôtres, à l'OPIUM ou au Zigfrid...

Merci beaucoup à ma famille : Tous mes frères, et mes quatre parents : Maman et Jean pour m'avoir soutenu et bichonné ici à Strasbourg. Papa et Afsaneh pour m'avoir fait voyager même quand j'étais pris par ma thèse, de Téhéran à Dubaï en passant par Tokyo et Macao. Mention spéciale à ma Grand-Mère, qui a toujours été là pour moi.

Enfin, je voudrais remercier celle qui est à mes côtés. Merci Anne pour ton énergie, ta présence, et ta patience tout au long de cette thèse.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	3
1. LE SYSTEME OPIOÏDE	5
1.1 GENERALITES	5
1.2. LIGANDS OPIOÏDES	5
1.2.1 LIGANDS EXOGENES	5
1.2.2 LIGANDS ENDOGENES	7
1.3. RECEPTEURS AUX OPIOÏDES	11
1.3.1 HISTORIQUE	11
1.3.2. Structure	13
1.4. DISTRIBUTION ET ROLE DU SYSTEME OPIOÏDE	14
1.4.1. DISTRIBUTION DU SYSTEME OPIOÏDE EN DEHORS DU CERVEAU	14
1.4.1. DISTRIBUTION DU SYSTEME OPIOÏDE DANS LE CERVEAU	14
1.4.2. Role du systeme opioïde	15
2. RECEPTEURS AUX OPIOÏDES DELTA	19
2.1. LIGANDS	19
2.1.1. PEPTIDIQUES	19
2.1.2. Alcaloïdes	21
2.2. ACTIVATION DU RECEPTEUR PAR LES LIGANDS ET SIGNALISATION INTRACELLULAIRE	21
2.2.1. ACTIVATION DES PROTEINES G	23
2.2.2. LES EFFECTEURS	23
2.2.3. ASPECTS DYNAMIQUES DE L'ACTIVATION DU RECEPTEUR	25
2.3. ARRET DE LA SIGNALISATION ET TRAFIC INTRACELLULAIRE	27
2.3.1. DESENSIBILISATION	27
2.3.2. INTERNALISATION	28
2.3.3. Devenir post-endocytique du recepteur delta	29
2.5. LA SOURIS DOR-EGFP	29
3. HIPPOCAMPE ET SYSTEME OPIOÏDE	32
3.1. ORGANISATION GENERALE DE L'HIPPOCAMPE	32
3.2. CYTOARCHITECTONIQUE	33
3.3. Organisation du systeme opioïde hippocampique	35
3.3.1. DISTRIBUTION DU RECEPTEUR DELTA	35
3.3.1. ETUDES ELECTROPHYSIOLOGIQUES	36
3.4. ROLE DE L'HIPPOCAMPE ET MODULATION DEPENDANT DU RECEPTEUR DELTA	37

TRAVAIL DE THESE

I-ACTIVATION DU RECEPTEUR AUX OPIOIDES DELTA DANS LA REGION CA1 : ETUDE ELECTROPHYSIOLOGIQUE 45

1. INTRODUCTION	47
2. ARTICLE	47
3. DONNEES SUPPLEMENTAIRES	73
3.1. LA BAISSE D'INHIBITION EST BIEN LIEE A L'ACTIVATION DU RECEPTEUR DELTA	73
3.2. CERTAINES CONDITIONS PERMETTENT D'OBTENIR UN LAVAGE	75
3.3. Hypothese d'une situation differente au niveau somato-dendritique et au niveau des	
TERMINAISONS	77

II-VERS L'IMAGERIE DE L'INTERNALISATION PHYSIOLOGIQUEDU RECEPTEUR AUX OPIOÏDES DELTA79

1. INTRODUCTION	80
2. MATERIEL ET METHODES	81
Animaux	81
CULTURES PRIMAIRES HIPPOCAMPO-STRIATALES	81
IMAGERIE EN TEMPS REEL EN CULTURES PRIMAIRES	81
IMMUNOCYTOCHIMIE SUR LES CULTURES PRIMAIRES	82
PREPARATION DES TRANCHES AIGUËS D'HIPPOCAMPE	82
IMAGERIE EN TEMPS REEL EN TRANCHES AIGUËS D'HIPPOCAMPE	82
3. RESULTATS	85
3.1. INTERNALISATION INDUITE PAR DES APPLICATIONS EN BAIN D'AGONISTES	85
3.1.1. TRANCHES AIGUËS FIXEES	85
3.1.2. IMAGERIE EN TEMPS REEL EN NEURONES PRIMAIRES	87
3.2. INTERNALISATION INDUITE PAR UNE APPLICATION LOCALE D'AGONISTE	89
3.2.3. MISE AU POINT	89
3.3.3. RESULTATS	93
III-CULTURES ORGANOTYPIQUES D'HIPPOCAMPE	99
1. INTRODUCTION	101

2.MATERIEL ET METHODES	102

3. RESULTATS	103
3.1. MISE AU POINT DES CONDITIONS DE CULTURES ET D'IMMUNOMARQUAGE	103
3.1.1. EVOLUTION DE LA QUALITE DES CULTURES	103
3.1.2. PENETRATION DES ANTICORPS – CHOIX DU DETERGENT	103
3.2. MORPHOLOGIE DES CULTURES ORGANOTYPIQUES	107
3.3. DISTRIBUTION DES CELLULES EXPRIMANT DOR-EGFP	107
3.4. Intensite de fluorescence associee a la fusion DOReGFP en l'absence d'amplification	ON.
	109
3.5. LOCALISATION PRE OU POST SYNAPTIQUE DE DOR-EGFP AU NIVEAU DES CELLULES PYRAMIDA	LES DE
CA1	109
DISCUSSION	131
1. VALIDATION DU SYSTEME	135
1.1. ACTIVATION DU RECEPTEUR DELTA	135
1.2. INTERNALISATION DU RECEPTEUR DELTA	136
2. VERS UNE INTERNALISATION « PHYSIOLOGIQUE» DU RECEPTEUR EN TRANCHE	136
2.1. INTERNALISATION ET NATURE DE L'AGONISTE	136
2.2. INTERNALISATION ET COMPARTIMENT CELLULAIRE	137
2.3. INTERNALISATION ET CONCENTRATION EN AGONISTE	138
2.4. PROFIL PARTICULIER D'INTERNALISATION « PHYSIOLOGIQUE »	140
3. SYSTEME OPIOÏDE ET RESEAU CA1	141
3.1. Controle de l'activite de CA1 par les opioïdes	141
3.2. Les afferences de CA1 modulees par les opioïdes	141
3.2.1. COLLATERALES DE SCHAFFER	141
3.2.2. LA VOIE TEMPORO-AMMONIQUE	143
3.3.3. CONDITIONS PHYSIOLOGIQUES POUVANT MENER A L'ACTIVATION DIFFERENTIELLE DE CES DEUX	
AFFERENCES PAR LES OPIOÏDES.	144
CONCLUSIONS & PERSPECTIVES	145
ANNEXE	149
BIBLIOGRAPHIE	153

LISTE DES FIGURES & TABLEAUX

Figure 1	Organisation générale du système opioïde	p n	4
Figure 2	Précurseurs des pentides onioïdes endogènes	р n	0 8
Figure 4	Sélectivité de ligands onioïdes	р n	10
Figure 5	Homologie des séquences des trois récenteurs aux onioïdes murins	Р n	12
Figure 6	Répartition du système opioïde dans le cerveau murin	р р	16
Figure 7	Quelques ligands du récepteur aux opioïdes delta	р р	20
Figure 8	Signalisation du récepteur delta aux opioïdes	р р	22
Figure 9	Desensibilisation et internalisation du récepteur delta aux opioïdes.	p	26
Figure 10	La Souris DOR-eGFP	р	30
Figure 11	Organisation de l'hippocampe	p	34
Figure 12	ARN des récepteurs mu et delta dans la région CA1 de l'hippocampe	p	34
Figure 13	Baisse de l'amplitue des TA eIPSC induite par l'activation des récepteurs delta aux opioïdes	р	74
Figure 14	Baisse réversible de fréquence des sIPSC et d'amplitude des TA eIPSC après activation des récepteur aux opioïdes delta	р	76
Figure 15	Localisation subcellulaire de DOR-eGFP après une éxpérience d'éléctrophysiologie	р	82
Figure 16	Application en bain d'agonistes en tranche aiguës	р	82
Figure 17	Internalisation de DOR-eGFP induite par 100nM de SNC 80 en culture primaire	p	86
Figure 18	Phosphorylation de DOR-eGFP en cultures neuronales.	р	86
Figure 19	Figure 19 Internalisation de DOR-eGFP induite par 100nM de deltorphine en culture neuronale		88
Figure 20	Mouvements membrannaires de DOR-eGFP induits par 10nM de deltorphine II en culture neuronale	р	88
Figure 21	Internalisation de DOR-eGFP induite par 100 nM de met- enképhaline en culture neuronales	р	90
Figure 22	Internalisation de DOR-eGFP induite par 5 nM de met-enképhaline en culture neuronales	р	90
Figure 23	Mise en évidence des mouvements tridimentionels intrinsèques au microscope confocal	р	91
Figure 24	Application locale dendritique de Fluoresceine (contrôle) en tranche aiguë	р	91
Figure 25	Application locale dendritique de met-enképhaline 1 mM en tranche aiguë	р	92

Figure 26	Application locale dendritique de met-enképhaline 1 μm en tranche aiguë		92
Figure 27	27 Application locale dendritique de deltorphine 1mM en tranche aiguë		94
Figure 28	Application locale somatique de deltorphine 1 mM en tranche aiguë	р	94
Figure 29	Application locale dendritique de SNC 80 1 mM en tranche aiguë	р	96
Figure 30	Application locale dendritique de BW373U86 en tranche aiguë	р	96
Tableau 1	Application locale d'agoniste opioïdes en tranche aiguës	р	97
Tableau 2	L'efficacité du SNC 80 et BW 373U86 à induire l'internalisation dépend du pH	р	97
Tableau 3	Anticorps et dillutions utilisés en culture organotypiques	р	102
Figure 31	Cultures organotypiques d'hippocampes, organisation cellulaire	р	104
Figure 32	Influence du détergent sur la pénétration des anticorps en immunohistochimie	р	104
Figure 33	Organisation neuronale des cultures organotypiques d'hippocampe	р	105
Figure 34	Organisation dendritique des cultures organotypiques d'hippocampe	р	105
Figure 35	Cytoarchitectonique DOR-eGFP en cultures organotypiques	р	106
Figure 36	Fluorescence DOR-eGFP sans amplification	р	106
Figure 37	Localisation présynaptique de DOR-eGFP au niveau des cellules pyramidales en cultures organotypiques	р	108
Figure 38	Localisation présynaptique de DOR-eGFP au niveau des cellules pyramidales en tranches aiguës	р	108
Figure 39	Afférences différentes pour les interneurones exprimants les récepteurs mu et delta	р	142

LISTE DES ABREVIATIONS

[35S]GTPγS	³⁵ S-labeled guanosine 5'-O-(3-thio)triphosphate
AAC	Cellule chandelier (axo-axonic cell)
AC	Adénylate cyclase
aCSF	Liquide cerebro-spinal artificiel
ACTH	Adrénocorticotropine
AMPc	Adénosine mono-phosphate cyclique
AP-2	Protéine adaptatrice 2
AR-M1000390	N,N-diethyl-4-(phenyl-piperidin-4-ylidenemethyl)-benzamide
ARN	Acide ribonucléique
BC	Cellule en panier (basket cell)
BS	Solution de blockage
BW 373U86	(±)-[1(S*),2α,5β]-4-[[2,5-Dimethyl-4-(2-propenyl)-1-piperazinyl]
	(3-hydroxyphenyl)methyl]-N,N-diethylbenzamide
CA	Corne d'Ammon
СаМК	proteine kinase dépendante de la Ca++/Calmoduline
DAGO	[D-Ala ² , N-Me-Phe ⁴ , Gly-ol]-enkephaline
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DG	Gyrus denté
DOR	Delta opioid receptor, récepteur aux opioïdes de type delta
DOR-eGFP	Souris knock in exprimant un récepteur aux opioïdes delta fusioné à l'eGFP
DPDPE	[D-Pen ^{2,5}]Enkephaline
eEPSC	Courant post synaptique excitateur évoqué
eGFP	Protéine fluorescente verte améliorée
eIPSC	Courant post synaptique inhibiteur évoqué
ERK	kinases régulées par les signaux extracellulaires
GABA	Acide gamma-amino-butyrique
GDP	Guanosine di-phosphate
GIRK	Canal potassique à rectification entrante activé par les protéines G
GluR1	Sous-unité 1 des récepteurs glutamate AMPA
GRK	Protéine kinase associée aux RCPG
GTP	Guanosine tri-phosphate
HEK 293	Cellules embryonaires humaines normales de rein 293
IP3	inositol tri-phosphate
MAP2	Protéine de type 2 associée aux microtubules

ΜΑΡΚ	Protéines kinases activées par les signaux mitogènes		
MSH	Hormone stimulant les mélanocytes		
NeuN	Neurofilament N		
NK	Neurokinine		
NRK	Cellules de rein de rat		
O-LM	Cellule oriens-lacunosum moleculare		
ORL	"opioïd receptor like"		
PB	Tampon phosphate		
PCR	Réaction de polymérisation en chaine		
PDYN	Prodynorphine		
PENK	Proenképhaline		
Pi-3 kinase	Phosphatidyl-inositol 3 kinase		
РКА	Protéine kinase A		
РКС	Protéine kinase C		
PLC	Phospholipase C		
РОМС	Proopiomélanocortine		
PSD 95	Protéine 95 de la densité post synaptique		
Ras-GRF	Ras protein-specific guanine nucleotide-releasing factor		
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G		
SaCSF	Slicing aCSF		
sIPSC	Courant post synaptique inhibiteur spontané		
SKF-10047	[2S-(2α,6α,11R*]-1,2,3,4,5,6-hexahydro-6,11-dimethyl-3-		
	(2-propenyl)-2,6-methano-3-benzazocin-8-ol		
SNC 80	(+)-4-[(αR)-α-((2S,5R)-4-Allyl-2,5-dimethyl-1-piperazinyl)-		
	3-methoxybenzyl]-N,N-diethylbenzamide		
TIPP[psi]	H-Tyr-Tic psi [CH2NH]Phe-Phe-OH		
ТМ	Domaine Transmembranaire		

ACTIVATION ET INTERNALISATION DU RECEPTEUR AUX OPIOIDES DELTA EN TRANCHE AIGUE HIPPOCAMPIQUE DE SOURIS

INTRODUCTION



Fig 1. organisation générale du système opioïde. Les trois types de peptides opioïdes endogènes peuvent se lier sur les trois types de récepteurs aux opioïdes pour moduler différentes fonctions physiologiques.

1. Le Système opioïde

1.1 Généralités

Le système opioïde fait partie des systèmes biologiques. On peut donc le définir comme un ensemble de cellules de l'organisme partageant une même organisation et ayant une ou des fonctions communes. L'organisation générale du système opioïde (Figure 1) est basée sur l'interaction entre deux types de cellules : un premier type est composé de cellules qui libèrent, dans certaines conditions, des ligands opioïdes endogènes. L'autre type est constitué de cellules situées à proximité ou plus éloignées, qui possèdent à leur surface des récepteurs aux opioïdes sur lesquels vont se lier ces ligands. Cette liaison déclenche une série d'événements aboutissant à la modulation de l'activité des cellules portant les récepteurs, et ainsi aux effets physiologiques contrôlés par ce système : fonctions autonomes, douleur, dépendance aux drogues, stress et émotions.

1.2. Ligands opioïdes

Parmi les différents ligands pouvant se lier aux récepteurs opioïdes, on en distingue deux types :

- les ligands exogènes, qui sont issus de plantes ou produits par synthèse chimique.
- les ligands opioïdes endogènes, produits par tout organisme disposant du système opioïde.

1.2.1 Ligands exogènes

Historiquement, le premier ligand opioïde exogène découvert par l'homme est la morphine, un des composés de l'opium. L'opium est une pâte obtenue après séchage de l'extrait du bulbe encore vert de la plante de pavot (*papavus somniferum*). Cette plante est cultivée pour ses propriétés analgésiques et euphorisantes depuis 4000 avant J.C., dans différentes civilisations (Perse, où l'opium est appelé thériaque, Egypte, Grèce, Rome, Occident)(Figure2). L'usage médical ou récréatif de l'opium ou de son principe actif principal, la morphine, se heurte cependant à une limite majeure. En effet, ces substances entraînent une forte dépendance,



از آمدن بهار و از رفتن دی اوراق وجود ما همی گردد طی می خور مخور اندوه که فرمود حکیم غمهای جهان چو ز هروتریاقش چومی

از آمدن بهار و از رفتن دی اوراق وجود ما همی گردد طی می خور مخور اندوه که فرمود حکیم غمهای جهان چو ز هروتریاقش چومی

"Que reviennent les printemps Et que passent les hivers Le registre de mes ans Se feuillette grand ouvert

Mais buvons, foin des chagrins ! Le docteur à bien raison Les soucis sont le poison Et la thériaque le vin !"



Fig 2. OPIUM. Photographies d'un champ de pavot et d'un bulbe vert incisé, d'où coule le latex qui donnera l'opium une fois sêché / Poème perse mentionnant les propriétés euphorisantes de la thériaque (opium), écrit par Omar Khayam au 12^e siècle après J.C. et traduction de Gilbert Lazare, Photo de Pierre Arnaud Chouvy 2010.

associée à un phénomène d'habituation ou tolérance, impliquant une prise de doses croissantes pour un effet constant dans le temps. Malgré ces inconvénients, la forte analgésie produite par la morphine encouragea le développement d'autres molécules opioïdes, menant à la synthèse de centaines de composés, dont l'héroïne en 1874 par Charles Robert Alder Wright. Tous ces composés présentent une signature structurale semblable, ce qui suggéra dès 1954 que leurs effets implique leur liaison sur des récepteurs (Beckett and Casy 1954). Trois récepteurs aux opioïdes, nommés mu, delta et kappa sont mis en évidence quelques années plus tard (voir 1.3. récepteurs aux opioïdes). Dès lors les efforts furent concentrés sur la synthèse de ligands capables d'activer de façon spécifique chacun de ces récepteurs, permettant ainsi une meilleure compréhension de leurs rôles respectifs au sein du système opioïde. A ce jour, il existe des ligands alcaloïdes ou peptidiques, spécifiques de chaque récepteur. On peut citer en exemple la [D-Ala², N-Me-Phe⁴, Gly-ol]-enkephaline (DAGO), peptide synthétisé en 1981 (Handa *et al.* 1981) activant sélectivement le récepteur mu, ou le U-50488, alcaloïde activant sélectivement le récepteur kappa (Vonvoigtlander *et al.* 1983). Les ligands du récepteur delta seront abordés plus en détail dans la partie 2 de cette introduction.

1.2.2 Ligands endogènes

L'existence de ligands opioïdes endogènes fut suggérée pour la première fois par des expériences montrant que la liaison de morphine radio-marquée sur du tissu riche en récepteurs opioïdes (iléon de cochon d'inde, membranes synaptiques ou homogénat de cerveau) est diminuée en présence d'extraits de cerveau (Pasternak *et al.* 1975; Terenius and Wahlstrom 1975). En 1975, Hughes et collaborateurs isolent et purifient depuis ces extraits deux peptides ayant des propriétés semblables à la morphine : il s'agit de la méthionine-enképhaline (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met) et de la leucine-enképhaline (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu) (Hughes *et al.* 1975). Depuis ces travaux, de nombreux peptides opioïdes endogènes ont été décrits, parmi lesquels la plupart contiennent l'enchaînement d'acides aminés Tyr-Gly-Gly-Phe, que l'on appelle « motif opioïde » (Akil *et al.* 1998). La pharmacologie, les voies de biosynthèse et de dégradation de ces peptides sont maintenant en partie connues (Figure 3).

Chez les mammifères, les peptides opioïdes sont produits à partir de trois précurseurs (Figure 3): proenképhaline (PENK), proopiomélanocortine (POMC) et prodynorphine (PDYN). Ces précurseurs sont clivés par différentes endopeptidases en différentes combinaisons de peptides actifs.







Fig 3. Précurseurs des peptides opioïdes endogènes. Représentation schématique des trois précurseurs opioïdes et des peptides qui en sont issus, et notamment des enképhalines, seules présentes dans les trois précurseurs. Abréviations : ACTH, hormone adrénocorticotropique ; LPH, lipotropine ; MSH, hormone stimulant les mélanocytes.

Le gène de la PENK code pour un prépropeptide de 267 acides aminés contenant six copies de met-enképhaline et une copie de leu-enképhaline (Rossier 1988). D'autres clivages peuvent aboutir à la formation d'un heptapeptide, d'un octapeptide, du peptide E ou du peptide F. La dégradation des enképhalines se fait par des aminopeptidases N (Irazusta *et al.* 2003) et des enképhalinases (Hersh 1984).

Le gène de la POMC code pour un précurseur de 267 acides aminés qui donne, après clivage, une copie de β -endorphine (Bloom *et al.* 1978), une copie d'adrénocorticotropine (ACTH) et plusieurs peptides stimulant les mélanocytes Stimulant les Mélanocytes α -MSH, β -MSH et γ -MSH). La β -endorphine [1-31] peut être clivée en β -endorphine [1-27], ou en γ -endorphine [1-17] et α -endorphine [1-16]. Ces deux derniers composés se lient aux récepteurs opioïdes avec une affinité plus faible que la β -endorphine (de Wied 1990). La dégradation par des peptidases est possible mais peu efficace, les endorphines sont majoritairement inactivées par acétylation (Deakin *et al.* 1980).

Le gène de la PDYN code pour un précurseur de 245 acides aminés, qui est clivé en Leuenképhaline, dynorphine A et dynorphine B. Ce précurseur est synthétisé dans le cerveau, en particulier dans l'hypophyse antérieure et postérieure où il subira des maturations différentes (Seizinger *et al.* 1984). La dégradation de la dynorphine se fait par l'action d'aminopeptidases.

Les trois peptides endogènes peuvent chacun activer les trois récepteurs. Cependant, les enképhalines et la β -endorphine ont une affinité moindre pour le récepteur kappa (Loh *et al.* 1976) (Figure 4) qui est activé plus spécifiquement par la dynorphine (Goldstein *et al.* 1979). Ces 3 opioïdes endogènes sont les principaux peptides issus des trois précurseurs, mais il existe en réalité une trentaine de variants.

Par ailleurs, la possibilité que la morphine soit un ligand endogène est actuellement débattue. En effet, sa présence dans le cerveau (Goumon and Stefano 2000; Laux *et al.* 2011) et sa voie de biosynthèse (Boettcher *et al.* 2005; Grobe *et al.* 2010) ont été caractérisées chez plusieurs mammifères dont la souris. Elle peut être sécrétée par les cellules chromaffines (Goumon *et al.* 2006) et les cellules immunitaires (Zhu *et al.* 2005), et le taux sérique de morphine endogène augmente chez l'homme après une intervention chirurgicale, jusqu'à une concentration suffisante pour activer le récepteur mu aux opioïdes (Brix-Christensen *et al.* 1997).

Pour conclure, il est intéressant de noter qu'à la différence des autres systèmes neuromodulateurs qui possèdent un ligand endogène pour plusieurs sous-types de récepteurs



Fig 4. Sélectivité de différents ligands opioïdes. Représentation schématique, illustrant les grandes différences de séléctivité existant entre diférents ligands opioïdes. Adapté de Williams et al. 2001.

(systèmes sérotoninergique, dopaminergique, ...), le système opioïde, lui, possède plusieurs ligands endogènes qui lient seulement trois récepteurs différents.

1.3. Récepteurs aux opioïdes

1.3.1 Historique

Dès les années 1950, plusieurs équipes suggèrent que l'action des opioïdes dépend de ses récepteurs. Cette hypothèse est basée sur l'importance cruciale de la structure des ligands (Beckett and Casy 1954), mais également sur l'existence d'un antagoniste : la nalorphine (Martin 1967). Ce composé ambivalent possède d'ailleurs à la fois une action antagoniste de la morphine et une action analgésique propre, qui suggèrent déjà l'existence de plusieurs types de récepteurs. Finalement, la démonstration de la présence de récepteurs aux opioïdes dans le cerveau se fait en 1973 par trois laboratoires qui mettent en évidence une liaison à haute affinité et saturable de ligands opioïdes radio-marqués dans une préparation de membranes de cerveaux de rat (Pert and Snyder 1973; Simon 1973; Terenius 1973). En 1975, une étude démontre l'existence de trois récepteurs aux opioïdes que distingue un profil pharmacologique différent en réponse à trois ligands distincts (à l'origine de la lettre grecque qui les identifie) : la morphine pour le récepteur mu, la ketocyclazocine pour kappa et le SKF-10047 pour sigma (Pert and Snyder 1973). Ce dernier possède en réalité une structure différente, et n'est pas sensible à la naloxone ; il a donc rapidement été déclassé des récepteurs aux opioïdes (Duncan and Wang 2005). En revanche, un autre récepteur est mis en évidence, présent en grandes quantités dans le canal déférent de la souris : il est nommé delta (Martin et al. 1976; Lord et al. 1977). Dans les années 1980, la découverte de ligands capables d'activer spécifiquement chaque récepteur permet leur caractérisation pharmacologique ainsi que l'étude de leur localisation dans l'organisme par autoradiographie. Finalement, le clonage du récepteur delta chez la souris (Evans et al. 1992; Kieffer et al. 1992), a permis, par homologie de séquence, l'identification puis le clonage des récepteurs mu et kappa murins (Raynor et al. 1996), mais également l'identification d'un « opioïd receptor like » (ORL).

N tern	ninale
mKOR	MESP IQIFRGDPGPTCSPSACLLP NSSSWFPNWAESDSNGSVGSEDQQLESAHISPAIPVI
mDOR	M ELVPS ARAELQSSPLV N L S D A FPS A FPS A G A S G A S A S S L A L A I A
mMOR	MDSSAGPGNISDCSDPLAPASCSPAPGSWL NLS HVDGNQSDPCGPNRTGLGGSHSLCPQTGSPS MVTAIT

IMALYSIVCVVGLFGNFLVMYVIVRYTKMKTATNIYIFNLALADALATSTLPFQSV ITALYSAVCAVGLLGNVLVMFGIVRYTKLKTATNIYIFNLALADALATSTLPFQSA ITAVYSVVFVVGLVGNSLVMFVIIRYTKMKTATNIYIFNLALADALVTTTMPFQSA Transmembranaire 1 / Transmembranaire 2					
NYLMGTWPFGNILCKIV KylmetwPfgellckav VylmnswPfgdvlck <u>iv</u> <i>E</i>	ISIDYYNMFTSIFTLCTMSVDF LSIDYYNMFTSIFTLTMMSVDF ISIDYYNMFTSIFTLTMMSVDF Transmembranaire 3	YIAVCHPVKALDFR YIAVCHPVKALDFR YIAVCHPVKALDFR /	IPRN ak IPAK ak IPLK ak		
IVNVCNWILSSAIGLPVI LINICIWVLASGVGVPII IINICIWLLASSVGISA	MFMATTKYRQGSIDCTLTFS MVMAVTQPRDGAVVCMLQFB IVLGGTKVREDVDVIECSLQFB	HPTW-YWENLLKICY SPSW-YWDTVTKICY DDEYSWWDLFMKICY	VFIFAFIMPVLIITVCYGLMIL VFLFAFVVPILIITVCYGLMLL VFVFAFVIPVLIIIVCYTLMIL		
Transmembranaire 4	E		Transmembranaire 5		
RLKSVRMLSGSKEKDRNLRRITRMVLVVVAVFIVCWTPIHIYVIIKALITIP-ETTFQTVS RLRSVRLLSGSKEKDRSLRRITRMVLVVVGAFVVCWAPIHIFVIVWTLVDINRDPLVVAA RLKSVRLLSGSREKDRNLRRITKLVLVVVAVFIICWTPIHIFILVEALGSTS-HSTAALSS / Transmembranaire 6 E					
WHFCIALGYTNSCLNPVLYAFLDENFKRCFREFCIPTSSTIEQQNSARIRQNTREHPSTANTVDRTNHQLENLEA LHLCIALGYANSSLNPVLYAFLDENFKRCFRQLCRTPCGRQEPGSLRRPRQATTRERVTACTPSDGPGG YYFCIALGYTNSSLNPVLYAFLDENFKRCFRDFCFPIKMRMERQSTNRVR-NTVQDPASMRDVGG Transmembranaire 7					
ETAPLP 398 GAAA 372					

MNKPV- 380

Fig 5. Homologie des séquences des trois récepteurs opioïdes murins. Alignement des séquences protéiques des trois récepteurs aux opioïdes. En gras : acides aminés identiques, soulignés : domaines transmembranaires, I : boucle intracellulaire, E : boucle extracellulaire.

1.3.2. Structure

Les gènes codant pour les récepteurs mu, delta et kappa sont oprm1, oprd1 et oprk1. Ils sont situés respectivement sur les chromosomes 10, 4, 1 chez la souris et sur les chromosomes 6, 1, 8 chez l'homme (Befort *et al.* 1994; Wang *et al.* 1994; Simonin *et al.* 1995). L'analyse de la séquence d'acides aminés des récepteurs aux opioïdes révèle 61% d'homologie entre les récepteurs mu, delta et kappa (Figure 5). La partie centrale des trois séquences contient sept domaines transmembranaires conservés (73 à 76% d'homologie), caractéristiques des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) (Chaturvedi *et al.* 2000; Surratt and Adams 2005).

Les RCPG représentent, chez les mammifères, la plus grande famille de récepteurs présents à la surface des cellules. En effet, ils sont codés par 3,4% du génome humain, ce qui représente plus de 900 gènes différents (Bockaert and Pin 1999). De par leur diversité, ils représentent une interface privilégiée entre la cellule et son environnement. Ils sont répartis en six classes (A à F) et peuvent être activés par différents stimuli : par la lumière, des odeurs, des hormones ou des neurotransmetteurs (Fredriksson and Schioth 2005). Les RCPG sont caractérisés par une structure conservée, comprenant :

- sept domaines transmembranaires, formés d'hélices α et reliés par 3 boucles intra- et
 3 boucles extracellulaires.
- une extrémité C terminale intracellulaire, site d'interaction avec les partenaires du récepteur, et notamment les protéines G.
- une extrémité N terminale extracellulaire, qui interagit avec les ligands et dont la taille varie selon les RCPG.

Les récepteurs aux opioïdes sont des RCPG de classe A (Fredriksson *et al.* 2003). Leur domaine N terminal, qui participe aux premières étapes de la liaison du ligand, est la partie présentant le plus de variation entre les récepteurs (9 à 10% d'homologie). Les sept parties transmembranaires participent à la liaison du ligand et sont importantes pour la transmission du signal entre les parties N et C terminales (Law *et al.* 1999). Enfin, la partie C terminale représente le site d'interaction avec les protéines G, qui dans le cas des récepteurs aux opioïdes sont de type inhibitrices. Ce domaine sert également à la modulation de l'activité du récepteur au travers des sites de phosphorylation par différentes kinases (voir 2.3.1) (Decaillot *et al.* 2003). La modulation de l'activité et du nombre de récepteurs après leur activation aiguë ou chronique a d'ailleurs été associée, au niveau physiologique, aux phénomènes de tolérance (Johnson *et al.* 2005). Mais outre ces mécanismes cellulaires de régulation, il faut

également prendre en compte le profil cytoarchitectonique de distribution des récepteurs et de leurs ligands pour comprendre l'action des opioïdes.

1.4. Distribution et rôle du système opioïde

Le système opioïde est présent essentiellement au niveau du système nerveux, et notamment au niveau du cerveau où il a été particulièrement étudié. Après une présentation succincte de la localisation du système opioïde en dehors du cerveau, nous décrirons donc plus spécifiquement la localisation et le rôle associés à la présence du système opioïde dans les différentes structures du cerveau.

1.4.1. Distribution du système opioïde en dehors du cerveau

En dehors du système nerveux, la présence des trois récepteurs aux opioïdes a été décrite au niveau des cellules immunitaires (Chuang *et al.* 1995; Gaveriaux *et al.* 1995). On trouve également les récepteurs delta et kappa au niveau d'endothéliums vasculaires (Stefano *et al.* 1998) et d'épithéliums intestinaux (Pol *et al.* 2003) et dermiques (Salemi *et al.* 2005). Au niveau du système nerveux périphérique les trois types de récepteurs sont présents dans la cochlée (Jongkamonwiwat *et al.* 2003), le tractus gastro-intestinal (Bagnol *et al.* 1997), les neurones sensoriels et les ganglions rachidiens (Stein and Lang 2009). Enfin, au niveau du système nerveux central, les trois types de récepteurs sont exprimés dans les couches superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière (Besse *et al.* 1991).

1.4.1. Distribution du système opioïde dans le cerveau

La distribution cérébrale des récepteurs et des ligands opioïdes a été déterminée grâce à des études d'immunohistochimie (Khachaturian *et al.* 1982; Khachaturian *et al.* 1983; Fallon and Leslie 1986; Mansour *et al.* 1995), d'autoradiographie (Mansour *et al.* 1987; Kitchen *et al.* 1997; Slowe *et al.* 1999) et d'hybridation in situ (Harlan *et al.* 1987; DePaoli *et al.* 1994 ; Mansour *et al.*

1994; Zastawny *et al.* 1994; Merchenthaler *et al.* 1997). Ces différentes études ont permis de dresser le profil de distribution du système opioïde présenté dans ce paragraphe (Figure 6).

Tout d'abord, les trois types de récepteurs aux opioïdes se retrouvent au niveau du cortex, des structures du système limbique et du tronc cérébral. En plus de ces structures, le récepteur mu est entre autre exprimé au niveau du thalamus, du striatum, de l'hippocampe, du locus coeruleus et du noyau du tractus solitaire. De même, le récepteur kappa est exprimé au niveau du noyau du tractus solitaire, mais aussi au niveau de l'aire tegmentale ventrale et surtout de l'hypothalamus. Le récepteur delta enfin est exprimé plus particulièrement au niveau du cortex, du tractus olfactif et de l'amygdale (basolatérale, corticale et médiane), ainsi que dans le striatum (noyau accumbens et caudé putamen), dans le globus pallidus, la bande diagonale, le septum et l'hippocampe.

La distribution des corps cellulaires et des terminaisons exprimant les peptides opioïdes endogènes recoupent largement les régions où les récepteurs sont exprimés. PENK est le précurseur le plus abondant et le plus largement distribué, on le trouve notamment dans le striatum et le globus pallidus. PDYN est particulièrement présent dans le noyau accumbens, mais aussi largement distribué dans tout le cerveau. POMC possède le profil le plus restreint puisqu'il est exprimé dans des neurones situés exclusivement au niveau de trois régions du cerveau : le noyau arqué de l'hypothalamus, le noyau du tractus solitaire et les lobes antérieurs et intermédiaires de l'hypophyse. Les projections de ces neurones couvrent également une zone restreinte, elles sont notamment absentes des structures corticales en dehors de l'amygdale (Le Merrer *et al.* 2009).

En conclusion les peptides endogènes et les récepteurs possèdent des profils d'expression qui concordent dans de nombreuses structures du cerveau, participant aux multiples fonctions du système opioïde.

1.4.2. Rôle du système opioïde

Historiquement, les fonctions associées à chaque récepteur ont d'abord été appréhendées au moyen d'études pharmacologiques utilisant des ligands plus ou moins sélectifs (Vaccarino and Kastin 2000), mais c'est la génération et l'étude des souris déficientes pour les gènes des



Fig 6. Répartition du système opioïde dans le cerveau murin. Schéma représentant le profil de distribution des proteines (en haut) et corps cellulaires (au milieu) exprimant les récepteurs aux opioïdes, ainsi que des corps cellulaires exprimant les peptides opioïdes endogènes (en bas). Liste des structures: Amb, noyau ambigü; AL, lobe anterieur pituitaire; AON, noyau olfactif anterieure; Arc, noyau arqué de l'hypothalamus; BLA, amygdale basolatérale; BNST, noyau de la stria terminalis; CeA, amygdale centrale; Cl, claustrum; CoA, amygdale corticale; CPu, caude putamen; CrbN, cervelet; DMH, hypothalamus dorsomedial; DMR, raphé dorsal et medial ; DTN, noyau tegmental dorsal; En, cortex endopiriform; Ent, cortex entorhinal; FrCx, cortex frontal; G/VP, globus pallidus/ventral pallidum; HPC, hippocampe; IL,gland pituitary intermediaire; IP, noyau interpedonculaire; LC, locus coeruleus; LH, hypothalamus lateral; LRN, noyau réticulaire latéral; Me, éminence médiane; MEA, amygdale médiane; MM, noyau mammillaires médial; MV, noyau vestibulaire medial; NAc, noyau accumbens; NL, glande pituitaire neuronale; NRGC, noyau reticulaire gigantocellulaire; NTS, noyau du tractus solitaire; OCx, cortex occipital ; PAG, substance périaqueductale grise; PCx, cortex parietal ; Pir, cortex pyriform; PN, noyau pédonculopontin; PnR, réticule pontin; POA, aire préoptique; PPTg, noyau pedunculopontin; PrS, presubiculum; PVN, hypothalamus paraventriculaire; RN, noyau rouge; RM, raphé magnus; SON, noyau supraoptique; SN, substance noire; SNT, noyau trigeminal; STN, noyau trigeminal spinal; TCx, cortex temporal; Th, thalamus; Tu, tubercule olfactif; Tz, noyau trapezoïde; VMH, hypothalamus ventromédial; VTA, aire tegmentale ventrale; ZI, zona incerta. Schéma repris de : Le Merrer et al. 2009.

récepteurs, qui ont réellement permis de mieux connaître le rôle de ce système (Kieffer and Gaveriaux-Ruff 2002).

1.4.2.1. Analgésie

Les souris déficientes pour les récepteurs mu, delta ou kappa présentent toutes une plus grande sensibilité à la douleur, confirmant une inhibition tonique de la réponse nociceptive impliquant les trois types de récepteurs. Des différences existent cependant sur le type de douleur dans lequel ils sont impliqués. L'activation du récepteur mu module plutôt la nociception mécanique (Fuchs *et al.* 1999) et chimique (Sora *et al.* 1999), ainsi que la partie supra-spinale de la nociception thermique (Sora *et al.* 1997; Qiu *et al.* 2000). Les récepteurs kappa modulent essentiellement la nociception viscérale (Simonin *et al.* 1998). Le récepteur delta, quant à lui, est impliqué dans la modulation des douleurs chroniques inflammatoires (Fraser *et al.* 2000; Qiu *et al.* 2000) et neuropathiques (Gaveriaux-Ruff *et al.* 2011), ainsi que dans les phénomènes de tolérance aux effets analgésiques de la morphine (Zhu *et al.* 1999).

1.4.2.2. Système de récompense

Dans les souris déficientes pour le récepteur mu l'effet récompensant de la morphine est totalement aboli (Matthes *et al.* 1996; Sora 2001). Le récepteur mu est également responsable des effets récompensants des drogues non opioïdes comme les cannabinoïdes (Ghozland *et al.* 2002) ou l'alcool (Roberts *et al.* 2000) ainsi que des renforçateurs naturels tels que les interactions sociales, la nourriture ou le sexe (Koob and Le Moal 1997). Ces récepteurs ont donc un rôle prépondérant dans le système de récompense, et leur activation par les drogues d'abus est à l'origine des comportements de dépendance (Ahmed *et al.* 2002; Gerrits *et al.* 2003). A l'opposé, l'activation des récepteurs kappa entraîne une dysphorie qui s'oppose vraisemblablement à l'activation des récepteurs mu pour réguler le tonus hédonique (Spanagel *et al.* 1992). Le rôle du récepteur delta dans les processus de renforcement est plus obscur. En effet, il est capable de moduler la préférence de place induite par la morphine, mais cet effet pourrait être dû à une perturbation de l'association entre drogue et contexte plus qu'à une réelle modulation de l'action hédonique des drogues (Le Merrer *et al.* 2011).

1.4.2.3. Réponses émotionnelles

Les études sur cet aspect du système opioïde sont assez récentes et montrent une implication opposée des récepteurs delta et mu, mais aussi une implication générale des 3 récepteurs et des peptides opioïdes endogènes. Par exemple les souris invalidées pour le récepteur delta présentent un caractère anxieux et dépressif, suggérant une modulation tonique positive de l'activation endogène de ce récepteur ainsi qu'une potentielle action antidépressive des agonistes delta (Filliol *et al.* 2000).

1.4.2.4. Mémoire

Les récepteurs mu sont impliqués dans les processus d'apprentissages et dans la mémoire (Jafari-Sabet and Jannat-Dastjerdi 2009), notamment par leur action au niveau de l'amygdale (McGaugh *et al.* 1993) et de l'hippocampe sur les mécanismes de potentialisation à long terme (Simmons and Chavkin 1996). Le récepteur delta, également présent dans cette structure, jouerait un rôle dans la mémoire spatiale (Robles *et al.* 2003) ainsi que dans les phénomènes d'association drogue-contexte (Shippenberg *et al.* 2009; Le Merrer *et al.* 2011) et la rechute liée au contexte (Ciccocioppo *et al.* 2002; Marinelli *et al.* 2009).

1.4.2.5. Autres effets

Les récepteurs aux opioïdes sont également impliqués dans le contrôle de la neurogénèse, du système immunitaire et des fonctions autonomes (Bodnar 2007). Le tonus respiratoire est modulé par les opioïdes et essentiellement par les récepteurs mu (Shook *et al.* 1990; Dahan *et al.* 2001). L'activité locomotrice est respectivement réduite, augmentée ou inchangée par l'activation des récepteurs mu, delta ou kappa (Matthes *et al.* 1996; Simonin *et al.* 1998; Filliol *et al.* 2000). Les opioïdes ont également une action sur la reproduction via l'expression des précurseurs opioïdes au niveau de l'hypophyse (Almeida *et al.* 1988).

En conclusion, les études pharmacologiques et les approches transgéniques d'invalidation de gènes codant pour différents récepteurs et peptides opioïdes ont permis de mieux cerner la contribution de chacun des trois récepteurs dans le système opioïde. Dans la deuxième partie de l'introduction, nous allons nous intéresser plus particulièrement au récepteur delta, et en particulier aux mécanismes cellulaires qui modulent son activité.

2. Récepteurs aux opioïdes delta

2.1. Ligands

2.1.1. Peptidiques

En plus des opioïdes endogènes, décrits précédemment, capables d'activer le récepteur delta, plusieurs peptides exogènes ont été caractérisés (Raynor *et al.* 1994; Toll *et al.* 1998) (Figure7).

La [D-Pen^{2,5}]Enkephaline (DPDPE), consiste en une version cyclique d'un analogue des enképhalines (Mosberg *et al.* 1983). Ce composé est un agoniste présentant une affinité au moins 100 fois plus grande pour le récepteur delta que pour le récepteur mu. Les deltorphines I et II sont des agonistes peptidiques extraits de la peau d'une grenouille d'Amérique du sud (*Phyllomedusa bicolor*). Ces peptides ne possèdent pas le motif opioïde classique mais un motif de type Tyr-D Ala–Phe-Asp(/Glu)-Val-Val-Gly-NH2, et ont une très bonne affinité et une très bonne sélectivité pour le récepteur delta (Figure 7) (Erspamer *et al.* 1989). Des antagonistes peptidiques sélectifs du récepteur delta ont également été synthétisés tels la Tic-deltorphine (Salvadori *et al.* 1999) ou TIPP[psi] (Schiller *et al.* 1993).

Deltorphine II Kd = 9,23 nM



DPDPE Kd = 31,7 nM



SNC 80 Ki = 1,73 nM



BW 373U86 Kd = 1,63 nM

Fig 7. Ligands du récepteur Delta. Constantes d'affinité pour le récepteur delta murin de quelques ligands prototypiques. (Bilsky et al. 1995).

2.1.2. Alcaloïdes

Des agonistes alcaloïdes sélectifs du récepteur delta ont également été décrits tel le SNC 80 (Calderon *et al.* 1994). Il présente une très bonne affinité pour le récepteur delta (Kd=1,73nM) associée à une grande sélectivité (Kd pour kappa=442 nM et mu=882nM) (Bilsky *et al.* 1995). Sa nature non peptidique lui permet d'être administré par voie systémique. Le BW 373U86 est un autre agoniste du récepteur delta, produit de dégradation du SNC 80, qui possède une affinité et une sélectivité comparable au SNC 80 pour le récepteur delta (Chang *et al.* 1993). L'AR-M1000390 est également un agoniste alcaloïde sélectif du récepteur delta (Wei *et al.* 2000), il est à noter qu'à la différence des deux précédents, il active le récepteur delta sans induire son internalisation (voir Introduction 2.3.2) (Marie *et al.* 2003). A côté des antagonistes alcaloïdes, un analogue présentant une meilleure sélectivité pour le récepteur delta a été décrit, le naltrindole (Portoghese *et al.* 1990).

2.2. Activation du récepteur par les ligands et signalisation intracellulaire

Les mutations du récepteur delta au niveau de différents acides aminés ont permis de mieux comprendre les déterminants structuraux jouant un rôle dans la liaison du ligand et la transduction du signal (Decaillot *et al.* 2003). Les boucles extracellulaires et l'extrémité N terminale jouent un rôle de filtre, déterminant la sélectivité de chaque récepteur pour ses ligands. Les sites de liaisons varient en fonction des ligands opioïdes mais sont tous situés entre les sept domaines transmembranaires (TM). La liaison d'un ligand déstabiliserait les 3^e, 6^e et 7^e TM, induisant un changement conformationnel du récepteur, propagé jusqu'aux boucles intracellulaires et l'extrémité C terminale, à l'origine du découplage entre le récepteur et une forme activée de la protéine G, première étape de la signalisation intracellulaire (Waldhoer *et al.* 2004).



Fig 8. Cascade de signalisation intracellulaire des récepteurs opioïdes initiée par l'activation de protéines G inhibitrices. Activation des récepteur delta aux opioïdes et, effet à court et long terme. Abréviations: AC, Adenylate cyclase ; AMPc, Adénosine mono-phophate cyclique ; ATP, Adénosine tri-phosphate ; DAG, diacylglycerol ; IP3, Inositol tri-phosphate ; MAPK, Protéine kinase activée par les facteurs mitogènes ; PI, Phosphatidyl-inositol ; PKA, Protéine kinase A ; PKC, Protéine Kinase C ; PLC, Phospholipase C.
2.2.1. Activation des protéines G

Les protéines G sont des hétérotrimères constitués d'une sous-unité $G\alpha$, et d'une sous-unité dimérique $G\beta/\gamma$. Il existe quatre familles de protéines $G\alpha$ selon la nature de leur interaction avec différents effecteurs : Gas, Gai/o, Gaq11, Ga12/13 (Hermans 2003). Les récepteurs aux opioïdes sont couplés aux protéines G de type $G\alpha_{i/0}$ et $G\alpha_z$ (Williams *et al.* 2001). Cette famille comprend 6 sous-unités $G\alpha$, 5 sous-unités $G\beta$ et 12 sous-unités $G\gamma$ différentes, offrant de nombreuses combinaisons et de nombreuses possibilités d'interactions. En utilisant une approche par spectroscopie de résonance plasmonique de surface, Alves et collaborateurs ont pu observer directement le couplage entre protéine G et récepteur aux opioïdes delta. Ce couplage dépend fortement de la nature du ligand lié au récepteur. Ainsi la liaison d'un agoniste augmente fortement l'affinité du récepteur pour la protéine G, alors que cette affinité est fortement diminuée en cas de liaison préalable d'un antagoniste. Enfin, l'absence de ligand favorise également la liaison avec la protéine G, mais vraisemblablement dans un état conformationnel différent, qui se traduit notamment par des différences d'affinité pour les différents types de protéines G (Alves et al. 2003). Une fois liée à un récepteur activé par un agoniste, la protéine G se retrouve dans une configuration qui favorise l'échange d'une molécule de guanosine diphosphate (GDP), portée par sa sous-unité $G\alpha$, par une molécule de guanosine triphosphate (GTP), entraînant ainsi la dissociation de l'hétérotrimère. G α d'une part et G β/γ de l'autre, peuvent alors interagir avec de nombreux effecteurs qui auront des effets à la fois à court et à long termes (Figure 8).

2.2.2. Les effecteurs

2.2.2.1 Inhibition de l'adenylate cyclase (AC) par $G\alpha i/o$

Gαi/o inhibe l'activité de l'AC, entraînant une baisse du niveau intracellulaire d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc). Ceci diminue l'activité de la protéine kinase AMPc dépendante (PKA), et donc la phosphorylation de ses différents substrats : canaux ioniques, facteurs de transcription et RCPG dont les récepteurs aux opioïdes eux-mêmes (voir Introduction, 2.3.1.1.). L'inhibition de l'AC a également un effet inhibiteur sur un canal potassique voltage dépendant activé par l'hyperpolarisation, à l'origine d'un courant appelé courant lh ou pacemaker.

Ce courant est normalement chargé de repolariser le neurone après une forte hyperpolarisation, permettant ainsi sa réactivation. L'inhibition de ce courant laisse donc le neurone dans un état hyperpolarisé (Ingram and Williams 1994; Svoboda and Lupica 1998). Enfin, l'inhibition de l'AC provoque une baisse de la libération vésiculaire PKA dépendante (Chieng and Williams 1998).

2.2.2.2. Modulation directe de canaux ioniques par GB/γ

Les sous-unités β et γ peuvent aller directement inhiber des conductances calciques et activer des conductances potassiques. Trois conductances potassiques différentes peuvent être activées :

- un courant potassique à rectification entrante activé par les protéines G (GIRK).
- un courant potassique dépendant du voltage.
- un courant potassique sensible au calcium.

L'activation de ces courants ont tous pour effet l'hyperpolarisation du neurone, et donc la diminution de son excitabilité (Twitchell and Rane 1993; Sodickson and Bean 1998; Madamba *et al.* 1999). L'inhibition des canaux calciques (N, P/Q, et T) résulte en une diminution de la libération de neurotransmetteurs. Cette inhibition de l'activité neuronale par la sous-unité Gβ via les canaux ioniques est quasi immédiate et couplée assez fidèlement à l'état d'activation du récepteur. Certaines études se basent d'ailleurs sur ce couplage pour étudier la cinétique d'activation du récepteur (Kovoor *et al.* 1998; Blanchet and Luscher 2002).

2.2.2.3. Potentialisation de l'activation de la phospholipase C (PLC)

Même si l'activation de la PLC est plutôt une caractéristique des protéines Gq, les agonistes delta peuvent stimuler la formation d'inositol tri-phosphate (IP3) et provoquer une augmentation de la concentration de Ca++ et l'activation de la protéine kinase C (PKC) dans certaines cellules (Jin *et al.* 1994; Smart *et al.* 1994). Cette augmentation serait due à G β et γ mais pourrait être conditionnée par une pré-activation de la PLC par des protéines de type Gq (Chan *et al.* 2000; Rhee 2001).

2.2.2.4. Activation de la voie des MAP kinases

Les protéines kinases activées par les signaux mitogènes (MAPK) et, en particulier les kinases régulées par les signaux extracellulaires (ERK1&2), peuvent être indirectement activées par G β et γ , par l'intermédiaire d'effecteurs comme la PKC, la phosphatidyl-inositol 3-kinase (Pi-3 kinase) et les protéines Ras-GRF (Williams *et al.* 2001). Ces MAPK vont ensuite à leur tour phosphoryler des facteurs de transcription, menant à l'expression de gènes tels que c-jun et c-fos, définissant ainsi les changements à long terme induits par l'activation des récepteurs opioïdes (Shoda *et al.* 2001; Bilecki *et al.* 2004; Martin-Kleiner *et al.* 2006).

2.2.3. Aspects dynamiques de l'activation du récepteur

Les RCPG dont la dynamique a été observée sont compartimentés dans la membrane plasmique de la cellule. Ces récepteurs ne sont pas immobiles, mais subissent des mouvements latéraux entraînant leur diffusion à longue distance ou leur confinement en un ou plusieurs types de domaines de tailles variables. Ces comportements dépendent du RCPG considéré, et définissent également la plupart du temps différentes populations pour un même récepteur (Cezanne *et al.* 2004; Baker *et al.* 2007). Peu d'études ont été menées sur le récepteur delta, mais dans le cas de récepteurs opioïdes μ humains exprimés dans des cellules de rein de rat (NRK), 90% sont localisés dans des domaines d'un rayon moyen de 150 nm (Daumas *et al.* 2003). L'ajout d'agonistes entraîne une diminution de la taille des domaines de confinement de certains récepteurs (neurokinine 1 et 2 : NK1-2) (Cezanne *et al.* 2004; Lill *et al.* 2005). Dans le cas du récepteur NK2, ces domaines co-localisent avec la β -arrestine, partenaire essentiel de la désensibilisation des RCPG.





Fig 9. Desensibilisation et internalisation du récepteur delta aux opioïdes. Représentation schématique, des partenaires impliqués dans la désensibilisation et l'internalisation du récepteur aux opioïdes delta. La liaison de l'agoniste au récepteur induit l'activation de protéines G. Les kinases associées aux RCPG (GRK) peuvent alors phosphoryler l'extrémité C terminale du récepteur empechant son interaction avec d'autres protéines G. Un ensemble de protéines est alors recruté et permet l'invagination de la membrane plasmique et l'internalisation des récepteurs en puits de clathrine. Abréviations : AP-2, protéine adaptatrice -2 ; GRK, Protéine kinase associée au récepteur couplé aux protéines G ; P, groupement phosphate.

2.3. Arrêt de la signalisation et trafic intracellulaire

2.3.1. Désensibilisation

Parallèlement à l'activation des protéines G par l'intermédiaire du récepteur, la liaison du ligand induit également une désensibilisation du signal. On parle de désensibilisation homologue si les récepteurs désensibilisés sont ceux activés par leurs agonistes, tandis que l'on qualifiera d'hétérologue une désensibilisation qui concerne d'autres récepteurs, partageant la même voie de signalisation. Dans un cas comme dans l'autre, la désensibilisation est initiée par la phosphorylation du récepteur (Figure 9). La phosphorylation d'un récepteur opioïde est montrée pour la première fois sur des récepteurs delta murins, exprimés dans des cellules embryonaires humaines normales de rein (HEK293), après application de DPDPE (Pei et al. 1995). La surexpression dans ces cellules de la protéine kinase associée aux RCPG de type 2 (GRK2) entraine une augmentation de la phosphorylation et de la désensibilisation du récepteur, alors que la surexpression d'une forme dominant-négative de GRK2 a l'effet opposé, montrant ainsi que la désensibilisation du récepteur delta dans ces conditions implique les GRK2. Dans le même système, il a été montré que cette phosphorylation a lieu au niveau de résidus thréonine ou sérine situés entre les positions 358 et 363 (Guo et al. 2000), empêchant l'activation de nouvelles protéines G par le récepteur. La phosphorylation des récepteurs aux opioïdes delta et mu a été associée à différentes kinases :

- des GRK (Law et al. 2000; Wang 2000).
- des kinases activées par des seconds messagers (PKA, PKC, proteines kinases dépendantes de la Ca⁺⁺/Calmoduline (CaMK)) (Xiang *et al.* 2001).

En plus de la phosphorylation elle-même, la liaison d'arrestine (1 ou 2) aux récepteurs phosphorylés est également impliquée dans ce phénomène. Les arrestines sont des protéines cytosoliques mises en évidence dans les photorécepteurs de la rétine (β -arrestine 1), où elles interagissent avec la rhodopsine pour arrêter la transmission du signal de ce GPCR (Filipek *et al.* 2003). Leur liaison au récepteur phosphorylé a été associée à une désensibilisation de la réponse des récepteurs mu et delta in vitro (Kovoor *et al.* 1997). Ce mécanisme de désensibilisation a pu être observé *in vivo* pour le récepteur mu, puisque chez des souris invalidées pour le gêne de la β -arrestine 2 l'injection chronique de morphine n'induit pas de désensibilisation (Bohn *et al.* 2000).

2.3.2. Internalisation

Après la phosphorylation et la liaison des β -arrestines, celles-ci vont induire l'internalisation du récepteur delta en puits de clathrines (Trapaidze *et al.* 1996; Gaudriault *et al.* 1997). Les clathrines recrutées par des protéines adaptatrices AP-2 permettent l'invagination de la membrane plasmique. La dynamine, une protéine kinase, est capable de fournir l'énergie nécessaire pour fermer cette invagination et ainsi créer une vésicule intracellulaire contenant les récepteurs (Herskovits *et al.* 1993; Ungewickell and Hinrichsen 2007; Mettlen *et al.* 2009; Parkar *et al.* 2009).

2.3.2.1. Influence de la phosphorylation sur l'internalisation du récepteur

Dans des neuroblastomes exprimant le récepteur delta humain de façon endogène (lignée SK-N-BE), l'internalisation est fortement réduite en présence d'héparine, un inhibiteur des GRK (Hasbi *et al.* 2000). Des études de mutagénèse dirigée en cellules HEK 293 ont montré une internalisation du récepteur delta de souris lors de la phosphorylation du récepteur par la PKC (résidu Serine 344) (Xiang *et al.* 2001) ou après activation par la deltorphine II (résidu Sérine 363) (Law *et al.* 2000). Dans le même système, un appauvrissement en site de phosphorylation encore plus drastique de l'extrémité C terminale du récepteur delta (remplacement des résidus Sérine et Thréonine par des résidus Alanine) empêche son internalisation (Whistler *et al.* 2001).

2.3.2.2. Rôle des β -arrestines dans le processus d'internalisation

En cellule HEK293, il a été montré que les β -arrestines 1 et 2 sont impliquées de façon différente dans deux types d'internalisation du récepteur delta. La première dépend de la phosphorylation, et implique les deux types d'arrestines, alors que la deuxième ne dépend pas de la phosphorylation du récepteur, implique la β -arrestine 2 uniquement et mène à la dégradation des récepteurs internalisés (Zhang *et al.* 2005).

2.3.3. Devenir post-endocytique du récepteur delta

Les RCPG internalisés par les clathrines peuvent être recyclés vers la membrane ou être dégradés (von Zastrow et al. 2003). En système hétérologue, il a été montré que le récepteur delta est dégradé par fusion des vésicules d'internalisation avec les lysosomes (Ko et al. 1999; Tsao and von Zastrow 2000). Le récepteur mu est quant à lui recyclé rapidement vers la membrane plasmique (Law et al. 2000; Tanowitz and von Zastrow 2003). GRK2 joue un rôle important dans ces phénomènes, puisque, dans des cellules HEK 293, la phosphorylation par GRK2 des récepteurs delta murins mène à la dégradation des récepteurs internalisés dans les lysosomes, alors que les récepteurs sont recyclés s'ils sont phosphorylés indépendamment de GRK2 (Zhang et al. 2008). Dans des neuroblastomes exprimant le récepteur aux opioïdes delta humain, Jauzac, Allouche et collaborateurs ont montrés des destins post-endocytiques différents pour les récepteurs selon qu'ils sont activés par un agoniste peptidique ou alcaloïde. Le SNC 80 produit une forte et rapide désensibilisation ainsi qu'une internalisation massive du récepteur, alors que la Leu- ou Met-enképhaline provoque une désensibilisation plus lente, et une internalisation partielle du récepteur. De plus, alors que les enképhalines induisent une resensibilisation et un recyclage du récepteur, l'application de SNC 80 se traduit par une dégradation des récepteurs en lysosomes (Marie et al. 2003; Lecoq et al. 2004; Marie et al. 2006). Le devenir post-endocytique du récepteur aux opioïdes delta *in vivo* sera présenté dans le chapitre suivant consacré à la souris knock-in Delta Opioid Receptor (DOR)-eGFP.

2.5. La souris DOR-eGFP

La génération d'une souris exprimant un RCPG couplé à une protéine fluorescente permet de connaître la localisation du récepteur en toutes circonstances, offrant des applications évidentes pour l'étude du trafic intracellulaire du récepteur mais également pour l'identification claire et sans ambiguïté des structures cérébrales et des types cellulaires exprimant le récepteur. Deux souris knock-in basées sur ce concept ont été générées à ce jour : la première exprime la rhodopsine humaine fusionnée à la protéine fluorescente verte améliorée (eGFP) mais conduit à une dégénération rapide de la rétine (Chan *et al.* 2004) ; la deuxième, générée dans notre laboratoire, exprime, en lieu et place du récepteur aux opioïdes delta, une protéine de fusion formée du récepteur natif et de l'eGFP (Scherrer *et al.* 2006) (Figure 10). L'eGFP est une protéine fluorescente dont la longueur d'onde d'excitation maximale est de 488nm (lumière bleue) et



Fig 10. La Souris knock-in DOR-eGFP. A. Schéma représentant la stratégie adoptée pour la construction de la souris DOR-eGFP. B. Photomicrographies en vue ventrale (en haut à gauche) et ventrale (en bas à gauche) montrant la fluorescence eGFP émise par un cerveau de souris sauvage (gauche) et DOR-eGFP (droite), distribution du signal DOR-eGFP dans une coupe coronale (en haut à droite) et sagitale (en bas à droite) de cerveau. C. Immunomarquage montrant le signal DOR-eGFP membranaire (vert) dans un interneurones GABAergique (marquage GABA en rouge). D. L'injection s.c. de SNC 80 10mg/kg induit l'internalisation de DOR-eGFP in vivo (à droite), l'injection de solution contrôle préserve la localisation membrannaire du récepteur (à gauche). (Scherrer et al. 2006).

dont la longueur d'onde d'émission maximale est de 510 nm (lumière verte) (Heim *et al.* 1995). Le récepteur fluorescent possède des propriétés de liaison du ligand semblables au récepteur natif. En effet, les affinités du naltrindole, du SNC 80, de la deltorphine II et de la metenképhaline sont identiques aux valeurs décrites pour le récepteur natif. De plus, le récepteur est pleinement fonctionnel, dans la mesure où des expériences de liaison au [35S]GTPγS ne montrent aucune différence par rapport au récepteur natif. Le récepteur fluorescent est exprimé à des taux physiologiques, sous le contrôle du promoteur endogène : en effet, les quantités d'ARN (mesurées par PCR quantitative) montrent que la fusion ne perturbe pas la transcription du gène codant pour le récepteur (Scherrer *et al.* 2006).

L'observation de cette souris permet effectivement la visualisation du récepteur delta à l'échelle cellulaire et subcellulaire. Il a ainsi pu être montré que l'essentiel des récepteurs est localisé à la membrane des neurones (Scherrer *et al.* 2006). Une internalisation rapide de DOReGFP est observée après une injection systémique de SNC 80 à 10 mg/kg, et une fois le récepteur internalisé, une deuxième injection de SNC 80 n'induit pas d'effet comportemental (hyperlocomotion et analgésie) (Pradhan *et al.* 2009). En revanche, si un agoniste n'induisant pas d'internalisation (AR-M1000390) est utilisé lors de la première injection, la souris est alors capable de répondre à une deuxième injection d'agoniste, soulignant le lien entre présence du récepteur à la membrane et efficacité de l'action des agonistes *in vivo* (Pradhan *et al.* 2010). 2 heures après l'activation du récepteur, le récepteur internalisé est dégradé dans les lysosomes, à la fois en cultures neuronales hippocampiques, striatales (Pradhan *et al.* 2009) et mésentériques de souris DOR-eGFP (Poole *et al.* 2011).

Une étude récente du laboratoire a pu mettre en évidence une internalisation en conditions physiologiques de DOR-eGFP dans des interneurones de l'hippocampe (plus précisément dans la région CA1, voir 3.1.). Cette internalisation a pu être induite en plaçant l'animal dans une situation comportementale (sevrage induit par le contexte) (Faget et al. non publié). Dans cette étude, une libération de met-enképhaline induit l'internalisation du récepteur selon un profil différent de celui observé après injection systémique d'agoniste, la différence majeure étant qu'il reste alors des récepteurs présents à la membrane. Cette étude est en accord avec d'autres études récentes, montrant l'implication de l'hippocampe dans les phénomènes d'association drogue-contexte (Shippenberg *et al.* 2009; Le Merrer *et al.* 2011) et de rechute liée au contexte (Ciccocioppo *et al.* 2002; Marinelli *et al.* 2009). Dans la troisième partie de l'introduction, je vais évoquer le rôle et l'organisation générale de l'hippocampe et en particulier la région CA1, puis passer en revue les connaissances actuelles sur la place qu'y occupe le système opioïde.

3. Hippocampe et système opioïde

3.1. Organisation générale de l'hippocampe

L'hippocampe est une structure remarquable du cerveau, décrite dès 1587 par Arantius, médecin anatomiste italien, qui compara la forme de cette structure cérébrale à celle de l'animal. L'hippocampe occupe la partie haute et interne du lobe temporal et s'enroule d'avant en arrière jusqu'à la partie postérieure et ventrale du corps calleux chez l'homme. Chez le rongeur, l'hippocampe est en position dorso-médiane pour sa partie antérieure et devient plus latéral dans sa partie postérieure, suivant ainsi l'axe septo-temporal. L'hippocampe est en fait un des éléments de la formation hippocampique, ensemble de structures de l'archeocortex, phylogénétiquement plus ancien. Cette formation hippocampique est constituée de deux grands feuillets cellulaires, repliés en U et imbriqués l'un dans l'autre. Le premier feuillet constitue le gyrus denté, le deuxième la corne d'Ammon (CA), subdivisée en quatre parties, numérotées de CA1 à CA4 (Lopes da Silva *et al.* 1990) (Figure 11).

Le gyrus denté reçoit les entrées de l'hippocampe, depuis le cortex entorhinal. Il est formé de trois couches : la couche moléculaire, composée essentiellement de dendrites, la couche granulaire, contenant les cellules principales et le hilus, contenant les cellules moussues et d'autres interneurones. La corne d'Ammon contient essentiellement des cellules pyramidales, ses quatre champs étant organisés de la façon suivante : CA1, situé à la sortie de l'hippocampe, suivi de CA2, une région de taille restreinte et peu étudiée. Viennent ensuite CA3, et CA4 qui se fond dans le hilus du gyrus denté. Tous ces champs sont divisés en sept couches cellulaires (Amaral and Witter 1989), définies selon qu'elles contiennent le soma, l'axone, ou les dendrites proximaux ou distaux des cellules pyramidales. De la plus externe à la plus interne, ces couches sont : l'alveus, le stratum oriens, le stratum pyramidale, le stratum lucidum (uniquement dans CA3), le stratum radiatum, le stratum lacunosum-moleculare et la fissure hippocampique.

L'hippocampe échange des informations avec de nombreuses structures cérébrales. Des afférences lui parviennent des cortex cingulaire, préfrontal et piriforme, du cortex entorhinal, mais également du septum, du thalamus, de l'hypothalamus, de l'amygdale, de la VTA et du tronc cérébral. En retour l'hippocampe projette vers le cortex, les corps mamillaires et le thalamus, l'hypothalamus, le septum et l'amygdale (Amaral and Witter 1989). Les connexions extrinsèques de l'hippocampe ne sont cependant pas uniformes tout au long de l'axe septo-temporal (Bast 2007). On distingue en particulier l'hippocampe dorsal, qui reçoit la majeure partie de

l'information visuelle et spatiale par l'intermédiaire du cortex entorhinal, et l'hippocampe ventral, d'où sont préférentiellement issues les connexions allant vers le cortex préfrontal et l'amygdale (Jay and Witter 1991; Verwer *et al.* 1997).

3.2. Cytoarchitectonique

Le réseau de la formation hippocampique fait partie des circuits cérébraux les mieux caractérisés (Amaral and Witter 1989). Ce circuit classiquement qualifié de trisynaptique est orienté transversalement à l'axe septo-temporal de l'hippocampe, et est constitué des éléments séquentiels suivants :

- les cellules principales de la couche II du cortex entorhinal envoient leurs axones formant le *faisceau perforant* jusqu'aux dendrites des cellules granulaires du gyrus denté. Une partie de ces fibres, issues de la couche III du cortex entorhinal, suit la fissure et projette essentiellement vers CA1, formant la voie temporo-ammonique.

- les cellules granulaires envoient leurs axones formant les *fibres moussues* vers les dendrites des cellules pyramidales de CA3.

- les cellules pyramidales de CA3 envoient leurs axones formant les *collatérales de Schaffer* vers les dendrites des cellules pyramidales de CA1.

Les cellules de CA1 vont projeter directement ou via le subiculum vers le cortex entorhinal ou vers d'autres structures du système limbique. Le faisceau perforant, les fibres moussues et les collatérales de Schaffer sont formés par les axones des cellules principales, dont le neurotransmetteur est le glutamate. Au niveau de chaque sous région, une variété d'interneurones sécrètent un neurotransmetteur inhibiteur, l'acide gamma amino-butyrique ou GABA. Ils représentent moins de 10 % du nombre total de neurones de l'hippocampe mais jouent un rôle essentiel dans le contrôle des oscillations rythmiques qui synchronisent la transmission excitatrice (Freund and Buzsaki 1996). A ce jour plus d'une trentaine d'interneurones différentes ont été décrits, ils sont caractérisés par des propriétés physiologiques différentes, des morphologies différentes, et des marqueurs spécifiques. L'activité des neurones excitateurs ou inhibiteurs est également régulée de manière plus subtile par des systèmes neuromodulateurs, notamment cholinergiques et monoaminergiques : sérotonine (venant des noyaux du raphé), noradrénaline (locus cœruleus), dopamine (aire tegmentale ventrale). Enfin,





Fig 12. ARN des récepteurs mu et delta dans la région CA1 de l'hippocampe. (Stumm et al. 2003)

d'autres modulateurs, lipidiques (cannabinoïdes) ou peptidiques (vasopressine, cholécystokinine, substance P et peptides opioïdes) sont libérés dans l'hippocampe, par des fibres de projections ou localement.

3.3. Organisation du système opioïde hippocampique

3.3.1. Distribution du récepteur delta

La présence de récepteurs aux opioïdes dans l'hippocampe est montrée dans un premier temps par des études d'autoradiographie (Goodman et al. 1980; Herkenham and Pert 1980). Plus tard, d'autres études, plus systématiques et utilisant des ligands sélectifs ont été menées (Kitchen et al. 1997; Slowe et al. 1999; Goody et al. 2002; Lesscher et al. 2003; Pradhan and Clarke 2005). Des études d'immunohistochimie montrent également leur présence dans l'hippocampe chez le rat, principalement dans des neurones gabaergiques, mais également au niveau de cellules pyramidales (Commons and Milner 1996; Commons and Milner 1997; Svoboda et al. 1999; Drake and Milner 2002). Concernant les peptides endogènes, la présence de met-, de leuenképhaline et de dynorphine est détectée, également par immunohistochimie chez le rat, dans des neurones de l'hippocampe (interneurones locaux et cellules granulaires du DG) ainsi que dans des projections (fibres moussues et faisceau perforant) (Sar et al. 1978; Gall et al. 1981). Ce schéma général est confirmé, encore chez le rat, par une étude examinant par double hybridation in situ, la co-localisation entre d'une part, les ARN des récepteurs aux opioïdes (mu et delta), ou de la PENK et, d'autre part, les ARN des principaux marqueurs de populations neuronales hippocampiques (Stumm et al. 2004). Cette étude montre la présence d'ARN codant pour les récepteurs mu et delta dans des populations d'interneurones distinctes, excepté pour les cellules en panier exprimant la parvalbumine, qui possèdent pour la plupart les ARN des deux types de récepteurs (Figure 12). Plus récemment au laboratoire, la souris DOR-eGFP a été utilisée pour observer la co-localisation entre les neurones exprimant le récepteur delta et les principaux marqueurs des interneurones GABAergiques (Erbs et al non publié). Cette étude montre que le récepteur delta est exprimé dans des interneurones localisés au niveau de la couche pyramidale, et exprimant la parvalbumine. Ces interneurones sont des cellules en panier (BC) ou des cellules chandelier (AAC) (Klausberger and Somogyi 2008), toutes deux étant des interneurones locaux, qui inhibent les cellules pyramidales respectivement au niveau du soma et des dendrites proximaux ou au niveau du segment initial de l'axone. DOR-eGFP est également exprimé dans CA1, dans des cellules exprimant la parvalbumine et la somatostatine appelées cellules oriens-lacunosum moleculare (O-LM), contactées localement par les cellules pyramidales et provoquant une inhibition récurrente au niveau des dendrites apicales des cellules pyramidales. Un quatrième type cellulaire possédant le récepteur delta, exprime également la somatostatine et la calbindine, il s'agit des cellules hippocampo-septales, qui projettent vers le septum et le subiculum.

En conclusion, la distribution du récepteur delta dans des interneurones inhibiteurs de l'hippocampe, et plus particulièrement dans la région CA1, suggère un rôle important dans la modulation de l'activité des cellules pyramidales.

3.3.1. Etudes électrophysiologiques

Dans les années 1970, le groupe de Liebeskind observa les propriétés épileptogènes d'injections intraventriculaires de morphine et d'enképhalines (Urca *et al.* 1977; Frenk *et al.* 1978). L'implication prédominante de l'hippocampe dans ce phénomène fut démontrée deux ans plus tard (Henriksen, 1979). Des études électrophysiologiques *in vivo* chez le rat montrèrent que l'application locale d'enképhaline entraîne une activation globale de l'hippocampe, à la différence de ce que l'on peut observer dans le cortex, le tronc cérébral, le noyau caudé et le thalamus (Nicoll *et al.* 1977). L'explication de ce phénomène vint deux ans plus tard. Zieglgänsberger et collègues, dès 1979, enregistrent simultanément l'activité extracellulaire de paires de neurones dans la région CA1, et découvrent que certaines cellules sont bien inhibées par l'application locale d'enképhaline alors que la majorité des cellules est activée. Ils extrapolent alors à partir de leurs résultats, un modèle visionnaire selon lequel l'élévation de l'activité des cellules pyramidales est due à une diminution de l'activité tonique inhibitrice des cellules en panier provoquée par les enképhalines (Zieglgansberger *et al.* 1979). Cet effet désinhibiteur des opioïdes dans l'hippocampe fut alors confirmé par plusieurs groupes (Dunwiddie *et al.* 1980; Gahwiler 1980; Lee *et al.* 1980; Nicoll *et al.* 1980).

Le développement des techniques d'électrophysiologie dans les années 1980 a permis de caractériser plus précisément l'origine de cette baisse d'inhibition, notamment au niveau de CA1. Ainsi, toujours chez le rat, des études ont montré que l'activation de récepteurs opioïdes par les enképhalines induit au niveau des interneurones une ouverture de canaux potassiques

(Madison and Nicoll 1988), associée à une hyperpolarisation et une diminution de libération de GABA (Swearengen and Chavkin 1989). D'autre part, l'utilisation de ligands plus sélectifs des récepteurs mu et delta a permis de mettre en évidence une différence importante entre les actions de ces deux récepteurs. La stimulation électrique des collatérales de Schaffer permet une activation synchronisée des interneurones de CA1, créant au niveau de chaque cellule pyramidale un événement inhibiteur géant appelé eIPSC (courrant post-synaptique inhibiteur évoqué). Cet eIPSC est réduit en présence d'agoniste du récepteur mu, mais pas en présence d'agoniste spécifique du récepteur delta (Lupica *et al.* 1992; Lupica 1995) ce qui suggère un rôle différent des deux types de récepteurs dans CA1.

Les opioïdes ont donc une action désinhibitrice dans l'hippocampe, au niveau d'interneurones ayant un rôle important dans la modulation des rythmes hippocampiques et notamment des rythmes thêta et gamma (Freund and Buzsaki 1996). *In vivo*, la morphine est d'ailleurs capable de réduire de façon drastique le rythme gamma hippocampique (Gulyas *et al.* 2010). Ces deux rythmes hippocampiques sont observés par exemple lors de phases de navigation dans l'espace ou d'apprentissage (Ang *et al.* 2005; Duzel *et al.* 2010).

3.4. Rôle de l'hippocampe et modulation dépendant du récepteur delta

Les premières pistes vers la compréhension du rôle de l'hippocampe ont été apportées 1953 par Dr. W. Scoville et de son célèbre patient H.M. (Henry Gustav Molaison) sur qui il pratiqua une ablation bilatérale partielle des lobes temporaux contenant l'hippocampe, afin de soulager ses crises d'épilepsie. Outre une amélioration de son état, les effets de cette ablation ont été une perte sélective de mémoire, notamment de la mémoire épisodique qui orienta la communauté scientifique à se focaliser sur les liens entre mémoire et hippocampe (Corkin 2002).

Depuis, différentes formes de mémoire ont été caractérisées (émotionnelle, procédurale, de reconnaissance, déclarative,...) et associées à plusieurs structures cérébrales (amygdale, striatum, corps mamillaires, cortex,...). De même l'hippocampe, en plus de son rôle dans la mémoire épisodique (Morris *et al.* 1982; Eichenbaum *et al.* 2007), a été associé au traitement des émotions (Barkus *et al.* 2010), à la régulation de la réponse au stress (Joels 2008) et à la recherche de drogue liée au contexte chez les rongeurs (Shippenberg *et al.* 2009; Le Merrer *et al.* 2011).

Relativement peu d'études se sont intéressées à l'action des récepteurs delta sur ces fonctions. Une étude a montré une augmentation de l'expression de l'ARNm codant pour ce récepteur chez des animaux ayant suivi un apprentissage dans une tâche impliquant la mémoire spatiale (Robles *et al.* 2003). De plus, comme mentionné précédemment, le récepteur delta dans l'hippocampe est impliqué dans les processus d'association drogue-contexte (Shippenberg *et al.* 2009; Le Merrer *et al.* 2011) et de rechute liée au contexte (Ciccocioppo *et al.* 2002; Marinelli *et al.* 2009).

T_{RAVAIL DE THESE}

La thématique principale du laboratoire porte sur la réponse adaptative des récepteurs aux opioïdes à l'usage abusif des drogues. Le récepteur delta étant exprimé dans l'hippocampe, siège de la mémoire épisodique, son implication dans les interactions entre drogue et contexte d'administration fait l'objet d'un intérêt croissant. Bien qu'identifiés de longue date, l'expression et le rôle de ces récepteurs dans les interneurones de l'hippocampe restent peu étudiés, tout comme la localisation et la fonction de ces derniers au sein des différents réseaux hippocampiques, en particulier le CA1.

La souris knock-in DOR-eGFP développée au laboratoire exprime, en lieu et place du récepteur delta natif, une version rendue fluorescente par couplage à son extrémité C terminale de la protéine verte fluorescente (eGFP). Cette souris est un excellent outil pour visualiser *in vivo* le récepteur avec une résolution subcellulaire et ainsi pallier le manque d'anticorps spécifiques.

Par ailleurs, la majorité des études portant sur le récepteur d ont été réalisées en systèmes hétérologues ou en cultures primaires de neurones. Si ces modèles ont permis de comprendre les mécanismes de base du fonctionnement de ce récepteur, ils ne prennent pas en compte la diversité des types neuronaux. De plus, la morphologie et la physiologie des neurones isolés sont vraisemblablement modifiées par rapport à la situation *in vivo*. Il apparaît donc primordial d'aborder l'étude de ce récepteur en réseau intégré afin d'appréhender l'activation et l'internalisation du récepteur d dans le contexte le plus physiologique possible.

Notre but est donc de conjuguer imagerie de fluorescence et enregistrement électrophysiologique en tranches aiguës pour appréhender la dynamique du récepteur en temps réel ainsi que son impact sur l'activité neuronale en particulier, en réponse à une stimulation physiologique.

Mon travail se découpe en trois parties : (1) une étude électrophysiologique visant à préciser l'organisation du réseau neuronal dans lequel ce récepteur est impliqué au sein de l'hippocampe; (2) le développement d'outils technologiques permettant de visualiser la réponse dynamique du récepteur à une stimulation par un agoniste dans un réseau neuronal intégré; (3) l'étude de l'expression du récepteur delta dans les cellules pyramidales de l'hippocampe.

Dans la première partie, j'ai mis au point et validé l'utilisation de tranches aiguës d'hippocampe de souris DOR-eGFP, pour l'étude de l'activation et de l'internalisation du récepteur delta. J'ai montré, par des expériences d'électrophysiologie, un recrutement différent des sous-populations neuronales exprimant les récepteurs m et d par les deux afférences excitatrices du CA1, les collatérales de Schaffer et la voie temporoammonique. J'ai également établi la proximité anatomique des fibres de la voie temporoammonique et des projections neuronales exprimant DOR-eGFP par traçage antérograde à partir du cortex entorhinal.

Ce travail est présenté sous forme d'un manuscrit en cours de soumission: « *Schaffer collateral and temporoammonic pathways differentially recruit mu and delta opioid receptor expressing interneurons in the mouse hippocampus.*" Xavier Rezaï, Brigitte Kieffer, Michel Roux, and Dominique Massotte.

La seconde partie de mon travail s'est intéressée à la dynamique en temps réel du récepteur d. En effet, l'application systémique d'un agoniste exogène *in vivo* induit un phénomène d'internalisation massive du récepteur conduisant à une déplétion totale de la membrane plasmique et prohibant toute réponse à une stimulation ultérieure. Ceci ne paraît pas compatible avec une activation physiologique par des peptides endogènes libérés localement au niveau synaptique. Je me suis donc intéressé à la réponse du récepteur d à une activation locale par un agoniste exogène. En particulier, j'ai cherché à établir de potentielles différences entre soma et dendrites. Pour ce faire, j'ai développé une approche associant visualisation en temps réel au microscope confocal et injection locale de ligand en tranche aiguë au niveau du neurone d'intérêt. J'ai ensuite comparé l'effet de la deltorphine II, peptide exogène et de la Metenképhaline, peptide opioïde endogène.

Dans la troisième partie, j'ai développé au laboratoire la culture organotypique à partir de tranches d'hippocampe de souris knock-in DOR-eGFP. Le but était de fournir une alternative aux tranches aiguës pour l'étude de la dynamique en temps réel de l'internalisation du récepteur delta. Ce système a été utilisé pour étudier la localisation pré- ou post-synaptique du récepteur delta aux niveau de la couche pyramidale de l'hippocampe.

Ce travail est présenté sous forme d'un manuscrit soumis: *« Mouse delta opioid receptors are located on presynaptic afferences to hippocampal pyramidal cells. »* Xavier Rezaï, Lauren faget, Ewa Bednareck, Yannick Schwab, Pico Caroni, Brigitte L. Kieffer, Dominique Massotte

Activation du récepteur aux opioïdes delta dans la région CA1: étude électrophysiologique

Ι

1. Introduction

La région CA1 de l'hippocampe est le dernier maillon de la boucle tri-synaptique et donc la dernière étape de modulation de l'information avant qu'elle ne quitte l'hippocampe. Pour cette raison, de nombreuses études voulant examiner le rôle de cette structure, se sont tournée en priorité sur la région CA1. Il en fut notamment ainsi des premières études s'intéressant à l'action epileptogène des opioïdes. Elles ont donc constitué les bases des connaissances actuelles sur l'effet désinhibiteur des opioïdes sur CA1. Ces études, pour la plupart en tranches aiguës d'hippocampe de rat, ont démontré que l'activation des récepteurs mu et delta, exprimés par des interneurones de CA1, entraine à la foi une hyperpolarisation et une diminution de la libération vésiculaire de GABA par les interneurones. Ceci se traduit par une diminution des évènements inhibiteurs reçus par les cellules pyramidales, et donc une désinhibition de CA1. Outre cette action commune aux récepteurs mu et delta, une différence majeure entre les actions de ces deux récepteurs dans CA1 a été mise en évidence par plusieurs équipes. En effet, l'évènement inhibiteur provoqué dans les cellules pyramidales par la stimulation de la collatérale de Schaffer (eIPSC) est réduit par les agonistes du récepteur mu mais pas par ceux du récepteur delta, suggérant l'existence d'une afférence différente pour les interneurones exprimant le récepteur delta.

Plus récemment, dans notre laboratoire, des études se sont intéressées à l'importance du récepteur delta et de la région CA1 dans les phénomènes d'association drogue – contexte. L'utilisation de la souris DOR-eGFP a notamment permis d'identifier clairement les sous populations d'interneurones exprimant le récepteur aux opioïde delta dans la région CA1. Parmi ces interneurones, une partie importante est représentée pas les BC, qui modulent étroitement l'activité des cellules pyramidales, et qui reçoivent entre autre, une afférence de la voie temporo-ammonique. Nous avons donc dans cette première partie, testé la validité de notre préparation de tranche aiguë hippocampique en comparant nos résultats avec les données de la littérature obtenue chez le rat. Nous avons également examiné l'éventualité d'un recrutement différent des sous population d'interneurones exprimant les récepteurs mu et delta par la collatérale de Schaffer et la voie temporo-ammonique.

2. Article

Schaffer collateral and temporoammonic pathways differentially recruit mu and delta opioid receptor expressing interneurons in the mouse hippocampus.

Xavier Rezaï, Brigitte L. Kieffer, Michel Roux*, and Dominique Massotte*

Department of Neurogenetics and Translational Medicine, IGBMC, Illkirch,

France

these authors contributed equally to the scientific supervision of the work

Corresponding authors:

Dominique Massotte Translational medicine and neurogenetics Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC) CNRS/INSERM/UdS 1 Rue Laurent Fries BP10142 F-67404 Illkirch cedex France Telephone: +33 3 88 65 56 25 Fax: +33 3 88 65 56 04 Email: massotte@igbmc.fr

Michel Roux Translational medicine and neurogenetics Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC) CNRS/INSERM/UdS 1 Rue Laurent Fries BP10142 F-67404 Illkirch cedex France Telephone: +33 3 88 65 56 16 Fax: +33 3 88 65 56 04 Email: mjroux@igbmc.fr

Abstract

The opioid system is involved in learning and memory processes with mu and delta opioid receptors as modulators of the hippocampal activity. Most studies targeted unspecifically both receptors or specifically the mu receptor as it is the mediator of morphine effects on memory. To better understand the role of delta opioid receptor expressing neurons, we investigated their integration within the mouse CA1 network using DOR-eGFP knock-in mice that express the delta opioid receptor in fusion with the green fluorescent protein. Direct visualization of delta opioid receptor distribution with subcellular resolution uncovered spontaneous internalization during acute hippocampal slice preparation. The latter could be prevented by substituting sodium chloride with choline chloride or potassium-gluconate but not by the opioid antagonist naloxone. Therefore, data suggest that the neuronal depolarization occurring during slice preparation leads to endogenous opioid peptide release. Whole cell patch-clamp recording of pyramidal cells showed that, though both mu and delta receptor control spontaneous GABAergic inhibition received by these neurons, only mu receptor activation decreases the feedforward inhibitory input activated by Schaffer collateral stimulation. We also evidenced for the first time that both presynaptic mu and delta opioid receptors mediated disinhibition of pyramidal cell activity upon stimulation of the temporoammonic pathway. In addition, anterograde tracing by injection of biotinylated dextran amine in the entorhinal cortex indicated close vicinity in the CA1 stratum lacunosum-moleculare between temporoammonic afferences and neuronal processes from delta expressing interneurons. Altogether, our data point to a distinct modulatory role of the hippocampal network activity by mu and delta opioid receptors.

Introduction

Three opioid receptors mu, delta and kappa have been identified that belong to the superfamily of G protein-coupled receptors (GPCR). Together with the endogenous opioid peptides, they form a neuromodulatory system that plays a major role in the control of nociceptive pathways and autonomic functions but also modulates affective behavior and neuroendocrine physiology (Kieffer and Evans 2009). Mu opioid receptors are also involved in learning and memory processes (McQuiston 2008; Jafari-Sabet and Jannat-Dastjerdi 2009) and mediate morphine effects on memory-related behaviors (Zhu *et al.*; Olmstead and Franklin 1997). On the other hand, growing evidence indicate that delta opioid receptors are involved in spatial memory (Robles *et al.* 2003) as well as drug-context associations (Shippenberg *et al.* 2009; Le Merrer *et al.* 2010) or context-induced reinstatement to drug seeking (Ciccocioppo *et al.* 2002; Marinelli *et al.* 2009). All these data point to a crucial role of mu and delta opioid receptors as modulators of the hippocampal activity.

In rodents, immunohistochemical (Bausch *et al.* 1995; Commons and Milner 1996; Commons and Milner 1997; Kalyuzhny and Wessendorf 1997; Drake and Milner 2002), *in situ* hybridization (Stumm *et al.* 2004) and electrophysiological (Lupica 1995; Svoboda *et al.* 1999) data evidenced that mu and delta opioid receptors are expressed in hippocampal GABAergic interneurons including chandelier and basket cells. Recently, delta opioid receptor fine mapping was performed in the hippocampus using knock-in mice expressing the delta opioid receptor in fusion with the enhanced green fluorescent protein (DOR-eGFP) (Erbs *et al.* unpublished). This knock-in mouse has also been successfully used to visualize receptor subcellular distribution under basal conditions and to evaluate receptor internalization in response to pharmacological stimulations (Scherrer *et al.* 2006; Pradhan *et al.* 2010).

Since opioid receptors are coupled to inhibitory G proteins, their activation results in an overall disinhibition of the hippocampal network activity by reducing the GABAergic inhibitory tone exerted on principal cells under basal conditions (Lupica *et al.* 1992; Svoboda *et al.* 1999). In rats, application of mu or delta opioid agonists indeed decreases spontaneous, action potential dependent, GABA release from interneurons in the CA1. However, only mu but not delta receptor activation decreases the GABAergic feed-forward inhibition activated upon Schaffer pathway stimulation (Lupica *et al.* 1992; Lupica 1995). This suggests that the neuronal populations expressing mu and delta opioid receptors are differently integrated within the CA1 network where the delta population would be contacted by afferences distinct from the Schaffer collaterals. The latter could belong to the temporoammonic pathway (TA), another major entry to the CA1. The TA pathway originates in the entorhinal cortical layer III and targets pyramidal cell dendrites in the CA1 stratum lacunosum-

moleculare (Heinemann *et al.* 2000). Interestingly, these afferences also contact interneurons of the chandelier and basket cell types (Kiss *et al.* 1996).

In this study, we examined recruitment of mu and delta opioid receptor expressing neurons by the Schaffer collaterals and the temporoammonic pathway in DOR-eGFP knock-in mice. For this purpose, we combined electrophysiological recording of CA1 pyramidal cells, anterograde tracing of the TA and direct visualization of delta opioid receptor subcellular localization.

Material and methods

Animals

DOR-eGFP knock-in mice (n=33) expressing the delta opioid receptor fused to a green fluorescent protein were generated by homologous recombination. In these mice, the eGFP cDNA preceded by a five amino acid linker (G-S-I-A-T) was introduced into exon 3 of the delta opioid receptor gene, in frame and 5' from the stop codon as described previously (Scherrer *et al.* 2006). Wild type animals (n =8) or mice deficient for the delta opioid receptor (DOR-KO) (n=5) (Filliol *et al.* 2000) were used as control. The genetic background of all mice was C57/BL6J;129svPas (50:50 %). Mice were housed in a temperature- and humidity-controlled animal facility (21±2°C, 45±5% humidity) on a 12 h dark-light cycle with food and water *ad libitum*. Male and female mice aged 8 to 12 weeks were used in all protocols. All experiments were performed in accordance with the European Communities Council Directive of 26 May 2010 and approved by the local ethical committee (Com'Eth 2010-003).

Chemicals compounds

Naltrexone, bicuculline methiodide and MK-801 were purchased from Sigma-aldrich, (Steinheim, Germany). QX-314 and SNC 80 were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Alexa Fluor 568 was purchased from Invitrogen (Eugene, Oregon, USA).

Acute hippocampal slice preparation

Animals were killed by cervical dislocation and brains were quickly removed and placed into « slicing ice-cold artificial cerebrospinal fluid (saCSF) », Different solutions were tested (for buffer composition see Table 1). Solutions were bubbled with $95\%O_2/5\%CO_2$. The brain was cut transversally to separate the right and left hemispheres that were mounted on the platform of a Vibratome (Leica VT1000S) with cyanoacrylate glue, covered in ice-cold oxygenated saCSF. Sections (300μ m thick) were cut in the coronal plane or the horizontal plane for experiments respectively involving Schaffer collaterals or temporoammonic pathway stimulation. Immediately after sectioning, hippocampal slices were incubated for 30 min (10 min of K⁺-gluconate protocol) at 34°C. Then, slices were allowed to recover at room temperature for 1h before being used for electrophysiology. The two incubations were made in oxygenated aCSF (for composition, see Table 1). For experiments in the presence of an opioid antagonist, naltrexone 100 mg/kg was injected intra-peritoneally 30 minutes

before sacrificing the animal. All downstream manipulations were done in solutions containing 10 μ M naltrexone.

Imaging of acute hippocampal slice

Slices were fixed for imaging after slicing or after 1h incubation at room temperature (RT, 20-25°C) by overnight incubation in 4% paraformaldehyde in 0.1 M PBS, pH 7.3. Slices were then washed three times in 0.1 M PBS, pH 7.3 for 10 min and mounted in Mowiol with DAPI.

Electrophysiological recordings

All experiments were conducted on neurons located in the pyramidal cell layer of the hippocampal CA1 region. Slices were observed under infrared Nomarski optics using a 63x water immersion (NA 0.9) objective and a Hamamatsu C8484 camera mounted on a Leica DMLFSA microscope. In the patch setup, the slice was continuously perfused with bubbled classical aCSF at 2 ml min⁻¹ and drugs (500 nM Deltorphin II, 500 nM DAGO) were added through bath application.

Whole-cell voltage clamp recordings of cell body membrane currents (holding potential 10 mV, corresponding to the reversal of non selective cationic currents) were made using patch electrodes (4-6 M Ω) pulled from GC150TF borosilicate glass capillaries (Sutter Instruments) on a horizontal puller (DMZ Universal Puller, Zeitz Instrumente, Munich, Germany) and filled with intracellular solutions containing the following (in mM: 140 Cesium Methanesulfonate, 10 HEPES, 1 CaCl₂, 3 MgSO₄, 3 ATP-Na₂, 0.5 GTP-Na₃, 10 EGTA, 5 QX-314 (Voltage dependant Na⁺ channels blocker), 0.07 AlexaFluor 568, osmolarity 318 mOsm/L, and pH adjusted to 7.3 with CsOH). Series resistance was not compensated and was ranged between 15 and 40 M Ω , the junction potential was 14 mV (calculated with the spreadsheet available at http://www.medicine.nevada.edu/physio/fackenyon.html) and was compensated online. Spontaneous and evoked IPSCs were acquired using a Multiclamp 700A amplifier, a Digidata 1322A interface and the pCLAMP9 software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Spontaneous IPSCs were filtered (1 kHz low-pass filter) and sampled at 2 kHz for later off-line analysis (pClamp). Events were automatically detected by a sliding-template algorithm and then manually checked off-line. Events were counted to construct time plots of the IPSCs frequencies and amplitudes; histograms were made by averaging event frequency during the last six minutes of baseline, drug and washout periods. Post-synaptic currents were evoked by unipolar tungsten microelectrodes (0.5 M Ω), connected to a constant current isolated stimulator (DS3, Digitimer ltd., Hertfordshire, England) and placed either between CA1 and CA2 area in the stratum radiatum for Schaffer collateral stimulation, or in horizontal slices, at the subiculum level, in the stratum lacunosum moleculare for temporoammonic pathway stimulation.

Immunohistochemistry

Slices fixed in 4% paraformaldehyde in phosphate buffer 0.1 M pH 7.3 (PB) were washed with PB and incubated for 1h in the blocking solution (PB containing 5% normal goat serum and 0. 5% Triton X100). Incubation with a rabbit polyclonal anti GFP antibody (A-6455, Invitrogen) diluted at 1:2000 in blocking buffer was performed overnight at 4°C. Following 3 washes with PB containing 0.5% Triton X100 (PBT), slices were incubated for 2h at RT with the goat anti rabbit secondary antibody conjugated with the AlexaFluor 488 (A-11034, Molecular Probes) diluted at 1:2000 in PBT. They were then washed three times in PBT and, mounted in Mowiol containing 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (0.5 mg/ml).

Anterograde tracing

Projections from the entorhinal cortex to the dorsal hippocampus were investigated using anterograde tracing. 0.2M potassium acetate containing 4% Biotinylated Dextran Amine (BDA; D1956, Invitrogen) was unilaterally delivered into the layer III of the entorhinal cortex (stereotaxic coordinates : latero-median, bregma + 4.1mm ; antero-posterior, bregma -3mm ; dorso-ventral, bregma + 5.2) using a glass micropipette (tip diameter: 10–30 μ m) and iontophoretically injected (4 μ A current, 7 seconds ON / 7 seconds OFF during 20 minutes, Midgard source, Stoelting). After ejection, the micropipette was left in place for 10 minutes before removal. Two to 15 days days later, animals were sacrificed and perfused with 10 mL PB followed by 50 mL of 4% paraformaldehyde in PB. Brains were then removed and postfixed in 4% paraformaldehyde in PB overnight before being cut with a vibratome (Leica VT1000S) in 60 μ m slices. BDA was revealed by immunofluorescence. Briefly, slices were washed with PB, incubated for 2h at room temperature in PBT with AlexaFluor 594 conjugated streptavidin (S32356, Invitrogen) diluted at 1:2000. They were then washed three times in PBT and, mounted in Mowiol containing DAPI (0.5 mg/ml).

Image acquisition

Samples were observed with a confocal microscope (SP2, Leica) using an argon laser and a 40x (NA: 1.25) oil objective and images were acquired with the LCS (Leica) software.

Statistical analysis

Student t-tests with Bonferroni corrections were performed using sigma plot v 11 (Systat Software Inc).

Results

Delta opioid receptor subcellular localization during hippocampal slice preparation.

Using DOR-eGFP knock-in mice, we previously showed that *in vivo* delta opioid receptors are localized at the plasma membrane in the basal state (Scherrer *et al.* 2006). Its subcellular distribution is then modified upon activation by an agonist leading to its intracellular sequestration (Scherrer *et al.* 2006). Imaging hippocampal slices immediately after slicing by fluorescence microscopy confirmed DOR-eGFP localization at the cell surface (Figure 1A). However, following slice recovery in an aCSF classically used for electrophysiological recordings (Lupica 1995), most DOR-eGFP fluorescence was detected intracellularly at the time of recording (Figure 1A). This is a likely consequence from endogenous opioid peptide release induced by the slicing process (see discussion).

Different protocols were then tested to preserve delta receptor plasma membrane localization. We first examined whether addition of the opioid antagonist naltrexone would be sufficient to prevent receptor internalization. Animals were pretreated with a naltrexone injection (100 mg/kg i.p.) and all steps, including slicing and incubations, were performed in the presence of the antagonist (10 μ M). Unfortunately, this approach proved inefficient to maintain the receptor at the plasma membrane (Figure 1A).

Opioid receptors are internalized via clathrin-coated pit vesicles, a process that can be disrupted by addition of high sucrose concentrations (Heuser and Anderson 1989; Minnis *et al.* 2003; Lecoq *et al.* 2004). We thus attempted to block the sequestration process by adding sucrose at all steps of the slice preparation. Low concentrations (75 mM) were inefficient whereas high concentrations (150 and 220 mM), though preserving cell surface localization, deeply affected neuronal survival when slices were returned to classical aCSF (not shown). Indeed, in the presence of sucrose 150 mM, although DOR-eGFP fluorescence was retained at the cell surface (Figure 1A), whole cell patch clamp recording of CA1 pyramidal cells revealed extremely low sIPSC frequency (2.0 \pm 0.8 Hz, n=4) compared to slices prepared in classical conditions (6.1 \pm 1.5 Hz, n=4) (Figure 1B).

We then turned to a strategy in which the electrical activity in the slice would be temporally decreased. We first substituted sodium chloride by choline-chloride a frequent substitution option (Chitwood and Jaffe 1998)). This protocol efficiently prevented DOR-eGFP internalization (Figure 1A). The calculated sIPSC frequency (14.2 ± 0.3 Hz, n=5) though higher than in classical conditions (6.1 ± 1.5 Hz, n=4) (Figure 1B), was an underestimation of the actual frequency: many small fast events could not be accurately sorted, which prevented to quantify the effect of opioid receptor antagonists (supplementary figure 2). In a second attempt, sodium chloride was replaced by potassium-gluconate (Dugue *et al.* 2009). This protocol also preserved DOR-eGFP fluorescent signal

at the plasma membrane (Figure 1A) and resulted in high and stable sIPSC frequency (10.4 ± 1.5 Hz, n=11) (Figure 1B). Since it prevented receptor internalization in the absence of pharmacological stimulation and yielded electrical properties comparable to previously published ones (Glykys and Mody 2007; Jones and Baraban 2007), this protocol was then chosen for all subsequent experiments.

The Schaffer collateral pathway recruits mu but not delta opioid receptor expressing interneurons.

Within the classical trisynaptic loop, axons from the CA3 pyramidal cells densely project to the CA1 forming the so-called Schaffer collaterals ((Speed and Dobrunz 2009) and references therein). To assess this activity, whole cell patch clamp was used to record the sIPSCs at the level of CA1 pyramidal cells. sIPSC basal frequencies were not significantly different between DOR-eGFP (12.8 \pm 2.6 Hz, n=7), wild type (11.1 \pm 0.3 Hz, n=4) and DOR knock-out mice (10.4 \pm 1.8 Hz, n=5) (not shown). This indicated no effect from deletion or mutation of the delta opioid receptor on basal electrical properties of the hippocampus. Application of the selective delta agonist deltorphin II (500 nM) decreased the baseline sIPSC frequency by 49.5 % \pm 11.7 in DOR-eGFP mice (n=7) and by 38.4 % \pm 7.0 in wild type mice (n=4) without changing it in DOR knockout mice (*non significant* 8.0 % \pm 13.6 *increase*, n=5) (Figure 2A). A similar reduction was observed following application of the selective mu agonist DAMGO (500 nM) on DOR-eGFP and wild type animals (pooled, 43.9 % \pm 6.4, n=4 wild type, n=4 DOR-eGFP (Figure 2A). Data are in good agreement with previously published results in rats (Lupica *et al.* 1992; Lupica 1995).

We then measured evoked inhibitory post-synaptic currents (eIPSC) in response to a stimulation of the Schaffer collaterals. This produced a large and stable eIPSC in the recorded CA1 pyramidal cells. Application of the mu opioid receptor selective agonist DAGO (500 nM) decreased its amplitude by $37.3 \pm 5.1 \%$, (n=8) as expected if mu receptor expressing neurons are recruited to exert a feed-forward inhibition on pyramidal neurons (Figure 2B). However, the delta opioid receptor selective agonist deltorphin II (500 nM) failed to induce a significant decrease in eIPSC amplitude in either DOR-eGFP (19.7 \pm 9.8 %, n=7), wild-type (10.1 \pm 11.1 %, n=4) or DOR knock-out mice (10.4 \pm 4.6 %, n=5), most of this decrease not being reversible upon deltorphin removal (Figure 2B). This again emphasizes that none of the genetic modification (knock-in or knock-out of DOR) has any impact on the electrophysiological properties. Our data therefore suggest that in mice mu but not delta opioid receptor expressing neurons are recruited by the Schaffer collaterals.
The temporoammonic pathway recruits both mu and delta opioid receptor expressing interneurons.

Recent evidence point to the implication of the temporoammonic pathway in spatial memory (Ito and Schuman 2011) as well as a role for opioid receptors with special emphasis on delta receptor (Robles et al. 2003; Shippenberg et al. 2009; Le Merrer et al. 2010). To the best of our knowledge, however, no information is available regarding a possible recruitment of opioid receptor expressing neurons by the temporoammonic pathway though mu opioid receptors modulate integration of Schaffer collaterals and temporoammonic signals in the CA1 (McQuiston 2011). On the other hand, opioid receptors are expressed in baskets cells (Bausch et al. 1995; Stumm et al. 2004)(Erbs et al. unpublished) that could receive inputs from the temporoammonic pathway (Kiss et al. 1996) but no direct neuronatomical connectivity has been demonstrated so far. We thus took advantage of the DOReGFP knock-in mouse to address the possibility that neurons expressing delta opioid receptors receive afferences from the temporoammonic pathway and performed anterograde tracing experiments by injecting biotinylated dextran amine (BDA) in the entorhinal cortex. As expected, a lot of the BDA associated fluorescence was found in the dentate gyrus where most of layer II pyramidal cells from the entorhinal cortex project (Figure 3A). In addition, fluorescent projections were also identified at the level of the CA1 stratum lacunosum-moleculare where the temporoammonic pathway is known to project (Figure 3B). Co-localization by confocal microscopy of DOR-eGFP with BDA associated fluorescence in this layer revealed that temporoammonic fibers are located in the close vicinity of DOR-eGFP expressing neurites, strongly suggesting that synaptic contacts can occur (Figure 3C-F).

Functional interactions were then explored by performing whole cell patch clamp recording of pyramidal cells in horizontal acute slices. Application of the mu opioid receptor selective agonist DAGO (500 nM) decreased eIPSC amplitude by $57.9 \pm 1.6\%$ (n=3) and application of the delta selective agonist deltorphin II (500 nM) by $60.5 \pm 6.6\%$ (n=6) (Figure 2C). However, in the latter case, the effect on evoked IPSCs could not be washed. Both agonists were also efficient to decrease sIPSC frequency in these horizontal slices (data not shown). Altogether, data suggest that both mu and delta opioid receptor expressing interneurons are recruited by the temporoammonic pathway. In addition, data show that both types of receptors exert presynaptic modulation on principal cell activity.

Discussion

In this study, we examined mu and delta opioid receptor modulation of the Schaffer collaterals and the temporoammonic pathway in the mouse CA1 area by a combination of electrophysiology and fluorescence confocal microscopy.

Direct visualization of the delta opioid receptor subcellular localization using DOR-eGFP knock-in mice has enabled, for the first time, to uncover its spontaneous internalization during mouse hippocampal slice preparation. Receptor internalization was most likely induced by endogenous opioid peptide release during slice preparation. Indeed, receptor internalization is a follow up of its activation since agonist binding induces conformational changes that trigger a cascade of downstream events promoting receptor intracellular sequestration (Cahill *et al.* 2007). Slicing may increase endogenous peptide extracellular concentration by cutting through opioidergic neurons. Alternatively, the partial ischemia and ensuing depolarization and Ca^{2+} entry occurring during slicing can promote direct or indirect neuropeptide release. Three different strategies were compared for their ability to inhibit spontaneous receptor internalization. The first one aimed at preventing receptor activation by adding an antagonist during preparation. The second was designed to block internalization via clathrin-coated pits by increasing the osmolarity of the external medium. The third intended to transiently decrease the electrical activity of the slice by substituting sodium chloride.

Naltrexone is an antagonist with a nanomolar affinity comparable to opioid peptides. Its administration before the animal was sacrificed together with its addition throughout all preparation steps proved however inefficient to maintain the receptor at the cell surface. This result indicates that the presence of the antagonist could not prevent receptor activation. Ligand binding being a dynamic process, this can be readily explained by a competition between the antagonist and the endogenous peptides for the binding site.

The second strategy aimed at slowing down the internalization process per se. Opioid receptor sequestration via clathrin-coated pit vesicles is disrupted in the presence of high sucrose concentrations in neuroblastoma cell lines (Lecoq *et al.* 2004) or neuronal cultures (Minnis *et al.* 2003). Under our conditions, high sucrose concentration (150, 220 mM), though preserving DOR-eGFP cell surface localization, deeply affected neuron viability. At 150 mM sucrose, global interneurons firing rate in the slice was very low, as witnessed by recording of pyramidal sIPSC, and neuron swelling prevented prolonged recordings. Altogether, sucrose addition proved deleterious to the neuron physiology.

Sodium chloride substitution during preparation indeed reduced the deleterious effect of slice preparation-induced ischemia in the slice. Replacement with choline chloride efficiently prevented receptor internalization but induced many small fast sIPSC, which hampered a precise quantification of their frequency. On the other hand, substitution of sodium chloride by potassium gluconate appeared as the best option. This protocol was originally designed to slightly hyperpolarize neurons from the cerebellum by loading them with potassium during the slicing to preserve them from excitotoxicity (Dugue *et al.* 2009). In our hands, it prevented delta opioid receptor internalization in the hippocampus and did not alter cellular morphology or electrophysiological properties.

Despite growing interest for the implication of opioid receptors in learning and memory processes and, more specifically, in modifications taking place upon drug intake (Kelley 2004; Hyman *et al.* 2006), few electrophysiological data are available to address the role of delta opioid receptors within the hippocampal network. Intriguingly, stimulation of the Schaffer collaterals in rat recruited mu opioid receptor expressing neurons but not those expressing delta opioid receptors (Lupica *et al.* 1992; Lupica 1995). This finding suggested that the two types of receptors are differentially distributed within the neuronal network. Here, we confirmed in mice distinct involvement of mu and delta receptor positive neurons upon SC stimulation. We also evidenced that delta and mu opioid receptor expressing neurons, on the opposite, are both recruited by the TA pathway.

The dorsal hippocampus has long been recognized as a key structure in episodic memory, in particular, its contextual representation (Burgess 2008; Rudy 2009). Within this structure, the CA1 area acts as an integrator of information (Martin and Clark 2007; Ito and Schuman 2011) and references therein). CA1 pyramidal cells receive two major excitatory afferences from the perforant pathway: the Schaffer collaterals (SC) and the temporoammonic pathway (TA) (Remondes and Schuman 2002). Both SC and TA pathways contribute to the control of the theta rythmic oscillations in the hippocampal network (Ang *et al.* 2005). Theta rhythms are oscillatory field potentials at frequencies ranging from 4-10 Hz (Ang *et al.* 2005; Klausberger and Somogyi 2008) that are important during exploratory behavior (Duzel *et al.*) and also serve as a reference for information encoding in hippocampal place cells (Ang *et al.* 2005).

The intrahippocampal trisynaptic loop originates in layer II pyramidal cells of the entorhinal cortex. It constitutes a unidirectional route that conveys information from the dentate gyrus to the CA3 via mossy fibers and then to the CA1 through the Schaffer collaterals (Speed and Dobrunz 2009) and references therein). The TA pathway, on the other hand, is a branch of the perforant pathway that directly connects pyramidal cells from the entorhinal cortex layer III to the CA1 by projecting on pyramidal cells but also on interneurons of the stratum lacunosum-moleculare and basket cells (Kiss *et al.* 1996). The TA pathway corresponds the second extrahippocampal entry to the CA1 (Maccaferri and McBain 1995). On the contrary to SC, the TA forms a loop with excitatory connections projecting

back to the entorhinal cortex mostly on layers IV-V (Heinemann *et al.* 2000; Witter *et al.* 2000). This entry has been much studied in the context of epilepsy (for a review see (Avoli *et al.* 2002)) and, more recently, was shown to play a role in long-term memory consolidation (Remondes and Schuman 2002) and spatial representation processes (Ito and Schuman 2011). Indeed, hippocampal place cells are elements contributing to spatial navigation and fire in response to self-location of the animal within the tridimensional context. Importantly, their firing reflect the integration of convergent input from entorhinal grid cells that map the spatial environment (Hafting *et al.* 2005). The TA pathway has been shown to convey this information directly to the CA1 (Brun *et al.* 2002). Recently, by selective lesioning in the medial entorhinal cortex layer III, TA requirement for precise spatial firing in the CA1 place cell population was also evidenced (Brun *et al.* 2008).

The TA excitatory pathway innervates both pyramidal cells and inhibitory interneurons. The small EPSPs generated by direct contact to the principal cells are largely blunted by the IPSPs resulting from the activation of GABAergic neurons so that a net global inhibition of the pyramidal cells is observed preventing firing of action protentials (Empson and Heinemann 1995). In addition, the TA inhibition of the excitatory input of SC also leads to reduced CA1 cell firing (Empson and Heinemann 1995). Activation of mu opioid receptors has been shown to drastically modulate the TA inhibition exerted on SC input during theta rhythms (McQuiston 2011). Mu opioid receptors are essentially located on GABAergic interneurons and their activation facilitates excitatory postsynaptic potentials in all layers of the CA1 by presynaptic inhibition of GABA release (McQuiston and Saggau 2003). According to this scheme, modulation of postsynaptic GABA_B receptor activity by the TA produces SC inhibition in the CA1 (Dvorak-Carbone and Schuman 1999). However, neuromodulation of the TA by delta opioid receptors is still unexplored.

Physiologically, endogenous opioid release, susceptible to modulate SC and TA inputs can come from local or projecting interneurons. Interestingly, the TA pathway is sensitive to naloxone (Heinemann *et al.* 2000) and at least some of its fibers are enkephalinergic (McGinty *et al.* 1986{Kanamatsu, 1986 #2378). On the other hand, opioid receptors are present in GABAergic interneurons including basket and chandelier cells (Bausch *et al.* 1995; Drake and Milner 2002; Stumm *et al.* 2004). In addition, we showed here, by anterograde tracing, that TA projections are located in the close vicinity of DOR-eGFP neurons. All this indicates that postsynaptic opioid receptors located on inhibitory interneurons can be directly activated by enkephalins released upon TA stimulation. This, however, does not exclude activation by local opioid peptide release since enkephalins are also expressed by calretinin positive interneurons (Somogyi and Klausberger 2005).

The role of the opioid system as a modulator of the CA1 network firing rate should be considered in relation with the impact of opiate drugs on memory processes. Indeed, morphine administration leads to mu opioid receptor desensibilisation that prevents further activation by agonists (Bailey and Connor 2005). As a consequence, delta receptors become the main responder to activation by endogenous opioids in the CA1. Their selective recruitment by the TA but not SC pathways would favor a general decrease of the CA1 activity that may impair memory processing. Interestingly, recent findings indicated that chronic morphine administration resulted in decreased delta opioid receptor expression in the CA1 that persisted after protracted abstinence (Erbs *et al.* unpublished). These changes may affect the inhibitory control exerted by delta receptors on the TA input and, may give light to the implication of hippocampal delta receptors in context-induced drug seeking observed in mice chronically treated with morphine (Shippenberg *et al.* 2009; Le Merrer *et al.* 2010) or alcohol (Ciccocioppo *et al.* 2002; Marinelli *et al.* 2009). Also, recruitment of delta opioid receptors upon TA simulation opens new perspectives to selectively manipulate the TA input as well as its modulation of the SC pathway during theta oscillations. Further studies are now needed to explore these hypotheses in more details and to correlate electrophysiological recordings with animal behavior.

Acknowledgements

We would like to thank Dr P. Veinante (INCI, Strasbourg) for excellent advice regarding anterograde tracing, Dr. T. Gallopin (ESPCI, Paris) for advising the Choline Cl slice preparation and Dr. S. Dieudonné (IBENS, Paris) for sharing the details of the K-gluconate slice preparation. We are grateful to NIDA for supporting the Center for Opioid Receptors and Drugs of Abuse (#DA 005010). We also acknowledge funding from ANR, CNRS, INSERM and University Strasbourg.

References

- Ang CW, Carlson GC, Coulter DA. 2005. Hippocampal CA1 circuitry dynamically gates direct cortical inputs preferentially at theta frequencies. J Neurosci 25(42):9567-9580.
- Avoli M, D'Antuono M, Louvel J, Kohling R, Biagini G, Pumain R, D'Arcangelo G, Tancredi V. 2002. Network and pharmacological mechanisms leading to epileptiform synchronization in the limbic system in vitro. Prog Neurobiol 68(3):167-207.
- Bailey CP, Connor M. 2005. Opioids: cellular mechanisms of tolerance and physical dependence. Curr Opin Pharmacol 5(1):60-68.
- Bausch SB, Patterson TA, Appleyard SM, Chavkin C. 1995. Immunocytochemical localization of delta opioid receptors in mouse brain. J Chem Neuroanat 8(3):175-189.
- Brun VH, Otnass MK, Molden S, Steffenach HA, Witter MP, Moser MB, Moser EI. 2002. Place cells and place recognition maintained by direct entorhinal-hippocampal circuitry. Science 296(5576):2243-2246.
- Brun VH, Solstad T, Kjelstrup KB, Fyhn M, Witter MP, Moser EI, Moser MB. 2008. Progressive increase in grid scale from dorsal to ventral medial entorhinal cortex. Hippocampus 18(12):1200-1212.
- Burgess N. 2008. Spatial cognition and the brain. Ann N Y Acad Sci 1124:77-97.
- Cahill CM, Holdridge SV, Morinville A. 2007. Trafficking of delta-opioid receptors and other G-protein-coupled receptors: implications for pain and analgesia. Trends Pharmacol Sci 28(1):23-31.
- Chitwood RA, Jaffe DB. 1998. Calcium-dependent spike-frequency accommodation in hippocampal CA3 nonpyramidal neurons. J Neurophysiol 80(2):983-988.
- Ciccocioppo R, Martin-Fardon R, Weiss F. 2002. Effect of selective blockade of mu(1) or delta opioid receptors on reinstatement of alcohol-seeking behavior by drug-associated stimuli in rats. Neuropsychopharmacology 27(3):391-399.
- Commons KG, Milner TA. 1996. Cellular and subcellular localization of delta opioid receptor immunoreactivity in the rat dentate gyrus. Brain Res 738(2):181-195.
- Commons KG, Milner TA. 1997. Localization of delta opioid receptor immunoreactivity in interneurons and pyramidal cells in the rat hippocampus. J Comp Neurol 381(3):373-387.
- Drake CT, Milner TA. 2002. Mu opioid receptors are in discrete hippocampal interneuron subpopulations. Hippocampus 12(2):119-136.
- Dugue GP, Brunel N, Hakim V, Schwartz E, Chat M, Levesque M, Courtemanche R, Lena C, Dieudonne S. 2009. Electrical coupling mediates tunable low-frequency oscillations and resonance in the cerebellar Golgi cell network. Neuron 61(1):126-139.
- Duzel E, Penny WD, Burgess N. Brain oscillations and memory. Curr Opin Neurobiol 20(2):143-149.

- Dvorak-Carbone H, Schuman EM. 1999. Long-term depression of temporoammonic-CA1 hippocampal synaptic transmission. J Neurophysiol 81(3):1036-1044.
- Empson RM, Heinemann U. 1995. The perforant path projection to hippocampal area CA1 in the rat hippocampal-entorhinal cortex combined slice. J Physiol 484 (Pt 3):707-720.
- Filliol D, Ghozland S, Chluba J, Martin M, Matthes HW, Simonin F, Befort K, Gaveriaux-Ruff C, Dierich A, LeMeur M, Valverde O, Maldonado R, Kieffer BL. 2000. Mice deficient for delta- and mu-opioid receptors exhibit opposing alterations of emotional responses. Nat Genet 25(2):195-200.
- Glykys J, Mody I. 2007. The main source of ambient GABA responsible for tonic inhibition in the mouse hippocampus. J Physiol 582(Pt 3):1163-1178.
- Hafting T, Fyhn M, Molden S, Moser MB, Moser EI. 2005. Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. Nature 436(7052):801-806.
- Heinemann U, Schmitz D, Eder C, Gloveli T. 2000. Properties of entorhinal cortex projection cells to the hippocampal formation. Ann N Y Acad Sci 911:112-126.
- Heuser JE, Anderson RG. 1989. Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation. J Cell Biol 108(2):389-400.
- Hyman SE, Malenka RC, Nestler EJ. 2006. Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. Annu Rev Neurosci 29:565-598.
- Ito HT, Schuman EM. 2011. Functional division of hippocampal area CA1 via modulatory gating of entorhinal cortical inputs. Hippocampus.
- Jafari-Sabet M, Jannat-Dastjerdi I. 2009. Muscimol state-dependent memory: involvement of dorsal hippocampal mu-opioid receptors. Behav Brain Res 202(1):5-10.
- Jones DL, Baraban SC. 2007. Characterization of inhibitory circuits in the malformed hippocampus of Lis1 mutant mice. J Neurophysiol 98(5):2737-2746.
- Kalyuzhny AE, Wessendorf MW. 1997. CNS GABA neurons express the mu-opioid receptor: immunocytochemical studies. Neuroreport 8(15):3367-3372.
- Kelley AE. 2004. Memory and addiction: shared neural circuitry and molecular mechanisms. Neuron 44(1):161-179.
- Kieffer BL, Evans CJ. 2009. Opioid receptors: from binding sites to visible molecules in vivo. Neuropharmacology 56 Suppl 1:205-212.
- Kiss J, Buzsaki G, Morrow JS, Glantz SB, Leranth C. 1996. Entorhinal cortical innervation of parvalbumin-containing neurons (Basket and Chandelier cells) in the rat Ammon's horn. Hippocampus 6(3):239-246.
- Klausberger T, Somogyi P. 2008. Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. Science 321(5885):53-57.
- Le Merrer J, Plaza-Zabala A, Boca CD, Matifas A, Maldonado R, Kieffer BL. 2010. Deletion of the delta Opioid Receptor Gene Impairs Place Conditioning But Preserves Morphine Reinforcement. Biol Psychiatry.

- Lecoq I, Marie N, Jauzac P, Allouche S. 2004. Different regulation of human delta-opioid receptors by SNC-80 [(+)-4-[(alphaR)-alpha-((2S,5R)-4-allyl-2,5-dimethyl-1-piperazinyl)-3-meth oxybenzyl]-N,N-diethylbenzamide] and endogenous enkephalins. J Pharmacol Exp Ther 310(2):666-677.
- Lupica CR. 1995. Delta and mu enkephalins inhibit spontaneous GABA-mediated IPSCs via a cyclic AMP-independent mechanism in the rat hippocampus. J Neurosci 15(1 Pt 2):737-749.
- Lupica CR, Proctor WR, Dunwiddie TV. 1992. Dissociation of mu and delta opioid receptor-mediated reductions in evoked and spontaneous synaptic inhibition in the rat hippocampus in vitro. Brain Res 593(2):226-238.
- Maccaferri G, McBain CJ. 1995. Passive propagation of LTD to stratum oriens-alveus inhibitory neurons modulates the temporoammonic input to the hippocampal CA1 region. Neuron 15(1):137-145.
- Marinelli PW, Funk D, Harding S, Li Z, Juzytsch W, Le AD. 2009. Roles of opioid receptor subtypes in mediating alcoholseeking induced by discrete cues and context. Eur J Neurosci 30(4):671-678.
- Martin SJ, Clark RE. 2007. The rodent hippocampus and spatial memory: from synapses to systems. Cell Mol Life Sci 64(4):401-431.
- McGinty JF, Kanamatsu T, Obie J, Dyer RS, Mitchell CL, Hong JS. 1986. Amygdaloid kindling increases enkephalin-like immunoreactivity but decreases dynorphin-A-like immunoreactivity in rat hippocampus. Neurosci Lett 71(1):31-36.
- McQuiston AR. 2008. Layer selective presynaptic modulation of excitatory inputs to hippocampal cornu Ammon 1 by muopioid receptor activation. Neuroscience 151(1):209-221.
- McQuiston AR. 2011. Mu opioid receptor activation normalizes temporo-ammonic pathway driven inhibition in hippocampal CA1. Neuropharmacology 60(2-3):472-479.
- McQuiston AR, Saggau P. 2003. Mu-opioid receptors facilitate the propagation of excitatory activity in rat hippocampal area CA1 by disinhibition of all anatomical layers. J Neurophysiol 90(3):1936-1948.
- Minnis JG, Patierno S, Kohlmeier SE, Brecha NC, Tonini M, Sternini C. 2003. Ligand-induced mu opioid receptor endocytosis and recycling in enteric neurons. Neuroscience 119(1):33-42.
- Olmstead MC, Franklin KB. 1997. The development of a conditioned place preference to morphine: effects of microinjections into various CNS sites. Behav Neurosci 111(6):1324-1334.
- Pradhan AA, Becker JA, Scherrer G, Tryoen-Toth P, Filliol D, Matifas A, Massotte D, Gaveriaux-Ruff C, Kieffer BL. 2009. In vivo delta opioid receptor internalization controls behavioral effects of agonists. PLoS ONE 4(5):e5425.
- Pradhan AA, Walwyn W, Nozaki C, Filliol D, Erbs E, Matifas A, Evans C, Kieffer BL. 2010. Ligand-directed trafficking of the delta-opioid receptor in vivo: two paths toward analgesic tolerance. J Neurosci 30(49):16459-16468.
- Remondes M, Schuman EM. 2002. Direct cortical input modulates plasticity and spiking in CA1 pyramidal neurons. Nature 416(6882):736-740.
- Robles Y, Vivas-Mejia PE, Ortiz-Zuazaga HG, Felix J, Ramos X, Pena de Ortiz S. 2003. Hippocampal gene expression profiling in spatial discrimination learning. Neurobiol Learn Mem 80(1):80-95.
- Rudy JW. 2009. Context representations, context functions, and the parahippocampal-hippocampal system. Learn Mem 16(10):573-585.

- Scherrer G, Tryoen-Toth P, Filliol D, Matifas A, Laustriat D, Cao YQ, Basbaum AI, Dierich A, Vonesh JL, Gaveriaux-Ruff C, Kieffer BL. 2006. Knockin mice expressing fluorescent delta-opioid receptors uncover G protein-coupled receptor dynamics in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A 103(25):9691-9696.
- Shippenberg TS, Chefer VI, Thompson AC. 2009. Delta-opioid receptor antagonists prevent sensitization to the conditioned rewarding effects of morphine. Biol Psychiatry 65(2):169-174.
- Somogyi P, Klausberger T. 2005. Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. J Physiol 562(Pt 1):9-26.
- Speed HE, Dobrunz LE. 2009. Developmental changes in short-term facilitation are opposite at temporoammonic synapses compared to Schaffer collateral synapses onto CA1 pyramidal cells. Hippocampus 19(2):187-204.
- Stumm RK, Zhou C, Schulz S, Hollt V. 2004. Neuronal types expressing mu- and delta-opioid receptor mRNA in the rat hippocampal formation. J Comp Neurol 469(1):107-118.
- Svoboda KR, Adams CE, Lupica CR. 1999. Opioid receptor subtype expression defines morphologically distinct classes of hippocampal interneurons. J Neurosci 19(1):85-95.
- Witter MP, Wouterlood FG, Naber PA, Van Haeften T. 2000. Anatomical organization of the parahippocampal-hippocampal network. Ann N Y Acad Sci 911:1-24.
- Zhu F, Yan CX, Zhao Y, Zhao Y, Li PP, Li SB. Effects of pre-training morphine on spatial memory acquisition and retrieval in mice. Physiol Behav 104(5):754-760.

Figure legends

Figure 1: Influence of acute slice preparation protocols on receptor subcellular localization and basal interneuron activity in the CA1 area.

A: Representative confocal images showing DOR-eGFP membrane localization after slicing (upper panels) and DOR-eGFP subcellular distribution before electrophysiological recordings (lower panels). DOR-eGFP localization at the plasma membrane is preserved in the presence of sucrose 150 mM (sucrose) or upon sodium chloride substitution by choline chloride (choline-Cl⁻) or potassium gluconate (K⁺ gluconate) but not in the presence of the antagonist naltrexone 10 μ M. Scale bars 10 μ m.

B: Effect of the coronal slice preparation protocol on the frequency of spontaneous inhibitory postsynaptic currents (sIPSCs). Preparation in acsf (classical, n=4), in the presence of 150mM sucrose (sucrose, n=4), upon sodium chloride substitution by choline chloride (choline- Cl^- , n=5) or potassium gluconate (K⁺ gluconate, n=11). Recording in horizontal slices prepared by substituting sodium chloride with potassium gluconate (K⁺ gluconate horizontal slice, n=8) is also included.

Figure 2: Mu and delta opioid receptors are differently recruited by the Schaffer collateral and temporoammonic pathways.

A: Spontaneous inhibitory post-synaptic currents (sPISCs) are reduced by the selective delta agonist deltorphin II 500nM in wild type, DOR-eGFP knock-in but not in delta opioid receptor deficient mice (on the left). sIPSCs are also reduced by the selective mu agonist DAGO 500nM in wild type mice (on the right)

B: Schaffer collateral evoked inhibitory post-synaptic currents (eIPSCs) are not decreased by deltorphin II 500 nM in wild type, DOR-eGFP and delta opioid receptor deficient mice (on the left). This current is howver decreased by DAGO 500 nM in wild type mice (on the right). C. Temporoammonic eIPSCs are decreased by both deltorphin II 500 nM and DAGO 500 nM in DOR-eGFP knock-in mice.

Figure 3: The temporoammonic pathway comes in close vicinity to DOR-eGFP expressing neurites in the CA1 stratum lacunosum-moleculare. Representative confocal images of hippocampal slices

showing DOR-eGFP (green) and anterograde tracing with BDA along the temporoammonic pathway detected by immunohistochemistry with AlexaFluor 594 conjugated streptavidin (red).

A. General view of a coronal slice showing the tracer injection point in the entorhinal cortex and the fibers of the perforant path reaching the dentate gyrus and the CA1 region.

B. Detail of the CA1 area showing the projections from the temporoammonic pathway (red) in the stratum lacunosum moleculare.

C. Temporaommonic pathway fibers (red) and DOR-eGFP expressing neurites (green) are detected in the stratum lacunosum-moleculare. D, E, F: representative confocal images showing close vicinity (arrowheads) between temporaommonic pathway fibers (red) and DOR-eGFP expressing neurites (green).Scale bars 100 μ m (A, B) and 10 μ m (C, D, E, F).

Supplementary figure 1: Composition of the different aCSF tested. Consentration are given in mM.

Supplementary figure 2: High sIPSC frequency after Choline-Cl⁻ slice preparation. Representative trace showing sIPSC amplitude as a function of time, recorded at a CA1 pyramidal cell level, during baseline, Deltorphine II 500nM and washout. Scale bars: 70pA/600ms

Fig 1



Fig 2







Supp Fig 1

	Classical		Naltrexone (NTX)		Sucrose		Choline-Cl		K ⁺ -Gluconate	
Dissection	NaCl	126	NaCl	124	NaCl	40	Choline-Cl	110	K-Glu	130,221
& slicing	KCl	2,5	KCl	2,7	KCl	1,5	KCl	2,5	KCl	14,62
C-CEE	MgCl2	2,7	MgSO4	1,3	MgCl2	7	MgCl2	7	EGTA	2
Sacsr	NaH2PO4	1,2	NaH2PO4	1,25	NaH2PO4	1,25	NaH2PO4	1,25	HEPES	20
	NaHCO3	18	NaHCO3	26	NaHCO3	25	NaHCO3	25	Glucose	25
	Glucose	11	Glucose	18,6	Glucose	10	Glucose	25	Ascorbate	2,25
	CaCl2	0,9	CaCl2	2	Sucrose	150	CaCl2	0,5	MK 801	0,01
	MK 801	0,01	Ascorbate	2,25	CaCl2	0,5	Na Pyruvate	3,1		
			MK 801	0,01	Ascorbate	2,25	Na Ascorbate	11,6		
			NTX	0,01	MK 801	0,01	MK 801	0,01		
Incubation	NaCl	126	same witho	ut MK 801	same, without MK 801		same, without MK 801		KCl	2,341
IaCSF	KCl	2,5	same, white	ut MIX 001					MgCl2	7,671
1.0051	MgCl2	1,2							NaH2PO4	1,25
	NaH2PO4	1,2							NaHCO3	25
	NaHCO3	18							Glucose	25
	Glucose	11							D-Mannitol	225
	CaCl2	2,4							CaCl2	0,513
patch			NaCl	124	NaCl	125	NaCl	126	NaCl	125,6
(slice			KCl	2,7	KCl	2,5	KCl	2,5	KCl	3,34
(shee			MgSO4	1,3	MgCl2	1	MgCl2	1	MgCl2	1,17
superiosion)			NaH2PO4	1,25	NaH2PO4	1,25	NaH2PO4	1,25	NaH2PO4	1,25
aCSF			NaHCO3	26	NaHCO3	25	NaHCO3	26	NaHCO3	24,8
			Glucose	18,6	Glucose	25	Glucose	20	Glucose	25
			CaCl2	2	CaCl2	2	CaCl2	2	CaCl2	1,31
			Ascorbate	2,25	Ascorbate	2,25				



3. Données supplémentaires

Dans l'étude présentée ici, nous montrons que les évènements inhibiteurs spontanés, enregistrés au niveau des cellules pyramidales de CA1, voient leur fréquence diminuée par l'application de deltorphine II. Cette inhibition implique le récepteur aux opioïdes delta dont l'activation entraine une inhibition de l'activité des interneurones qui l'expriment. Nous montrons également que ces interneurones de CA1 ne reçoivent pas d'afférence de la collatérale de Schaffer, mais plutôt de la voie temporoammonique, puisque la stimulation électrique de cette voie induit une libération massive de GABA au niveau de la cellule pyramidale dont l'amplitude est fortement réduite en présence de deltorphine II. Cependant, cet effet ne peut être lavé, mettant ainsi en question le lien entre la baisse d'inhibition observée et l'activation du récepteur. Certaines expériences supplémentaires ont été réalisées et permettent de proposer une explication.

3.1. La baisse d'inhibition est bien liée à l'activation du récepteur delta

L'absence de lavage de l'effet induit par la deltorphine II peut avoir deux significations. Soit cette baisse est bien provoquée par l'application de la drogue, mais pour une raison ou une autre, son effet est irréversible (au moins dans nos conditions et dans le temps que dure nos enregistrements), soit la baisse est indépendante de l'application d'agoniste. Dans ce cas, elle peut par exemple être due à une « fatigue » de la voie temporoammonique, dont la stimulation électrique n'est plus capable d'induire une libération de glutamate efficace au niveau des interneurones, provoquant un effondrement de la réponse. Cette dernière hypothèse est supportée par certaines de nos observations en effet, dans nos conditions, la réponse évoquée par la stimulation de la voie temporo-ammonique entraîne une diminution marquée des réponses au fur et à mesure des stimulations. Dans la littérature, seule 1 étude a effectué le même type de manipulation chez la souris, en stimulant la voie temporo-ammonique toutes les 20 secondes et sans observer de dépression (Nakauchi et al. 2007). Dans le protocole utilisé pour les enregistrements présentés ici, nous avons effectués une stimulation toutes les 2 minutes, ce qui nous a permis d'enregistrer une amplitude stable dans le temps. De plus, si la baisse observée était liée à la fatigue de la voie temporoammonique, elle devrait alors être corrélée au nombre de



Fig 13. Baisse de l'amplitue des TA eIPSC induite par l'activation des récepteurs delta aux opioïdes. Courbes représentant pour 6 cellules enregistrées, l'evolution au cours du temps de l'amplitude des eIPSC (normalisée pour chaque cellule par rapport à son amplitude basale moyenne) induits par stimulation de la voie temporoammonique. La baisse de l'amplitude est corrélée temporellement au moment où l'agoniste du récepteur delta (Deltorphine II 500nM) est appliqué (barre verte), soit (de haut en bas) 6, 10, 14, 18, 18 et 36 minutes après le début de l'enregistrement.

stimulations, ou au temps. Afin de tester cette éventualité, nous avons appliqué la deltorphine II après un nombre de stimulations variable, et donc après un temps variable (de 6 à 36 minutes après le début de l'enregistrement). Dans tous les cas (n=6), la baisse de l'amplitude de la réponse inhibitrice induite par stimulation de la voie temporoammonique s'est produite immédiatement après l'application de la drogue, démontrant la forte corrélation entre activation du récepteur delta et baisse de l'inhibition évoquée (Fig 13). De plus, les courants post-synaptiques excitateurs évoqués (eEPSC) enregistrés pour quelques cellules pyramidales avant et après application de deltorphine ne semblent pas affecté par la durée de stimulation.

3.2. Certaines conditions permettent d'obtenir un lavage

Après la mise en cause de l'intégrité de la voie temporoammonique, celles des interneurones exprimant le récepteur delta peut également être mise en cause. En effet les expériences impliquant la stimulation de la voie temporoammonique, nécessitent l'utilisation de tranches horizontales, dans lesquelles l'orientation des interneurones et les conséquences de la coupe des tranches peuvent être différents de celles de tranches coronales, utilisées pour la stimulation des collatérales de Schaffer. L'enregistrement de la fréquence des événements inhibiteurs reçus par les cellules pyramidales a d'ailleurs montré une fréquence basale plus basse dans les tranches horizontales que dans les tranches coronales (Voir Article, Fig1). Cependant si l'absence de lavage est associée à la coupe des tranches, elle doit être une caractéristique liée au réseau, et donc se retrouver également sur la fréquence des courrants post-synatpiques inhibiteurs spontanés (sIPSC), qui témoignent de l'inhibition dans toute la tranche. Or dans certains cas, un lavage a été observé sur la fréquence des sIPSC, après application de deltorphine II à 500nM (n=1/3) et à 100nM (n=2/3) (données non présentées). La possibilité d'un lavage de l'effet au niveau des événements spontanés, mais pas de l'inhibition évoquée suggère la coexistence de différents mécanismes de régulation de la réponse au sein des même neurones. Un élément supplémentaire en faveur de cette hypothèse est apporté par des expériences préliminaires au cours desquelles de la deltorphine II à 500nM a été appliquée localement au niveau de la cellule pyramidale enregistrée, et donc au niveau des terminaisons des interneurones susceptibles de libérer du GABA de façon spontanée. Dans ces conditions, une inhibition lavable et reproductible de la libération vésiculaire spontanée de GABA a pu être enregistrée (Fig 14). De plus, cette inhibition, déclenchée par l'activation des récepteurs au niveau des terminaisons, est observée à la foi sur les sIPSC, mais aussi sur l'inhibition évoquée par stimulation de la voie temporoammonique.



Fig 14. Baisse réversible de fréquence des sIPSC et d'amplitude des TA eIPSC après activation des récepteur aux opioïdes delta. Courbes représentant pour une cellule pyramidale enregistrées, l'evolution au cours du temps de la fréquence des sIPSC (en bas) et de l'amplitude des eIPSC (en haut) induits par stimulation de la voie temporoammonique (1 mA, 10 μs). Les deux paramètres baissent de facon réversible et reproductible en cas d'application locale au niveau de la couche pyramidale d'un agoniste du récepteur delta (Deltorphine II 500nM, barre verte).

3.3. Hypothèse d'une situation différente au niveau somatodendritique et au niveau des terminaisons

Le compartiment somato-dendritique et les terminaisons pourraient présenter des différences de couplage entre récepteur et effecteur. Il a été montré chez le rat que l'activation du récepteur delta induit une hyperpolarisation du compartiment somato-dendritique, via l'activation de courants potassiques de types Girk. Cette hyperpolarisation est maintenue grâce à l'inhibition des courants rectifiant Ih (Svoboda and Lupica 1998). Une forte baisse de l'excitabilité cellulaire est ainsi induite, sans doute à l'origine de l'inhibition des courants qui nécessitent une intégration somato-dendritique, comme les courants évoqués par la stimulation des afférences. Ces récepteurs somato-dendritiques pourraient donc être à l'origine des effets qui ne sont pas lavés dans nos conditions. Parallèlement, au niveau des terminaisons, la libération vésiculaire de GABA est également diminuée par les opioïdes, et d'autres mécanismes que l'ouverture des conductances potassiques pourrait être à l'origine de cette baisse. Ainsi en culture organotypique d'hippocampe de rat, la libération vésiculaire indépendante des potentiels d'actions (courants miniatures) est diminuée, indépendamment des concentrations extracellulaires de potassium (Rekling 1993).

En conclusion les interneurones exprimant le récepteur delta aux opioïdes sont vraisemblablement contactés par des afférence venant de la voie temporoamonique, d'autre expériences sont cependant nécessaires pour confirmer l'existence de deux « populations fonctionnelles » de récepteur delta, ayant des effets différents au niveau somato-dendritique et au niveau des terminaisons. Entre autre nous allons comparer de façon systématique l'effet de la deltorphine II sur les événement spontanés et évoqués.

Ι

Vers l'imagerie de l'internalisation

« physiologique » du récepteur aux opioïdes δ

1. Introduction

Outre l'activation des récepteurs aux opioïdes, la désensibilisation et l'internalisation sont également des processus importants dans la régulation de la réponse aux opioïdes. Pour cette raison ils ont été beaucoup étudiés, et notamment en systèmes hétérologues, neuroblastomes ou cultures primaires de neurones. Mais, si ces systèmes ont permis de découvrir les principaux acteurs de ces processus, leur nature variée a également laissé beaucoup de contradictions.

La souris DOR-eGFP générée au laboratoire, est un outil de premier choix pour étudier l'internalisation du récepteur delta. En effet, elle permet de visualiser directement la localisation cellulaire et intracellulaire du récepteur rendu fluorescent, et elle n'a jusqu'à présent montré aucune différence de comportement par rapport à la souris sauvage (Scherrer et al. 2006). Nous avons voulu étudier l'internalisation de DOR-eGFP dans un système intégré : la tranche aiguë. Ce système permet de travailler dans un réseau natif, tout en gardant un bon contrôle des conditions expérimentales (concentration de l'agoniste, application locale). Dans la première partie de ma thèse, j'ai entre autre présenté comment nous avons optimisé la préparation des tranches d'hippocampe et comment nous avons validé son bon fonctionnement physiologique. Dans cette partie, je présenterai les images acquises en tranches fixées, montrant la localisation intracellulaire du récepteur après son activation en bain, dans les conditions des études d'électrophysiologie. Nous verrons également les images issues d'acquisition en temps réel de l'internalisation induite en cultures primaires par l'application en bain de faibles concentrations d'agonistes peptidique ou alcaloïdes. Enfin, je décrirai les étapes d'optimisation et les images des acquisitions en temps réel de l'internalisation induite par l'application locale somatique ou dendritique d'agonistes peptiques ou alcaloïdes en tranches aiguës d'hippocampe.

2. Materiel et méthodes

Animaux

Ces expériences ont été menées sur des souris DOR-eGFP (Scherrer *et al.* 2006), de fond génétique c57/bl6J;129svPas (50:50%), âgées de 1 à 3 jours pour les cultures primaires et de 2 à 5 semaines pour les tranches aiguës, hébergées en animalerie (température 21±2°C et humidité 45±5% contrôlées), soumise à un cycle jour/nuit de 12h et ayant un accès libre à la nourriture et à l'eau. Toutes les expériences ont été menées en accord avec la directive du Conseil Européen du 26 Mai 2010 et approuvées par le comité d'éthique local (Com'Eth 2010-003).

Cultures primaires hippocampo-striatales

Des souriceaux DOR-eGFP sont décapités, hippocampes et striatums sont prélevés et digérés dans du milieu Hibernate (BrainBits) contenant 15U/mL de papaïne (Worthington) pendant 30 minutes à 37°C. De la DNAse 1mg/ml est ajoutée pendant les dix dernières minutes de digestion. Les cellules sont ensuite dissociées, centrifugées, comptées et placées à raison de 1x10⁵ cellules par boite, dans des boîtes de 32mm à fond en verre, préalablement recouvertes de poly-L-lysine (Sigma) dans du milieu DMEM contenant du glucose 4,5 g.L⁻¹, glutamine 2 mM, pénicilline / streptomycine 1 mM, sérum de veau fœtal inactivé 10%. Le milieu est remplacé une heure plus tard par du milieu de culture Neurobasal A (Invitrogen) contenant du glutamax dilué100x, glutamine 0.5 mM, pénicilline / streptomycine 1 mM, B27dilué 50x. Les cellules sont incubées à 37°C à 5% de CO2 en incubateur et la moitié du milieu est changé tous les 4 jours.

Imagerie en temps réel en cultures primaires

Une boîte à fond en verre contenant des neurones matures (maintenus en cultures pendant 10 à 14 jours) est transférée sur la platine d'un microscope confocal inversé SP2 AOBS (Leica). L'internalisation est observée à travers un objectif 63x à huile (O.N. 1,25). Une série de 3 images séparée de 1µm dans le sens de la profondeur est acquise pour chaque temps. Les acquisitions ont lieu toutes les 30 secondes pendant 5 minutes, puis toutes les minutes pendant 15 minutes, puis toutes les deux minutes pendant 40 minutes et enfin toutes les 10 minutes pendant une heure. La fluorescence de DOR-eGFP est excitée par un laser Argon émettant à 488 nm et la fluorescence émise est filtrée entre 510 et 650 nM.

Immunocytochimie sur les cultures primaires

Les neurones sont fixés 30 minutes à 37°C dans du paraformaldéhyde dilué à 4% dans du tampon phosphate (PB) 0,1M pH 7,4. Après 3 lavages (PB 0,1M pH 7,4), les cultures sont incubées 1h dans une solution de blocage (BS) contenant 0,2% de tween 20 et 5% de sérum normal de chèvre dilué dans du PB 0,1M pH 7,4. Les cultures sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire polyclonal de lapin reconnaissant le récepteur delta phosphorylé (cell signaling) dilué au 100^{ème} dans la BS à 4°C jusqu'au lendemain. Les tranches sont ensuite lavées trois fois dans du PB 0,1M pH 7,4 + tween 20, 0,2% et incubées 2h à température ambiante avec un anticorps secondaire anti lapin couplé à l'Alexafluor 594 (1 :2000) dilué dans du PB 0,1M pH 7,4 + tween 20, 0,2%. Finalement, les cultures sont lavées trois fois (PB 0,1M pH 7,4) et la lamelle est montée sur lame dans du Mowiol et du 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)(0,5 μ g/mL).

Préparation des tranches aiguës d'hippocampe

La préparation des tranches d'hippocampe est adaptée d'une préparation de tranche de cervelet décrite précédemment (Dugue *et al.* 2009) et est identique à celle utilisée pour les expériences d'électrophysiologie décrites dans la première partie de la thèse. Après sacrifice des animaux par dislocation cervicale et dissection rapide des deux hémisphères du cerveau, ceux-ci sont coupés au vibratome (Leica VT1000S, 80Hz/0,2mm.s⁻¹) en tranches coronales de 300 µm d'épaisseur, dans une première solution maintenue à 4°C et oxygénée par bullage de carbogène (95%02/5%CO2). Cette solution appelée SaCSF (Slicing artificial Cerebro Spinal Fluid) est à pH 7,3 et contient : K-Gluconate 130 mM, KCl 14,6 mM, EGTA 2 mM, HEPES 20 mM, Glucose 25 mM, MK-801 10µM. Les tranches sont ensuite rincées 10 minutes dans une solution bullée au carbogène, à pH 7,3, maintenue à 34°C et contenant : D-Mannitol 225 mM, KCl 2,34 mM, NaH₂PO₄ 1,25 mM, NaHCO₃ 25 mM, Glucose 25 mM, CaCl₂ 0,513 mM, MgCl₂ 7,671 mM, MK-801 10µM. Enfin, les tranches sont maintenues pendant 3 à 4h sur des filtres en nitrocellulose, à l'interface entre l'air et une solution maintenue à température ambiante, oxygénée et maintenue à pH 7,3 par bullage de carbogène. Cette solution, appellée aCSF, contient : NaCl 125,6 mM, KCl 3,34 mM, NaH₂PO₄ 1,25 mM, NaHCO₃ 25 mM, Glucose 25 mM, CaCl₂ 1,31 mM, MgCl₂ 1,17 mM.

Imagerie en temps réel en tranches aiguës d'hippocampe

Une tranche est placée dans la chambre d'un microscope confocal à platine fixe (Leica CFS AOBS), superfusée à 2mL/min par une solution d'aCSF pré-oxygénée, à pH 7,4, et renouvelée au miniµm toutes les heures. L'aCSF et tout le microscope sont situés dans une enceinte maintenue à 37±2°C. L'illumination de la tranche par une lumière d'une longueur d'onde de 488nm,

produite par un laser argon et l'observation (objectif 40x ceramique APO 1 à immersion et grande distance de travail, ON 1,7) de la fluorescence émise, filtrée entre 496 et 600nm) permet l'identification et l'imagerie au cours du temps d'un neurone de CA1 exprimant DOR-eGFP. Une micropipette dont la pointe présente une ouverture d'environ 1 µ, est approchée vers le neurone, et remplie avec une solution contenant 1 mM de fluorescéine et l'agoniste en concentration variable (voir résultats) dilué dans de l'aCSF. Les micropipettes sont étirées à partir de capillaires de borosilicate GC100TF (Sutter instruments), grâce à une tireuse horizontale (DMZpuller, Zeitz instrumente, Munich, Allemagne). La libération locale d'agoniste est déclenchée à proximité d'un dendrite ou du soma du neurone par une injection d'air sous pression dans la micropipette (2 à 4 mpsi, 50 à 100 ms) par l'intermédiaire d'un picospritzer II (Parker). Le volume ainsi libéré est extrêmement petit (<0,1 pL), et n'a pu être mesuré avec précision. L'acquisition des images au cours du temps se fait avec les paramètres suivant: Une image = 512x512 pixels correspondant à environ 95x95x2 mm, sténopé = 1,5 AU, triple moyennage par ligne pour chaque acquisition. Une série de 3 images séparées de 1 µm dans les sens de la profondeur est acquise toutes les 15s pendant 10min, puis une série toutes les minutes pendant 20 minutes. Les mouvements latéraux ou en profondeur du neurone suivi sont compensés en temps réel par l'expérimentateur. Afin de compenser les mouvements en z (profondeur) au cours du temps, une seule image de chaque série est manuellement sélectionnée pour le film. Les mouvements latéraux sont corrigés de façon automatique grâce au plugins turboreg et stackreg du logiciel Image [(l'influence des mouvement de vésicules sur le recalage automatisé a été évaluée et jugée négligeable).



Fig 15. Localisation subcellulaire de DOR-eGFP après une éxpérience d'éléctrophysiologie. Projection en Z d'images de microscopie confocales, montrant une tranche aiguë incubée en présence de Deltorphine 500nM (10min) puis lavée (30 minutes). Le signal DOR-eGFP amplifié (vert) montre un interneurone avec récepteurs internalisé (flêche) et plusieurs avec récepteurs membranaires (têtes de flêches), autour de la cellule pyramidale remplie d'Alexa 594 au cours de l'enregistrement (rouge). *Barre d'échelle : 20 μm.*



Fig 16. Application en bain d'agonistes en tranche aiguë. Images représentatives en microscopie confocales de tranches fixées après incubation de 30 minutes avec A. de l'aCSF seul (contrôle), B. du SNC 80 à 1 μ M, C. de la deltorphine à 1 μ M, seule condition dans laquelle on peut observer une internalisation du signal DOR-eGFP (flêche). *Taille des images: 62,5x62,5 \mum.*

3. Résultats

3.1. Internalisation induite par des applications en bain d'agonistes

3.1.1. Tranches aiguës fixées

Dans un premier temps, nous avons observé au microscope confocal des tranches fixées après les expériences d'électrophysiologie décrites dans la première partie. Ces tranches ont reçu de la deltorphine II en bain pendant 10 minutes puis, ont subi un lavage sans drogue pendant 30 minutes. Une image représentative d'une de ces tranches (n=2) présentée figure 15 montre la cellule pyramidale remplie d'Alexa 594 au cours de l'enregistrement, entourée de plusieurs interneurones exprimant DOR-eGFP. Parmi eux, un seul présente une internalisation en vésicules (flèche), correspondant à ce qui a été observé après injection d'agoniste *in vivo* (Scherrer *et al.* 2006). Les autres interneurones présentent une distribution membranaire du récepteur (têtes de flèches).

Ce résultat a été reproduit sur des tranches aiguës n'ayant pas été utilisées pour des expériences d'électrophysiologie, mais directement incubées avec différents agonistes (n=2). Dans les tranches incubées avec de la deltorphine II à 1 μ M, la proportion d'interneurones dans lesquels la fusion DOR-eGFP est internalisée est très faible, et limitée à la surface de la tranche (Fig 16C). En revanche, nous n'avons pas observé d'internalisation suite à 'application de SNC80 à la même concentration (Fig 16B), ce qui peut être comparé à l'absence d'effet du SNC 80 appliqué en bain dans certaines expériences préliminaires en électrophysiologie non présentées ici. Comme attendu, la distribution de DOR-eGFP reste membranaire dans des tranches contrôles incubées en l'absence d'agoniste (Fig 16A).

Ces résultats indiquent que l'internalisation du récepteur provoquée par l'application en bain d'un agoniste en réseau intégré *ex vivo* présente des caractéristiques similaires à celle précédemment décrite *in vivo* après injection d'agoniste (Scherrer *et al.* 2006; Pradhan *et al.* 2009). Le caractère aléatoire de l'internalisation induite par l'application en bain d'agoniste limite fortement l'intérêt de ce support pour entreprendre l'étude de l'internalisation en temps réel. En effet, à la faible probabilité de trouver dans une tranche, un interneurone exprimant DOR-eGFP localisé suffisamment en surface pour offrir un rapport signal / bruit satisfaisant, se rajoute le caractère aléatoire de l'internalisation induite dans ces conditions. Pour ces raisons, nous avons réservé l'utilisation des tranches aiguës aux



Fig 17. Internalisation de DOR-eGFP induite par 100nM de SNC 80 en culture primaire. Images représentatives de microscopie confocale acquises en temps réel, montrant l'internalisation massive de DOR-eGFP induite par une application en bain de 100nM de SNC 80 sur un neurone en culture. *Taille des images : 62 x 62 µm.*



expériences d'application locale d'agoniste pour lesquelles nous choisissons le neurone à enregistrer et contrôlons l'administration du ligand.

3.1.2. Imagerie en temps réel en neurones primaires

L'application de SNC 80 en bain n'induisant pas d'internalisation en tranche, nous avons vérifié son efficacité en culture neuronale, en conditions dans lesquelles sa capacité à induire l'internalisation de DOR-eGFP a déjà été observée (Scherrer et al. 2006). Conformément aux résultats décrits précédemment, l'application de 100nM de SNC 80 en bain induit l'internalisation massive du récepteur (Fig 17). La fluorescence associée à la protéine de fusion DOR-eGFP, d'abord membranaire (t0), devient rapidement punctiforme, et des mouvements vésiculaires peuvent ainsi être observés dans la cellule pendant plus d'une heure. Au bout de deux heures, une partie importante du marquage est intracellulaire et regroupé au centre de la cellule, près du noyau, dans un compartiment cellulaire déjà identifié comme étant le lysosome (Pradhan et al. 2009). La co-localisation de la fluorescence associée à DOR-eGFP avec un marquage immunohistochimique spécifique du récepteur phosphorylé au niveau de la sérine 363, montre que plus l'activation du récepteur par du SNC 80 à 100nM dure longtemps, plus le signal correspondant au récepteur phosphorylé est fort, et plus il colocalise avec les vésicules d'internalisation. De plus, au bout de deux heures, les compartiments cellulaires contenant la fluorescence et décrits comme étant des lysosomes sont remplis de récepteurs phosphorylés (Fig 18).

L'application de deltorphine 100nM, provoque également une internalisation (Fig 19) semblable à celle induite par le SNC 80 (Scherrer *et al.* 2006), et semblable à celle induite *in vivo* après injection d'une dose massive d'agoniste (Pradhan *et al.* 2009). En revanche, si l'on baisse la concentration de deltorphine II à 10nM, on n'observe plus une telle internalisation massive de DOR-eGFP dans des vésicules intracellulaires, mais plutôt quelques mouvements de petites zones à la fluorescence légèrement plus marquée, mais restant à la surface de la cellule (Fig 20).

Dans le cas de la met-enképhaline, à forte concentration, nous avons reproduit les résultats précédemment obtenus au laboratoire lors d'une application en bain à 100nM (Scherrer *et al.* 2006). En effet nous observons une internalisation (Fig 21) semblable à celle induite par le SNC 80 ou la deltorphine II. A faible concentration en revanche (5nM), la met-enkephaline induit toujours une internalisation, mais là encore, bien moins marquée.



Fig 19. Internalisation de DOR-eGFP induite par 100nM de deltorphine en culture neuronale. Images acquises en temps réel, montrant l'internalisation massive de DOR-eGFP induite par une application en bain de 100 nM de deltorphine II en culture neuronale. *Microscopie confocale, taille des images : 80 x 80 μm.*



Fig 20. Mouvements membranaires de DOR-eGFP induits par 10nM de deltorphine II en culture neuronale. Images acquises en temps réel, montrant l'apparition de zones membranaires à la fluorescence plus marquée, induite par une application en bain de 10nM de deltorphine II en culture neuronale. *Microscopie confocale, taille des images : 64 x 64 µm.*

Au bout d'une heure d'application constante, il reste toujours un signal DOR-eGFP à la membrane (Fig 22). Ces résultats préliminaires soulignent l'intérêt de remplacer les fortes concentrations d'agoniste par d'autres, plus faibles, afin d'aborder les premières étapes du processus d'internalisation. D'autre part, afin de mieux mimer les conditions physiologiques d'activation du récepteur, nous avons voulu observer en temps réel l'effet d'une application locale d'agonistes.

3.2. Internalisation induite par une application locale d'agoniste

3.2.3. Mise au point

Les premiers tests d'imagerie en temps réel, effectués sur un microscope confocal droit à platine mobile ont immédiatement mis en évidence des problèmes de mouvements au cours de l'acquisition. Ces mouvements sont à la fois latéraux (nous les appellerons xy) et dans le sens de la profondeur (nous les appellerons z). Nous avons voulu déterminer si ces mouvements étaient dus à la tranche elle-même, au système de perfusion ou à la platine motorisée du microscope. Nous avons donc dans un premier temps évalué la stabilité d'un échantillon fixe (bille fluorescente), imagé au cours du temps (Fig 23). Les résultats indiquent que la platine motorisée possède un mouvement intrinsèque, à la fois latéralement en x (Fig 23B) mais aussi selon l'axe z (Fig 23A). Nous avons également observé que ce mouvement dépend du différentiel de température entre les différents éléments du microscope. Ces problèmes de mouvements ont pu être résolus par l'acquisition d'un microscope confocal à platine fixe, placé dans une enceinte à température contrôlée.

Dans ces nouvelles conditions, nous avons néanmoins constaté que des mouvements en z persistaient (imagerie d'un élément fixe, situé dans la chambre du microscope, sous perfusion) et nous avons établi qu'ils sont en partie liés à l'évaporation progressive du liquide dans la chambre. La variation du niveau qui en résulte influence en effet la forme du ménisque formé sous l'objectif à immersion, et donc son point focal. Ce problème a pu être corrigé en utilisant une chambre d'imagerie spécifiquement adaptée à l'imagerie en temps réel (Ultra Quiet Imaging Chamber, Harvard apparatus) qui permet, par un système de vase communicants, de garder un niveau de liquide constant dans la chambre. Enfin, des mouvements en x, y et z persistent mais sont intrinsèques à la tranche. On peut en effet distinguer certains neurones qui gonflent (probablement en mort cellulaire), créant des mouvements dans les trois directions. Les



Fig 21. Internalisation de DOR-eGFP induite par 100 nM de met-enképhaline en culture neuronale. Images acquises en temps réel, montrant l'internalisation massive de DOR-eGFP induite par une application en bain de met-enképhaline 100 nM. *Microscopie confocale, taille des images : 64 x 128 μm.*



Fig 22. Internalisation de DOR-eGFP induite par 5 nM de met-enképhaline en culture neuronale. Images acquises en temps réel, montrant une internalisation partielle de DOR-eGFP, induite par une application en bain de 10 nM de met-enképhaline. *Microscopie confocale, taille des images : 64 x 128 μm.*



Fig 23. Mise en évidence des mouvements tridimentionels intrinsèques au microscope confocal. A. Images de microscopie confocale, prises à différentes profondeures (lignes), d'une microbille fluorescente montée entre lame et lamelle, montrant le décalage progressif au cours du temps de la platine (colonnes). B. Projection en temps de 16 images prises à 1minute d'intervale de la même bille, montrant le décalage latéral progressif. *Taille des images :* $64 \times 64 \mu m$.



Fig 24. Application locale dendritique de fluoresceine (contrôle) en tranche aiguë. Images acquises en temps réel, montrant l'absence d'internalisation de DOR-eGFP dans le cas d'une application locale dendritique de la solution contrôle contenant uniquement la fluoresceine diluée dans l'aCSF. *Microscopie confocale, taille des images : 62,5* x 62,5 μm.



Fig 25. Application locale dendritique de met-enképhaline 1 mM en tranche aiguë. Images acquises en temps réel, montrant l'internalisation de DOR-eGFP dans le cas d'une application locale dendritique de 1 mM de met-enkephaline sur un neurone en tranche aiguë. *Microscopie confocale, taille des images : 62,5 x 62,5 μm.*



Fig 26. Application locale dendritique de met-enképhaline 1 μM en tranche aiguë. Images acquises en temps réel, montrant l'absence d'internalisation de DOR-eGFP induite par une application locale dendritique de 1 μM de met-enkephaline sur un neurone en tranche aiguë. *Microscopie confocale, taille des images : 62,5 x 62,5 μm.*
mouvements en xy qui en résultent ont été corrigés a posteriori grâce à un plugin du logiciel ImageJ (stackreg). Nous avons au préalable vérifié que l'apparition et les mouvements des vésicules fluorescentes intracellulaire au cours de l'internalisation du récepteur n'influençaient pas le recalage des images. Enfin, les mouvements en z sont corrigés manuellement au cours de l'acquisition (voir matériel et méthodes).

3.3.3. Résultats

3.3.3.1. Contrôle

Au temps initial, tous les neurones sur lesquels les expériences d'application locale d'agoniste ont été réalisées présentent une fluorescence DOR-eGFP membranaire (Fig 24, ti). La présence de fluorescéine dans la pipette sert de contrôle pour la phase d'éjection par pression ou « puff » (Fig 24, t0). L'application locale dendritique d'une solution contrôle ne contenant pas d'agoniste, n'entraîne pas d'internalisation du récepteur puisque la fluorescence de DOR-eGFP reste membranaire (Fig 24, 15sec à 20min).

3.3.3.2. Agonistes peptidiques

L'application locale de met-enképhaline (Fig 25-26) ou de deltorphine II (Fig 27-28) est comparable. Dans les deux cas, une concentration intra-pipette de 1mM de peptide libéré localement au niveau dendritique, induit efficacement l'internalisation massive du récepteur DOR-eGFP, selon le profil décrit précédemment *in vivo* (Pradhan *et al.* 2009) (Fig 25 et 27, Tableau 1). Cette internalisation est visible du soma aux dendrites, dès la première acquisition suivant le puff, soit 15 secondes après la libération locale d'agoniste. Une baisse de la concentration en peptide opioïde à 1µm intra-pipette n'entraine pas, après un puff, de modification visible du signal DOR-eGFP (Fig 26, Tableau 1), suggérant que la concentration d'agoniste est trop faible pour induire l'internalisation du récepteur. Par ailleurs, l'application locale de 1mM d'agoniste au niveau dendritique induit systématiquement l'internalisation du récepteur (Tableau 1) tandis que des applications similaires, effectuées au niveau somatique, se





Fig 28. Application locale somatique de deltorphine 1 mM en tranche aiguë. Images acquises en temps réel, montrant l'absence d'internalisation de DOR-eGFP dans le cas d'une application locale somatique de 1 mM de deltorphine II sur un neurone en tranche. *Microscopie confocale, taille des images : 62,5 x 62,5 µm.*

sont révélées beaucoup moins efficaces à induire l'internalisation du récepteur dans des expériences préliminaires utilisant la deltorphine II comme agoniste (Fig 28, Tableau 1).

3.3.3.3. Agonistes alcaloïdes : SNC 80 et BW 373U86

Le SNC80 appliqué au niveau dendritique sur un interneurone exprimant DOR-eGFP n'induit pas l'internalisation de ce récepteur (Fig 29, Tableau 1). En revanche, dans les mêmes conditions, l'application de BW 373U86, un autre agoniste alcaloïde du récepteur delta, induit efficacement son internalisation (Fig 30, Tableau 1). Ceci démontre que l'inefficacité du SNC 80 en tranche n'est pas due à sa nature alcaloïde, mais plutôt au SNC 80 lui même (plusieurs lots ont été testés, dont des lots ayant montré un effet *in vivo*). Il a été montré qu'une fois injecté, le SNC 80 peut être rapidement métabolisé en BW 37U86 (Schetz *et al.* 1996) potentiellement à l'origine des effets observés *in vivo*. De plus, du BW37U86 peut être formé à partir du SNC 80, simplement par perte d'un groupement méthyl du groupement méthoxy (OMe), par exemple en milieu acide. Nous avons effectivement observé que l'efficacité de ces ligands dépend beaucoup du pH (Tableau 2). D'autres facteurs pourraient éventuellement perturber l'action du SNC 80 en tranches, notamment le tampon. En effet l'imagerie en culture neuronale nécessite l'utilisation de milieu de culture comme tampon de dilution, à la différence des tranches aiguës pour lesquelles le tampon de dilution est l'aCSF, qui est de pH équivalent (7,4) mais de composition notamment ionique radicalement différente.



Fig 29. Application locale dendritique de SNC 80 1 mM en tranche aiguë. Images acquises en temps réel, montrant l'absence d'internalisation de DOR-eGFP dans le cas d'une application locale dendritique de 1 mM de SNC80 sur un neurone en tranche. *Microscopie confocale, taille des images : 62,5 x 62,5 μm*.



Fig 30. Application locale dendritique de BW373U86 en tranche aiguë. Images acquises en temps réel, montrant l'internalisation de DOR-eGFP induite par une application locale dendritique de 1 mM de BW 373U86 sur un neurone en tranche. *Microscopie confocale, taille des images : 62,5 x 62,5 µm.*

Agoniste	Concentration	Localisation	Signal DOR-eGFP	n
Deltorphine II	1 mM	Dendrite	Internalisé	2/2
		Soma	Membranaire	2/3
	1 μM	Dendrite	Membranaire	1/1
		Soma	Membranaire	1/1
	100 nM	Dendrite	Membranaire	2/2
Met-enképhaline	1 mM	Dendrite	Internalisé	2/2
	1 μΜ	Dendrite	Membranaire	3/3
SNC80	1 mM	Dendrite	Membranaire	2/2
	1 μM	Dendrite	Membranaire	2/2
BW373U86	1 mM	Dendrite	Internalisé	3/3
contrôle		Dendrite	Membranaire	3/3

Tableau 1. Application locale d'agoniste opioïdes en tranches aiguës. Résumé des différentes conditions testées en application locale, dans les tranches aiguës

Agoniste	рН	Nombre de neurones exprimant DOR-eGFP	% de neurones internalisés
BW 373U86	7,5	80	95%
	8,5	55	45%
SNC 80	7,5	65	88%
	8,5	59	33%

Tableau 2. L'efficacité du SNC 80 et du BW 373U86 à induire l'internalisation dépend du pH.

Comptage du nombre de neurones exprimant DOR-eGFP montrant l'internalisation du récepteur en cultures primaires après 20 minutes d'application d'agoniste alcaloïde en bain à pH 7,5 ou 8,5.

III

Culture organotypiques d'hippocampe

1. Introduction

Le terme de culture organotypique désigne une culture d'organe ou de partie d'organe. Ces cultures peuvent être faites notamment à partir de tranches de cerveau, et ont l'avantage de conserver l'organisation des réseaux originaux pendant quelques mois, comme cela a été décrit pour les deux principales méthodes de préparation de cultures organotypiques de tranches de cerveau: la méthode de Gähwiller (Gahwiler 1981) caractérisée par un aplatissement de la tranche au cours de la culture jusqu'à ne former qu'une seule couche cellulaire, et celle de Stoppini (Stoppini *et al.* 1991) qui place la tranche à l'interface entre milieu de culture et air de l'incubateur, et qui est caractérisée par une conservation partielle de l'organisation tridimensionnelle. L'intérêt majeur de la culture organotypique est qu'elle combine les avantages des tranches aiguës (maintenance du réseau tridimensionnel et des sous-types cellulaires) et ceux des cultures neuronales (système stable pendant plusieurs semaines voir plusieurs mois, permettant des expériences plus longues qu'en tranche aiguë). Dans notre cas, ce modèle devait permettre, outre une imagerie plus stable et plus détaillée de DOR-eGFP, d'étudier l'export du récepteur delta à la membrane et les modifications du trafic du récepteur induit par son activation répétée.

La troisième partie de ma thèse détaillera les étapes de mise en place de la technique de culture organotypique d'hippocampe, pour laquelle nous avons collaboré avec le groupe du Pr. Pico Caroni (FMI, Bâle, Suisse) qui pratique en routine la technique de Stoppini (Gogolla *et al.* 2006). Nous examinerons en particulier la morphologie globale des tranches : cellules, neurones, somas et dendrites, et plus particulièrement les cellules exprimant DOR-eGFP (type cellulaire, niveau de fluorescence). Enfin, la co-localisation de DOR-eGFP avec des marqueurs pré et post-synaptiques sera également analysée. Conjuguée à une approche par microscopie de corrélation photonique-électronique réalisée par le Dr Lauren Faget, ces données ont pour but d'établir si le récepteur delta est ou non exprimé dans les cellules pyramidales chez la souris. En effet, des études d'immunohistochimie (Commons and Milner 1997) et d'hybridation *in situ* (Stumm *et al.* 2004) ont montré sa présence à la fois dans les interneurones gabaergiques et dans les cellules pyramidales chez le rat, tandis que chez la souris la présence de ces récepteurs n'a pu être observée qu'au niveau de cellules gabaergiques, et non dans les cellules pyramidales (Bausch *et al.* 1995). Ce travail fait l'objet d'un manuscrit présenté en fin de partie.

2.Materiel et méthodes

Voir manuscrit, ont également été utilisés les anticorps suivants :

Anticorps primaires	Dilution	Туре	Références	
Green fluorescent protein (GFP)	1:1000	Polyclonal lapin	Invitrogen A6455	
Neurofilament N (NeuN)	1.2000	Monoclonal	Millipore MAB377	
		souris		
Microtubule associated protein 2	1.1000	Monoclonal	Sigma M 1406	
(MAP2)	1.1000	souris	Signa W 1400	
Parvalbumin	1:1000	Monoclonal	Swant 235	
		souris		
Synaptophysine	1:100	Polyclonal lapin	SYSY 101002	
Synantotagmine	1.1000	Monoclonal	Martin-Moutot et al. 1993	
o y naprocogninic	112000	souris	(clone 1D12)	
AMPA glutamate receptor sub unit 1	1:1000	Polyclonal lapin	Abcam 31232	
(GluR1)		, .		
Post-synaptic density protein 95 (PSD	1:100	Monoclonal	Millipore MAB1596	
95)		souris		

 Tableau 3. Anticorps et dilutions utilisés en culture organotypiques.

3. Résultats

3.1. Mise au point des conditions de cultures et d'immunomarquage

3.1.1. Evolution de la qualité des cultures

Un premier aperçu de la qualité de la culture organotypique peut être obtenu en observant l'organisation générale des cellules de l'hippocampe, visualisées par un simple marquage des noyaux au DAPI. La Figure 31 montre une tranche d'hippocampe d'un souriceau de 4 jours, avant la culture (panneau A) et des exemples de tranches après culture. On remarque que le degré de conservation de l'organisation du réseau hippocampique augmente au fur et à mesure que les cultures sont répétées. La première culture (panneau B) est totalement désorganisée. Dans une série ultérieure de cultures (panneau C) des couches de cellules pyramidales sont présentes, et, finalement (panneau D) on peut retrouver toute l'organisation structurale de l'hippocampe, au moins au niveau des noyaux cellulaires. Cette organisation des corps cellulaires donne un premier aperçu, mais ne suffit pas à déterminer de façon précise le degré d'organisation conservé dans les cultures. Nous avons donc procédé à des immunomarquages mettant en évidence les corps cellulaires neuronaux ainsi que leur dendrites.

3.1.2. Pénétration des anticorps - choix du détergent

Les premières expériences d'immunohistochimie réalisées sur les cultures organotypiques ont mis en évidence un problème de pénétration des anticorps. On observe sur la Figure 32A, que le marquage DAPI (bleu) pénètre en profondeur de la tranche, marquant de nombreux noyaux, alors que le marquage immunohistochimique (rouge) reste très superficiel et marque peu de neurones. Ce problème a pu être résolu en remplaçant le Tween 20 à 0,2% par du Triton X 100 à 0,5% et en l'ajoutant dès l'étape de fixation au paraformaldéhyde. L'amélioration de la perméabilisation du tissu est visible au niveau de l'immuno-marquage (Fig 23B).



Fig 31. Cultures organotypiques d'hippocampe, organisation cellulaire. Images représentatives en microscopie à épifluorescence après marquage au DAPI, montrant la distribution des noyaux des cellules. A. Avant culture. B. Après la 1ère tentative de culture. C. et D. Tentatives ultérieures. *Barre d'échelle : 500 μm.*



Fig 32. Influence du détergent sur la pénétration des anticorps en immunohistochimie. A. Immunohistochimie en présence de 0,2% tween 20. B. Immunohistochimie en présence de 0,5% Triton X100 présent également pendant l'étape de fixation. Marquage des noyaux avec du DAPI (à gauche), avec NeuN (au centre) et superposition (à droite). Microscopie à épifluorescence. *Barre d'échelle : 50 µm.*



Fig 33. Organisation neuronale des cultures organotypiques d'hippocampe. Images représentatives de microscopie à épifluorescence après marquage des noyaux cellulaires au DAPI (bleu) et des noyaux neuronaux par NeuN (rouge). A, B. Vues globales, *barre d'échelle 500 μm*. C. Couche pyramidale de la region CA3 (détail de B), *barre d'échelle 50 μm*.



Fig 34. Organisation dendritique des cultures organotypiques d'hippocampe. Images représentatives, obtenues après marquage immunohistochimique des soma et dendrites des neurones (MAP2). A. Microscopie à épifluorescence, vue globale. B Vue globale et C. vue détaillée de la région CA3, microscopie confocale. *Barres d'échelle 200 µm*.



Fig 35. Cytoarchitectonique DOR-eGFP en cultures organotypiques. Images représentatives de microscopie confocale, après amplification du signal DOR-eGFP par immunohistochimie (vert), montrant (A) sa colocalisation avec le marqueur neuronal somato-dendritique MAP2 (rouge) et (B) sa colocalisation avec le marqueur de sous population d'interneurone : parvalbumine (magenta). *Barres d'echelle 50 μm*



Fig 36. Fluorescence DOR-eGFP sans amplification. Microscopie confocale d'une tranche organotypique non fixée, sans amplification. A. Région CA1. B. Détail de A, couche pyramidale. Barres d'echelles 30 µm.

3.2. Morphologie des cultures organotypiques

Il est possible de repérer spécifiquement le noyau et le compartiment somato-dendritique des neurones, en réalisant des marquages immunohistochimiques reconnaissant respectivement les neurofilaments N (NeuN) et les protéines de type 2 associées aux microtubules (MAP2) respectivement.

NeuN est une protéine nucléaire exprimée par la quasi totalité des neurones des vertébrés. Dans les tranches d'hippocampe, ce marquage permet une bonne visualisation des couches de cellules pyramidales de la corne d'Ammon et des cellules granulaires du gyrus denté. Ce profil est bien visible dans nos cultures organotypiques après 4 semaines de cultures (Fig 33).

MAP2 est une protéine associée aux microtubules, présente dans les dendrites et le soma des neurones. Dans les cultures organotypiques présentées figure 34, il est possible de voir l'organisation conservée des dendrites primaires des cellules pyramidale, qui se dirigent vers la fissure hippocampique, comme c'est le cas chez l'adulte.

3.3. Distribution des cellules exprimant DOR-eGFP

La présence de cellules exprimant le récepteur fluorescent est à vérifier. Pour cela un marquage immunohistochimique spécifique de la GFP a été effectué, et a permis d'observer la présence de cellules exprimant DOR-eGFP (Fig 35). Ces cellules sont marquées par l'anticorps anti MAP2 et sont donc des neurones (Fig 35a). De plus, une proportion importante co-localise avec la parvalbumine (Fig 35b et c), ce qui correspond bien à la distribution de ces interneurones *in vivo* (Erbs et al, soumis pour publication). D'autre part la localisation intracellulaire du récepteur est essentiellement membranaire, ce qui correspond aux observations faites chez l'animal en l'absence d'activation par un agoniste (Scherrer *et al.* 2006; Pradhan *et al.* 2009).



Fig 37. Localisation présynaptique de DOR-eGFP au niveau des cellules pyramidales en cultures organotypiques. Images représentatives en microscopie confocale de la couche pyramidale CA1 montrant le signal amplifié DOR-eGFP (vert), le marqueur synaptique (rouge) et la superposition (à droite). A. Pas de colocalisation avec le marqueur post-synaptique des cellules pyramidales GluR1. B. Colocalisation avec le marqueur pré-synaptique synaptique synap-totagmine. *Barres d'échelles : 20 μm.*



Fig 38. Localisation présynaptique de DOR-eGFP au niveau des cellules pyramidales en tranches aiguës. Images représentative en microscopie confocale de la couche pyramidale CA1 montrant le signal amplifié DOR-eGFP (vert) et le marqueur synaptique (rouge). A. Pas de colocalisation avec le marqueur post-synaptique GluR1. B, C. Colocalisation des fibres (têtes de flèches) mais pas des corps cellulaires (flèche) exprimant DOR-eGFP avec le marqueur pré-synaptique synaptotagmine (rouge). *Barres d'échelles : 10 μm.*

3.4. Intensité de fluorescence associée à la fusion DOReGFP en l'absence d'amplification.

L'observation du trafic intracellulaire du récepteur en temps réel n'est possible que si la fluorescence associée à la fusion DOR-eGFP autorise sa détection sur tissu frais en l'absence d'amplification du signal à l'aide d'anticorps. Nous avons donc observé directement au microscope confocal une tranche organotypique. Malheureusement, en l'absence d'amplification, le signal fluorescent s'est révélé être trop faible pour être visualisé en temps réel (Fig 36a). Nous avons donc profité de la qualité des immunomarquages obtenus dans ce système pour étudier la localisation pré ou post synaptique du récepteur DOR-eGFP au niveau des cellules pyramidales de CA1.

3.5. Localisation pré ou post synaptique de DOR-eGFP au niveau des cellules pyramidales de CA1

La fluorescence intense qui délimite le pourtour des cellules pyramidales peut être due à sa présence pré-synaptique, sur les axones des interneurones, ou à sa présence post synaptique sur la région somato-dendritique des cellules pyramidales elles-mêmes. Pour répondre à cette incertitude, nous avons utilisé les tranches organotypiques pour examiner la distribution de la fluorescence DOR-eGFP au niveau de la couche pyramidale par immunohistochimie. Nous avons examiné la colocalisation entre la fusion DOR-eGFP et deux marqueurs spécifiques pré- ou post synaptiques, respectivement la synaptotagmine ou GluR1 et avons ensuite comparé nos résultats avec ceux obtenus à partir de tranche aiguë. La synaptotagmine est une protéine présynaptique, impliquée dans la libération vésiculaire et sensible au calcium. Dans la couche pyramidale, son marquage co-localise avec celui de DOR-eGFP, sauf au niveau de corps cellulaires d'interneurones DOR-eGFP (Fig 37a). GluR1 est une des sous-unités du récepteur AMPA, présent au niveau post synaptique dans les cellules pyramidales. Ce marquage ne colocalise pas avec celui de DOR-eGFP. Les marquages réalisés en tranche de souris adulte, montrent une colocalisation comparable entre récepteurs delta et marqueurs présynaptiques et une absence de co-localisation avec les marqueurs post synaptiques (Fig 38). Ces résultats confirment l'idée que le récepteur delta est principalement exprimé au niveau des interneurones et que la fluorescence observée autour des cellules pyramidales correspond en fait à des contacts synaptiques avec ces interneurones. Ceci a été confirmé par l'examen en microscopie électronique de la distribution subcellulaire de la fusion DOR-eGFP (voir manuscrit).

4. Article

Mouse delta opioid receptors are located on presynaptic afferences to

hippocampal pyramidal cells.

Xavier Rezaï^a, Lauren Faget^a, Ewa Bednarek^c, Yannick Schwab^b, Jean-Luc Vonesch^b, Pico Caroni^c,

Brigitte L. Kieffer^a, Dominique Massotte^a

a. Translational medicine and neurogenetics, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), 1 rue Laurent Fries, F-67404 Illkirch, France

b. Imaging Center, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), 1 rue Laurent Fries, F-67404 Illkirch, France

c. Friedrich Miescher Institut, Maulbeerstrasse 66, CH-4058 Basel, Switzerland.

Corresponding author:

Dominique Massotte Translational medicine and neurogenetics Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC) CNRS/INSERM/UdS 1 Rue Laurent Fries BP10142 F-67404 Illkirch cedex France Telephone: +33 3 88 65 56 25 Fax: +33 3 88 65 56 04 Email: massotte@igbmc.fr

Abstract

Delta opioid receptors participate to the control of chronic pain and emotional responses. Recent data have also identified their implication in drug-context associations pointing to a modulatory role on hippocampal activity. We used fluorescent knock-in mice that express a functional delta receptor fused at its carboxy-terminus with the green fluorescent protein in place of the native receptor to investigate the receptor neuroanatomical distribution in this structure. Fine mapping of the pyramidal layer was performed using confocal imaging and electron microscopy. Delta opioid receptors were mostly identified on presynaptic afferences to glutamatergic principal cells. In the latter, only scarce receptors were detected that were confined within the Golgi or vesicular intracellular compartments. In the mouse hippocampus, expression of delta opioid receptors is therefore mostly associated to interneurons emphasizing presynaptic modulatory effect on the pyramidal cell firing rate.

Keywords

Delta opioid receptor, mouse hippocampus, interneurons, glutamatergic pyramidal cells, organotypic culture, correlative light-electron microscopy

Introduction

Three opioid receptors mu, delta and kappa have been identified that belong to the superfamily of G protein-coupled receptors (GPCR). Together with the endogenous opioid peptides, they form a neuromodulatory system that plays a major role in the control of nociceptive pathways. The opioid system also modulates affective behavior, neuroendocrine physiology, and controls autonomic functions (Kieffer and Evans 2009). Studies performed in rodents revealed that delta opioid receptors are involved in the control of emotional responses, including anxiety levels and depressive-like behaviors (Filliol *et al.* 2000) but are also involved in spatial memory (Robles *et al.* 2003). In addition, increasing evidence also emphasize their implication in drug-context associations using pavlovian place conditioning (Shippenberg *et al.* 2009; Le Merrer *et al.* 2010) or context-induced reinstatement to drug seeking in rats trained to self-administer alcohol (Ciccocioppo *et al.* 2002; Marinelli *et al.* 2009). Implication of the dorsal hippocampus in these behaviors has long been recognized (Burgess 2008; Rudy 2009).

Delta receptor expression in hippocampal GABAergic interneurons is long established both in rats and mice based on immunohistochemistry (Bausch *et al.* 1995; Commons and Milner 1996; Commons and Milner 1997), *in situ* hybridization (Stumm *et al.* 2004) and electrophysiological (Lupica 1995; Svoboda *et al.* 1999) data. Expression in the Ammon's horn principal cells has also been reported in the rat hippocampus. Indeed, low levels of mRNA transcript were detected in pyramidal cells, identified by vGLUT1 labeling (Stumm *et al.* 2004). Immunohistochemical detection of delta receptors was also reported in rat pyramidal cells (Commons and Milner 1997). Recently, this expression was shown to differ between males and females and to be controlled by the hormonal balance (Williams *et al.* 2011). In mice, however, immunoreactivity related to delta receptors was only found associated with GABA positive cell bodies and with GABA positive processes surrounding both GABA-positive and GABA-negative cell bodies suggesting that they would not be present in principal cells may be different in mice and rats.

Our laboratory has developed knock-in mice expressing the delta opioid receptor in fusion with the enhanced green fluorescent protein (DOR-eGFP) (Scherrer *et al.* 2006). These mice express the fluorescent fusion under the control of the endogenous delta promoter at physiological level and, eGFP fusion to the receptor did not produce detectable alteration in mouse behavior. Hence, these mice were successfully used to visualize receptor distribution under basal conditions and to evaluate receptor response to acute and chronic delta agonist administration (Scherrer *et al.* 2006; Pradhan *et al.* 2009; Pradhan *et al.* 2010). In addition, they represent a tool of choice to address the neuroanatomical distribution of delta opioid receptors. We previously examined delta opioid receptor distribution throughout the different strata of the dorsal hippocampus and identified the populations of interneurons that express the receptor (Erbs *et al.* unpublished). In this report, we used hippocampal organotypic cultures and acute slices from DOR-eGFP mice in combination to fluorescence confocal imaging and electron microscopy to more specifically address delta receptor expression in glutamatergic pyramidal cells.

Material and Methods

Animals

Knock-in mice DOR-eGFP, expressing delta opioid receptor coupled to a green fluorescent protein were generated by homologous recombination. In these mice, the eGFP cDNA was introduced into exon 3 of the delta opioid receptor gene, in frame and 5' from the stop codon (Scherrer *et al.* 2006). Wild-type mice were used as control. The genetic background of all mice was c57/bl6J:129svPas (50:50 %). Mice were housed in a temperature- and humidity-controlled animal facility ($21 \pm 2 \circ C$, $45 \pm 5 \%$ humidity) on a 12 h dark-light cycle with food and water *ad libitum*. Both male and female mice were used. All experiments were performed in accordance with the European Communities Council Directive of 26 May 2010 and approved by the local ethical committee (Com'Eth 2010-003).

Material

Rabbit polyclonal primary antibodies directed against the green fluorescent protein (Molecular Probes A6455) or against the AMPA glutamate receptor subunit 1 (GluR1) (Abcam 31232) were used at a 1:1000 dilution and rabbit polyclonal primary antibodies directed against synaptophysin (Synaptic Systems 101002) were used at a 1:100 dilution. Mouse monoclonal primary antibodies directed against synaptotagmin (clone 1D12 (Martin-Moutot *et al.* 1993)) or against the post-synaptic density protein 95 (PSD95) (Millipore MAB1596) were used at a 1:1000 and 1:100 dilution respectively. The anti Calbindin D-28K (Swant 300) was used at a 1:1000 dilution. Anti rabbit AlexaFluor 488 or 594 conjugated secondary antibodies (Molecular Probes) were used at a 1:2000 dilution and anti mouse AlexaFluor 594 conjugated secondary antibodies (Molecular Probes) were used at 1:500 dilution. All reagents were from Sigma.

Organotypic culture and acute hippocampal slice preparation

DOR-eGFP knock-in pups (aged 4-9 days) were used for organotypic hippocampal slice cultures that were prepared as previously described (Gogolla *et al.* 2006). Slices were then fixed for 30

minutes at 37°C in paraformaldehyde (PFA) 4% in phosphate buffer (PB) 0.1M pH 7.4 containing 0. 5% Triton X 100.

Mice (aged 4 weeks) were anaesthetized with ketamine/xylazine (100/10 mg/kg, i.p.) and perfused intracardiacally with 10 ml PB 0.1M pH 7.4 followed by 50 ml of 4% paraformaldehyde (PFA) (at 2-4°C) in PB 0.1M or PBS 1X (Dulbecco's Phosphate Buffer Saline, Sigma Aldrich), pH 7.4. Brains were post-fixed for 1 hour at 4°C in 4% PFA solution. 60 μ M thick acute brain sections were cut with a vibratome (Leica VT1000S).

Immunohistochemistry and image acquisition

After fixation, 60μ M coronal sections or organotypic slices were washed three times with PB pH 7.4 then incubated in a blocking solution (PB 0.1M pH 7.4, 5% normal goat serum (NGS), 0.5% Triton X100) for 2 hours at room temperature (RT). Incubation with the primary antibodies was performed overnight under shaking at 4°C in the blocking solution. Following three washes with PB 0.1M pH 7.4, 0.5% Triton X100, sections were incubated with AlexaFluor conjugated secondary antibodies for 2 hours at RT. Samples were washed three times with PB 0.1M pH 7.4 and mounted with Mowiol and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (0.5 μ g/ml). Samples were observed with a confocal microscope (SP2RS, Leica) using 40x (NA: 1.25) and 63x (NA: 1.4) objectives with the LCS (Leica) software for image acquisition. Confocal acquisitions were performed in the sequential mode (single excitation beams: 405, 488 and 568 nm) to avoid potential crosstalk between the different fluorescence emissions.

DOR-eGFP intracellular localization by correlative light-electron microscopy

We used a correlative light-electron microscopy approach to identify neurons of interest by GFP fluorescence in confocal microscopy and then used immunogold pre-embedding technique for electron microscopy to label DOR-eGFP in 100 μ M thick brain sections (Schikorski). Mice (aged 8-12 weeks) were anaesthetized with ketamine/xylazine (100/10 mg/kg, i.p.) and perfused intracardiacally with 100 ml of 4% PFA at 2-4°C in PB 0.1M, pH 7.4 with 0.1% glutaraldehyde at a fast flow rate

of 20mL/min. Brains were post-fixed for 2 hours at 4°C in 4% PFA solution. 100 μ M thick brain sections were cut with a vibratome (Leica VT1000S). Sections were manually dissected into thin lamellae that were approximately 100 μ m thick, 500 μ m wide and 2 mm long, washed in glycine 150mM PB 0.1M pH 7.4 solution, and neurons of interest were localized with confocal microscope. Lamellae were then washed 3 times 5 minutes in HBS 1X pH 7.4 (Hepes buffer saline: 154mM NaCl, 0.2mM CaCl2 and 20mM Hepes-NaOH Sigma in H₂O mQ) and permeabilized for 30 minutes in a 10% BSA, 0.025% TritonX100, HBS 1X pH 7.4 solution. Then, samples were incubated over-night at 4°C with anti-GFP antibodies (1/1000, Invitrogen) in 1% BSA, 0.0025% TritonX100, HBS 1X pH 7.4 solution. After 3 washes of 5 minutes in 0.05% BSA, HBS 1X pH 7.4, samples were incubated overnight at 4°C in anti-rabbit secondary antibodies coupled to ultra-small immunogold particles 0.8nm (1/200, Aurion) diluted in 2% FSG, 1% BSA-c, 0.0025% TritonX100, HBS 1X pH 7.4 solution. After 3 washes of 5 minutes in HBS 1X pH7.4, samples were post-fixed in 1% glutaraldehyde HBS 1X pH 7.4 solution for 10 minutes. Lamellae were then washed 2 times 5 minutes in HBS 1X pH 7.4 and 3 times 5 minutes in H₂O mQ before silver enhancement (gold particle size raised to 10-15 nm) for transmission electron microscope (TEM) observation. Samples were incubated with silver enhancement reagents (R-Gent SE-EM, Aurion) for 40 minutes in a light-protected place and washed at least 5 times 5 to 10 minutes with H_2O mQ to eliminate unfixed silver reagents. Samples were then post-fixed in 0.5% Osmium (OsO₄) in H_2O for 10 minutes to fix and contrast membranes. After three washes of 5 minutes in H₂O, lamellae were transferred in 2mL eppendorf tubes for dehydration and embedding in epoxy resin for ultra-microtome cutting (Leica Ultracut UCT).

Sections were observed with a Philips CM12 transmission electron microscope operated at 80 kV. Images were acquired with an Orius 1000 CCD camera (Gatan). Observation was restricted to neurons located in the first 2 to 5 μ m of the hippocampal lamellae for optimal antibody labeling. The presence of labeled profiles was verified by examining serial tissue sections. Three samples were analyzed per condition.

Image analysis

Profiles were considered to be immunogold-labeled when they contained one or more gold

particles. 89 profiles were counted. Soma of principal cells were distinguished by the presence of a large nucleus and narrow cytoplasm. Dendritic projections from interneurons located within the pyramidal layer were recognized by their size (mean width: $0.9 \,\mu$ m) and by correlation with confocal images. Axon terminals were also identified by size (at least 0.2 μ m diameter) and the presence of synaptic vesicles and mitochondria. Synapses were defined as either symmetric or asymmetric, according to the presence of either thin or thick postsynaptic specializations respectively.

Results and Discussion

In a previous work, we investigated delta opioid receptor distribution throughout the hippocampus using DOR-eGFP knock-in mice. Our results evidenced that DOR-eGFP fluorescence was mainly associated with GABAergic interneurons, mostly of the somatostatin or parvalbumin positive types (Erbs *et al.* unpublished). Here, we examined DOR-eGFP distribution in the pyramidal layer in more details to determine its possible expression in glutamatergic principal cells. For this purpose, we analyzed DOR-eGFP subcellular localization by fluorescence and electron microscopy. We also compared data from acute brain slices (Figure 1 A) that retain neuronal connections similar to the *in vivo* situation as well as organotypic cultures. In the latter, the general hippocampal architecture is preserved (Figure 1 B) and plasticity of neuronal circuits can be evaluated for several weeks *in vitro* (Noraberg *et al.* 2005; Gogolla *et al.* 2006; Del Turco and Deller 2007; Lossi *et al.* 2009).

We first examined DOR-eGFP distribution in the pyramidal layer by fluorescence confocal imaging. DOR-eGFP expressing neurons always presented a morphology that was clearly distinct from principal cells and no co-localization between calbindin positive pyramidal cells and DOR-eGFP was observed (Figure 1 C, D). In addition, the fluorescent signal associated with DOR-eGFP was only detected on the periphery of principal cells. These data are in agreement with a previous immunohistochemical study where mouse delta opioid were only detected in GABAergic interneurons and GABA positive processes surrounding both GABA-positive and GABA-negative cells bodies suggesting that they are not expressed in principal cells (Bausch *et al.* 1995). Similarly, Cahill *et al.* (Cahill *et al.* 2001) reported few intensely labeled neurons distributed within the rat pyramidal layer based on immunohistochemical data using two antibodies directed against the N-terminus or the C-terminus of delta opioid receptors.

Immunohistochemical co-localization of the fluorescent DOR-eGFP fusion with specific markers was then performed to further assess pre- and post-synaptic distributions of delta opioid receptors in the principal cell layer. Synaptotagmin and synaptophysin are part of the SNARE complex involved in presynaptic neurotransmitter release (Bonanomi *et al.* 2006). Extensive co-localization with DOR-eGFP was observed in acute slices (Figure 2 A, B) as well as organotypic

cultures (Figure 2 D, E) clearly pointing to a localization in presynaptic terminals contacting pyramidal cells. The post-synaptic density protein 95 (PSD 95) as well as the GluR1 subunit of AMPA receptors are, on the other hand, prototypical proteins from the postsynaptic compartments (Shiraishi *et al.* 2003). No co-localization with DOR-eGFP was observed by confocal imaging in brain slices (Figure 2 C) nor in organotypic cultures (Figure 2 F). Altogether, data strongly suggest that delta opioid receptors in the pyramidal layer are mainly expressed in presynaptic afferences corresponding to GABAergic projections on glutamatergic principal cells. This distribution is in agreement with electrophysiological studies performed in rats that also identified delta opioid receptors in interneurons (Lupica *et al.* 1992; Lupica 1995; Svoboda *et al.* 1999). Local GABAergic interneurons are known to modulate the spike timing of principal cells and synchronize their activity, delta receptors expressed in these neurons therefore modify GABAergic inhibition and, hence dynamically influence local hippocampal connectivity and glutamatergic neuron firing rate (Klausberger 2009).

We then investigated subcellular delta opioid receptor distribution by electron microscopy. We took advantage of the fluorescent DOR-eGFP construct to perform correlative light-electron microscopy. eGFP fluorescence as well as surrounding non fluorescent landmarks were identified restricting further processing to the neuron of interest (Figure 3). This approach has already been successfully used to locate DOR-eGFP receptors in GABAergic interneurons (Faget *et al.* unpublished). Within the pyramidal layer, gold particles were distributed among three distinct profiles: dendritic processes from interneurons (Figure 4 A), axonic presynaptic boutons (Figure 4 B, C) and pyramidal cells (Figure 4 D,). No gold labeling was visible in wild-type mice confirming the specificity of our GFP detection (Figure 4 F). A substantial amount of DOR-eGFP proteins was observed in pre-synaptic terminals contacting pyramidal cells (71%) (Table 1). The remaining gold particles were mostly identified in dendrites from interneurons (22%).

On the other hand, only few DOR-eGFP proteins (7%) were detected in the soma of pyramidal cells (Table 1) that were all located in the Golgi apparatus or vesicular compartments that could be related to Golgi export (Figure 4 D, E). A previous report in rat also mentioned receptor cytoplasmic localization in glutamatergic cells (Commons and Milner 1997) suggesting that, in both species, delta opioid receptors located in principal cell bodies are not functional. This hypothesis is supported by

electrophysiological data collected in rats reporting no direct opioid effect on principal cell membrane properties (Madamba *et al.* 1999) though weak mRNA content was detected by in situ hybridization (Stumm *et al.* 2004). However, the latter does not necessarily reflect the actual protein content nor the receptor subcellular distribution. Interestingly, a recent report pointed to a hormonal regulation of both receptor expression and cellular trafficking in rat pyramidal cells which may impact the hippocampal function (Williams *et al.* 2011).

In conclusion, our results confirm that, in the pyramidal layer, delta opioid receptors are mostly present in interneurons with little receptor expression in principal cells. Therefore, data point to a receptor distribution in mice similar to what has been previously reported in rats. Receptor intracellular localization in glutamatergic principal cells also suggests that, under basal conditions, only presynaptic receptors present in interneurons innervating pyramidal cells are functional. Since GABAergic neuronal populations modulate principal cell firing rate, it emphasizes the participation of delta opioid receptors in the dynamic regulation of hippocampal activity.

Acknowledgements

We are grateful to NIDA for supporting the Center for Opioid Receptors and Drugs of Abuse (#DA 005010). We also acknowledge funding from ANR, CNRS, INSERM and University Strasbourg. LF was a recipient of a fellowship of region Alsace.

References

[1] B.L. Kieffer, C.J. Evans, Opioid receptors: from binding sites to visible molecules in vivo, Neuropharmacology 56 Suppl 1 (2009) 205-212.

[2] D. Filliol, S. Ghozland, J. Chluba, M. Martin, H.W. Matthes, F. Simonin, K. Befort, C. Gaveriaux-Ruff, A. Dierich, M. LeMeur, O. Valverde, R. Maldonado, B.L. Kieffer, Mice deficient for delta- and mu-opioid receptors exhibit opposing alterations of emotional responses, Nat Genet 25 (2000) 195-200.

[3] Y. Robles, P.E. Vivas-Mejia, H.G. Ortiz-Zuazaga, J. Felix, X. Ramos, S. Pena de Ortiz,
Hippocampal gene expression profiling in spatial discrimination learning, Neurobiol Learn Mem 80
(2003) 80-95.

[4] T.S. Shippenberg, V.I. Chefer, A.C. Thompson, Delta-opioid receptor antagonists prevent sensitization to the conditioned rewarding effects of morphine, Biol Psychiatry 65 (2009) 169-174.

[5] J. Le Merrer, A. Plaza-Zabala, C.D. Boca, A. Matifas, R. Maldonado, B.L. Kieffer, Deletion of the delta Opioid Receptor Gene Impairs Place Conditioning But Preserves Morphine Reinforcement, Biol Psychiatry (2010).

[6] R. Ciccocioppo, R. Martin-Fardon, F. Weiss, Effect of selective blockade of mu(1) or delta opioid receptors on reinstatement of alcohol-seeking behavior by drug-associated stimuli in rats, Neuropsychopharmacology 27 (2002) 391-399.

[7] P.W. Marinelli, D. Funk, S. Harding, Z. Li, W. Juzytsch, A.D. Le, Roles of opioid receptor subtypes in mediating alcohol-seeking induced by discrete cues and context, Eur J Neurosci 30 (2009) 671-678.

[8] N. Burgess, Spatial cognition and the brain, Ann N Y Acad Sci 1124 (2008) 77-97.

[9] J.W. Rudy, Context representations, context functions, and the parahippocampal-hippocampal system, Learn Mem 16 (2009) 573-585.

[10] K.G. Commons, T.A. Milner, Cellular and subcellular localization of delta opioid receptor immunoreactivity in the rat dentate gyrus, Brain Res 738 (1996) 181-195.

[11] K.G. Commons, T.A. Milner, Localization of delta opioid receptor immunoreactivity in interneurons and pyramidal cells in the rat hippocampus, J Comp Neurol 381 (1997) 373-387.

[12] S.B. Bausch, T.A. Patterson, S.M. Appleyard, C. Chavkin, Immunocytochemical localization of delta opioid receptors in mouse brain, J Chem Neuroanat 8 (1995) 175-189.

[13] R.K. Stumm, C. Zhou, S. Schulz, V. Hollt, Neuronal types expressing mu- and delta-opioid receptor mRNA in the rat hippocampal formation, J Comp Neurol 469 (2004) 107-118.

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

[15] K.R. Svoboda, C.E. Adams, C.R. Lupica, Opioid receptor subtype expression defines morphologically distinct classes of hippocampal interneurons, J Neurosci 19 (1999) 85-95.

[16] T.J. Williams, A. Torres-Reveron, J.D. Chapleau, T.A. Milner, Hormonal regulation of delta opioid receptor immunoreactivity in interneurons and pyramidal cells in the rat hippocampus, Neurobiol Learn Mem 95 (2011) 206-220.

[17] G. Scherrer, P. Tryoen-Toth, D. Filliol, A. Matifas, D. Laustriat, Y.Q. Cao, A.I. Basbaum, A. Dierich, J.L. Vonesh, C. Gaveriaux-Ruff, B.L. Kieffer, Knockin mice expressing fluorescent delta-opioid receptors uncover G protein-coupled receptor dynamics in vivo, Proc Natl Acad Sci U S A 103 (2006) 9691-9696.

[18] A.A. Pradhan, W. Walwyn, C. Nozaki, D. Filliol, E. Erbs, A. Matifas, C. Evans, B.L. Kieffer, Ligand-directed trafficking of the delta-opioid receptor in vivo: two paths toward analgesic tolerance, J Neurosci 30 (2010) 16459-16468.

[19] A.A. Pradhan, J.A. Becker, G. Scherrer, P. Tryoen-Toth, D. Filliol, A. Matifas, D. Massotte, C. Gaveriaux-Ruff, B.L. Kieffer, In vivo delta opioid receptor internalization controls behavioral effects of agonists, PLoS ONE 4 (2009) e5425.

[20] N. Martin-Moutot, O. el Far, C. Leveque, P. David, B. Marqueze, B. Lang, J. Newsom-Davis, T.
Hoshino, M. Takahashi, M.J. Seagar, Synaptotagmin: a Lambert-Eaton myasthenic syndrome antigen that associates with presynaptic calcium channels, J Physiol Paris 87 (1993) 37-41.

[21] N. Gogolla, I. Galimberti, V. DePaola, P. Caroni, Preparation of organotypic hippocampal slice cultures for long-term live imaging, Nat Protoc 1 (2006) 1165-1171.

[22] T. Schikorski, Pre-embedding immunogold localization of antigens in mammalian brain slices, Methods Mol Biol 657 133-144.

[23] N. Gogolla, I. Galimberti, V. DePaola, P. Caroni, Long-term live imaging of neuronal circuits in organotypic hippocampal slice cultures, Nat Protoc 1 (2006) 1223-1226.

[24] L. Lossi, S. Alasia, C. Salio, A. Merighi, Cell death and proliferation in acute slices and organotypic cultures of mammalian CNS, Prog Neurobiol 88 (2009) 221-245.

[25] D. Del Turco, T. Deller, Organotypic entorhino-hippocampal slice cultures--a tool to study the molecular and cellular regulation of axonal regeneration and collateral sprouting in vitro, Methods Mol Biol 399 (2007) 55-66.

[26] J. Noraberg, F.R. Poulsen, M. Blaabjerg, B.W. Kristensen, C. Bonde, M. Montero, M. Meyer, J.B. Gramsbergen, J. Zimmer, Organotypic hippocampal slice cultures for studies of brain damage, neuroprotection and neurorepair, Curr Drug Targets CNS Neurol Disord 4 (2005) 435-452.

[27] C.M. Cahill, K.A. McClellan, A. Morinville, C. Hoffert, D. Hubatsch, D. O'Donnell, A. Beaudet, Immunohistochemical distribution of delta opioid receptors in the rat central nervous system: evidence for somatodendritic labeling and antigen-specific cellular compartmentalization, J Comp Neurol 440 (2001) 65-84.

[28] D. Bonanomi, F. Benfenati, F. Valtorta, Protein sorting in the synaptic vesicle life cycle, Prog Neurobiol 80 (2006) 177-217.

[29] Y. Shiraishi, A. Mizutani, K. Mikoshiba, T. Furuichi, Coincidence in dendritic clustering and synaptic targeting of homer proteins and NMDA receptor complex proteins NR2B and PSD95 during development of cultured hippocampal neurons, Mol Cell Neurosci 22 (2003) 188-201.

[30] C.R. Lupica, W.R. Proctor, T.V. Dunwiddie, Dissociation of mu and delta opioid receptormediated reductions in evoked and spontaneous synaptic inhibition in the rat hippocampus in vitro, Brain Res 593 (1992) 226-238.

[31] T. Klausberger, GABAergic interneurons targeting dendrites of pyramidal cells in the CA1 area of the hippocampus, Eur J Neurosci 30 (2009) 947-957.

[32] S.G. Madamba, P. Schweitzer, G.R. Siggins, Dynorphin selectively augments the M-current in hippocampal CA1 neurons by an opiate receptor mechanism, J Neurophysiol 82 (1999) 1768-1775.

Table 1

DOR-eGFP subcellular distribution in the pyramidal layer.

Immunogold particles were counted in axonic terminals, pyramidal cells and GABAergic dendrites (n=89) in three different subcellular compartments: membrane, intracellular vesicles and Golgi apparatus. Distribution among the subcellular compartments is expressed as a percentage of the number of gold particles in each profile and distribution among the three different profiles is expressed as a percentage of the total number of gold particles (n=160).

Profile type	Subcellular compartments	% immunogoldparticles (vs. profile)	% immunogoldparticles (vs. total)
	Membrane	30 % (34/113)	
Axonic terminals	Vesicles	70 % (79/113)	71% (113/160)
	Golgi	0 % (0/113)	
	Membrane	0 % (0/11)	
Pyramidal cells	Vesicles	45% (5/11)	7% (11/160)
	Golgi	55 % (6/11)	
	Membrane	44% (16/36)	
GABAergic dendrites	Vesicles	44% (16/36)	22% (36/160)
	Golgi	11% (4/36)	

Figure legends

Figure 1: DOR-eGFP expression in hippocampal acute brain slices and organotypic cultures.

Immunohistochemical detection of DOR-eGFP confirms that the general hippocampal architecture (A) is retained in organotypic cultures (B). DOR-eGFP expressing neurons (green) do not co-localize with calbindin positive principal cells (red) and exhibit a distinct morphology (C-D). Scale bars 100 µm (A-B) and 20 µm (C-D).

Figure 2: Presynaptic DOR-eGFP expression in the pyramidal layer of hippocampal acute slice or organotypic culture.

Representative confocal fluorescence photomicrographs in organotypic cultures (A-C) and acute brain slices (D-F). DOR-eGFP (green) co-localizes (white arrows) with the presynaptic markers (red) synaptophysin (A, D) or synaptotagmin (B, E) but not with the postsynaptic markers (red) PSD95 (C) or GluR1 (F). Scale bars 10 µm.

Figure 3: Correlative light-electron microscopy (CLEM) methodology

Diagram illustrating the different steps of the CLEM procedure. Brain sections (100 μ m) fixed with paraformaldehyde are dissected in thin lamellae at the level of the dorsal hippocampus. This enables optimal mapping and neuron identification by confocal microscopy. eGFP labeling is then performed using immunogold pre-embedding technique. Principal cells of the pyramidal layer (red arrows) together with surrounding non fluorescent landmarks (yellow arrow heads) can be identified throughout the procedure restricting electron microscope processing to the neuron of interest.

Figure 4: DOR-eGFP immunogold staining in the pyramidal layer is present in GABAergic dendrites, axonic terminals and intracellular compartments of principal cells.

A. Dendritic projections from GABAergic neurons in the pyramidal layer (white arrows) are identified by confocal fluorescence (1) and electron microscopy (2). DOR-eGFP immunogold labeling is visible at the plasmamembrane and in intracellular vesicles (black arrows) (3). Gold particles are also present in a presynaptic terminal connecting the dendrite (black arrow head). B and C. Axonic terminals recognizable by the presence of dense vesicles and mitochondria show DOR-eGFP immunogold labeling at the synapse and in intracellular vesicles (black arrow heads).

D and E. In pyramidal cells, DOR-eGFP immunogold labeling is present in the Golgi apparatus and vesicular compartments close to it (white arrows). DOR-eGFP immunogold labeling is also visible at the level of synaptic contacts (black arrow heads).

F. Representative electron micrograph showing the absence of gold particles in a hippocampal ultrathin section of a wild-type animal.

Scale bars 500 nm (A, C and E) and 200 nm (B and D).


Figure 1





Transmission electron microscope (TEM) observation

Fig 4

Toluidine blue coloration



DISCUSSION

L'objectif de ma thèse était d'étudier le fonctionnement du récepteur delta aux opioïdes dans le réseau hippocampique natif, avec une attention particulière portée sur l'activation et l'internalisation physiologique de ce récepteur. Pour ce faire, nous avons utilisé un système classiquement utilisé pour étudier la physiologie d'un réseau : la tranche aiguë.

1. Validation du système

La première étape de cette étude consistait à valider le système de tranche aiguë hippocampique de souris DOR-eGFP, comme modèle d'étude de l'activation et de l'internalisation du récepteur delta.

1.1. Activation du récepteur delta

L'activation du récepteur delta dans la région CA1 de l'hippocampe n'avait, à notre connaissance, jamais été étudiée en tranche aiguë de souris auparavant. En revanche l'effet des opioïdes dans le CA1 est bien documenté chez le rat, où de nombreuses études ont montré la désinhibition des cellules pyramidales provoquée par l'application d'enképhalines (Dunwiddie et al. 1980; Lee et al. 1980; Williams et al. 1982; Madison and Nicoll 1988). Cet effet de désinhibition peut être produit par l'activation de chacun des deux types de récepteurs, comme cela a été montré dans des expériences utilisant des agonistes plus sélectifs des récepteurs mu et delta (DPDPE, deltorphine II, DAGO) (Lupica 1995). Nos résultats ont montré un effet similaire chez la souris sauvage, à savoir une diminution de l'inhibition spontanée reçue par les cellules pyramidales provoquée par l'activation des récepteurs delta (Fig 2). En effet, cette inhibition est absente chez les souris invalidées pour le gène codant pour le récepteur delta. Cet effet, consiste donc en une inhibition des interneurones exprimant le récepteur delta, et est identique dans les tranches obtenues à partir de souris exprimant la fusion et dans celles exprimant le récepteur natif. Ainsi la fusion n'altère pas la réponse électrophysiologique produite par l'activation du récepteur en tranche aiguë hippocampique, ce qui valide l'utilisation de la souris DOR-eGFP comme modèle d'étude de l'activation du récepteur natif.

1.2. Internalisation du récepteur delta

La validation du système de tranche pour l'étude de l'internalisation, implique de retrouver dans ce système, les caractéristiques fondamentales démontrées *in vivo* à savoir (1) une localisation membranaire du récepteur à l'état basal et (2) une internalisation rapide en vésicules après activation pharmacologique par un agoniste (Scherrer *et al.* 2006; Pradhan *et al.* 2009).

L'utilisation de la souris DOR-eGFP nous a permis de mettre en évidence une internalisation spontanée de DOR-eGFP au cours de la préparation des tranches aiguës. L'internalisation étant conditionnée par l'activation du récepteur (Cahill *et al.* 2007), elle est vraisemblablement due a une libération d'agonistes endogènes par des neurones activés au cours de la préparation des tranches, de façon directe (dépolarisation induite par les conditions d'ischémie) puis indirecte (dépolarisation accrue par le glutamate libéré par les cellules principales). Différentes stratégies ont été testées aboutissant à l'utilisation d'un protocole préservant la localisation membranaire de DOR-eGFP (Fig1), première condition de validation de notre système.

Dans les tranches aiguës, l'application en bain mais aussi locale (dendritique) d'agonistes du récepteur delta est capables d'induire une internalisation massive du récepteur dans des vésicules, selon le profil décrit *in vivo* après injection systémique d'une dose importante d'agoniste (Scherrer *et al.* 2006; Pradhan *et al.* 2009). Ceci valide donc l'utilisation de la tranche aiguë comme système d'étude de l'internalisation du récepteur delta.

2. Vers une internalisation « physiologique» du récepteur en tranche

2.1. Internalisation et nature de l'agoniste

Dans les expériences que nous avons réalisées en cultures primaires la comparaison de l'internalisation induite par un agoniste alcaloïde et des agonistes peptidiques (deltorphine II, met-enképhaline), n'a montré aucune différence sur le profil d'internalisation. Tous sont capables d'induire une internalisation massive de DOR-eGFP, qui mène à la déplétion apparente de la membrane en récepteurs, et à leur dégradation dans les lysosomes. Cette observation

marque une différence entre nos résultats et ceux de la littérature, obtenus en neuroblastomes, où l'internalisation et le devenir post-endocytique des récepteurs delta humains varie selon qu'ils ont été activés par du SNC 80 ou des enképhalines (Lecoq *et al.* 2004). Ces différences peuvent provenir des systèmes d'études différents (interneurone exprimant le récepteur murin, et neuroblastome exprimant le récepteur humain). En tranche aiguë, cependant, le SNC 80 n'induit pas d'internalisation. A l'opposé, le BW 373U86, un autre agoniste alcaloïde, induit l'internalisation du récepteur ce qui suggère que la nature alcaloïde du SNC 80 n'est pas en cause (voir partie résultats).

2.2. Internalisation et compartiment cellulaire

Le récepteur delta est présent sur la totalité de la membrane plasmique des interneurones qui l'expriment (Scherrer et al. 2006) alors que son activation en conditions physiologiques a vraisemblablement lieu au niveau des contacts synaptiques issus des afférences opioïdergiques. En ce sens, une application en bain induit une activation généralisée sur tout le neurone, qui est loin de reproduire le caractère focalisé (spatialement et temporellement) d'une activation endogène. Nous avons donc effectué des applications locales d'agonistes en tranche et n'avons pas été capables d'induire une internalisation massive de DOR-eGFP lorsque l'application locale se fait au niveau du soma de l'interneurone. Ces expériences doivent être complétées, et comparées avec la situation en cultures neuronales qui apporte des éléments complémentaires dans la mesure où la diffusion de l'agoniste dans le milieu extracellulaire est beaucoup mieux contrôlée qu'en tranche, mais où l'organisation en réseau est perdue. Dans la littérature, une différence de désensibilisation entre compartiment somato-dendritique et axone de neurones d'hippocampe a déjà été mise en évidence dans le cas du récepteur A1 à l'adénosine (Wetherington and Lambert 2002) mais ce récepteur internalise via un mécanisme différent impliquant les cavéoles (Escriche et al. 2003). Pour confirmer notre observation, il faudrait déterminer le mécanisme à l'origine de la différence entre les compartiments cellulaires somatiques et dendritiques. Nous avons vu que l'internalisation des récepteurs delta dépend de la phosphorylation du récepteur, notamment par les GRK2, et du recrutement des arrestines 1 et 2 (Zhang et al. 2005; Zhang et al. 2008). De plus, il a été montré que GRK2, initialement cytosolique, est recrutée à la membrane par la sous unité G β/γ pour interagir avec le récepteur activé (Li et al. 2003), son recrutement est donc identifiable par immunocytochimie. Nous effectuerons donc des expériences d'application locale d'agoniste en cultures primaires associées à des marquages immunocytochimiques de la forme phosphorylée (Ser 363) du récepteur delta (Kouhen *et al.* 2000), des GRK2 et arrestines 1 et 2.

2.3. Internalisation et concentration en agoniste

L'application en bain de différents agonistes au niveau des cultures neuronales hippocampo-striatales a montré une internalisation massive induite par différents agonistes à la concentration de 100nM, reproduisant ainsi le profil d'internalisation déjà décrit dans la littérature (Scherrer *et al.* 2006). En abaissant la concentration d'agoniste appliqué à 5 ou 10nM, nous avons pu observer une internalisation plus subtile de DOR-eGFP, parfois représentés uniquement par de simples mouvements de fluorescence à la membrane, ayant pour point commun la préservation d'une certaine quantité de récepteurs membranaires. Ceci est en accord avec la littérature, qui montre une internalisation dépendante de la concentration des agonistes *in vivo* dans le cas du récepteur delta (Scherrer *et al.* 2006) mais aussi en tranche dans le cas du récepteur mu (Arttamangkul *et al.* 2008).

L'observation de tranches après application en bain d'agoniste à 500nM montre une très faible proportion d'interneurones présentant des récepteurs internalisés. Ces neurones sont localisés plutôt en surface de tranche, suggérant l'existence d'un gradient de concentration déterminé par la pénétration de l'agoniste. Mais l'observation de tranche fixée ne permet pas de distinguer de subtils mouvements membranaires de récepteurs tels qu'ils ont été observés en culture neuronale, et qui pourraient pourtant avoir lieu dans les neurones de la tranche percevant une concentration moindre d'agoniste. Rien ne nous permet de connaître la proportion d'interneurones dans lesquels les récepteurs sont activés par une telle application d'agoniste, mais nos expériences d'électrophysiologie démontrent qu'une telle application induit une baisse moyenne de 50% de la totalité des événements inhibiteurs reçus par les cellules pyramidales enregistrées ce qui représente un effet massif à l'échelle du réseau. Un argument supplémentaire est apporté par des expériences menées sur le récepteur mu en tranche aiguë de locus coeruleus. Celles-ci montrent en effet que l'ouverture de conductances potassiques associées à l'activation du récepteur mu est déjà importante lors d'application de metenképhaline à des concentrations qui sont insuffisantes pour induire une internalisation visible du récepteur mu (fusionné à une séquence permettant son identification par immunomarquage : FLAGMOR) (Arttamangkul et al. 2008).

Lors d'application locale dendritique d'agoniste, nos expériences ont montré qu'une forte concentration d'agoniste (1 mM) est nécessaire pour induire l'internalisation de DOR-eGFP. Ceci peut paraître une concentration élevée. Toutefois, en situation physiologique, la concentration de neurotransmetteur dans une fente synaptique peut atteindre plusieurs mM (Kuffler and Yoshikami 1975). De ce fait, la concentration élevée nécessaire à l'activation du récepteur lors d'une application locale est peut être rendue nécessaire par sa présence extrêmement limitée, à la fois spatialement et temporellement (50ms) à proximité du récepteur. D'autre part, 1 μM d'agoniste appliqué localement au niveau dendritique est insuffisant pour induire une internalisation détectable du récepteur. Or, selon l'étude menée in vivo sur la souris DOR-eGFP (Scherrer et al. 2006), une concentration de SNC80 produisant un effet comportemental (hyperlocomotion) induit également une internalisation des récepteurs. Et inversement, une concentration de SNC80 trop faible pour induire un effet comportemental n'induit pas non plus d'internalisation du récepteur delta, montrant ainsi le couplage entre activation du récepteur et internalisation. Selon cette observation, dans notre cas, 1 µM d'agoniste appliqué localement au niveau dendritique ne serait pas suffisant pour activer le récepteur puisque insuffisant pour induire son internalisation. Toutefois, les expériences d'électrophysiologie (Figure supplémentaire 3) ont montré qu'une application locale de deltorphine II à 500nM juste au dessus de la tranche, au niveau de la stratum pyramidale, est capable d'induire l'effet désinhibiteur caractéristique de l'activation du récepteur. Ceci plaide pour une activation efficace, non suivie d'une internalisation du récepteur détectable par nos outils, à des concentrations d'agoniste plus faibles, ce qui pourrait définir une différence de comportement du récepteur en fonction de la façon dont il est activé (injection systémique à forte concentration versus application locale à faible concentration).

Afin de répondre clairement à cette question, il faudrait associer électrophysiologie et microscopie confocale sur tranche aiguë, afin d'identifier des interneurones exprimant DOReGFP et d'enregistrer directement les courants activés dans ces neurones. Ainsi les éventuelles ouvertures de conductances potassiques induites par l'activation du récepteur pourraient être mises en parallèle en temps réel avec les changements de distributions du récepteur au sein des compartiments membranaires et cellulaires. Une approche immunohistochimique marquant spécifiquement le récepteur delta phosphorylé pourrait également être utilisée, afin de vérifier l'état de phosphorylation du récepteur au niveau de la sérine 363.

2.4. Profil particulier d'internalisation « physiologique »

Le profil d'internalisation généré par la libération d'agonistes endogènes observée lors de l'internalisation spontanée intervenant au cours de la préparation des tranches est caractérisé par une fluorescence cytosolique diffuse. Une étude récente de notre laboratoire montre un profil semblable dans certains interneurones de CA1, après une libération endogène de metenképhaline, induite par une situation comportementale particulière (sevrage induit par le contexte) (Faget et al. non publié). Dans cette étude, ce profil de fluorescence cytosolique diffuse est également associé à la préservation d'une fluorescence membranaire, qui la distingue de l'internalisation pharmacologique classiquement décrite. Dans nos expériences, l'utilisation de très faibles concentrations d'agoniste en cultures neuronales, et les expériences préliminaires d'applications locales en tranche, suggèrent également la possibilité d'activer le récepteur delta tout en préservant en grande partie sa présence à la membrane, marquant une différence avec la situation résultant d'une stimulation pharmacologique massive. Cependant, le profil obtenu après libération endogène d'enképhaline n'a pas pu être reproduit, et l'étude du profil d'internalisation « physiologique » nécessite de développer un protocole permettant de stimuler directement (électriquement) un neurone enképhalinergique en contact avec un interneurone exprimant DOR-eGFP pour provoquer la libération de peptides endogènes au niveau synaptique. De telles expériences permettront d'étudier la libération d'opioïdes endogènes et l'internalisation de DOR-eGFP qui en résulte en fonction de différents protocoles de stimulations, Elles permettront d'observer en temps réel l'internalisation physiologique du récepteur et les différentes étapes de cette internalisation pourront alors être caractérisées plus en détail par des marquages immunohistochimiques des partenaires intracellulaires, ou des études biochimiques, et ce en parallèle en tranche aiguës et en culture neuronale. Cette perspective directe de mon travail de thèse dépend toutefois de l'identification des afférence opioïdergiques. Or une souris transgénique exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur de la préproenképhaline (Koshimizu et al. 2008) est disponible au laboratoire, son étude pourra nous aider à mieux caractériser le système opioïde hippocampique. Par ailleurs, cette souris par croisement avec la souris DOR-eGFP permettra d'identifier et de distinguer, en culture neuronale et en tranche aiguë, les neurones enkephalinergiques et ceux exprimant DOR-eGFP.

3. système opioïde et réseau CA1

3.1. Contrôle de l'activité de CA1 par les opioïdes

Grâce aux expériences d'électrophysiologie, nous avons montré l'effet inhibiteur de l'activation des récepteurs delta et mu sur l'inhibition spontanée dans CA1 chez la souris, indiquant un rôle similaire à celui décrit précédemment chez le rat (Zieglgansberger *et al.* 1979; Dunwiddie *et al.* 1980; Lupica *et al.* 1992). Cet effet est également en accord avec le profil de distribution du récepteur delta (Bausch *et al.* 1995; Commons and Milner 1996; Commons and Milner 1997; Stumm *et al.* 2004). En effet, sa co-localisation est majoritaire avec les BC et les AAC, toutes deux situées dans la couche pyramidale et exprimant la parvalbumine. Ces interneurones contactent préférentiellement le soma, la partie proximale du dendrite primaire et le segment initial de l'axone des cellules pyramidales (Klausberger 2009). Ils contrôlent donc intimement l'excitabilité des cellules pyramidales.

3.2. Les afférences de CA1 modulées par les opioïdes

3.2.1. Collatérales de Schaffer

Les études chez le rat avaient montré, sans pouvoir l'expliquer, que l'inhibition évoquée au niveau des cellules pyramidales de CA1 par stimulation des collatérales de Schaffer est diminuée en présence d'agonistes du récepteur mu mais insensible aux agonistes du récepteur delta (Lupica *et al.* 1992; Lupica 1995). L'idée que les interneurones exprimant le récepteur delta sont plutôt recrutés par une autre afférence de CA1 avait d'ailleurs été suggérée sans être démontrée par Lupica et collaborateurs. Nous montrons ici que, chez la souris, les collatérales de Schaffer recrutent les interneurones exprimant le récepteur mu. En revanche, les interneurones exprimant le récepteur delta sont recrutés par une autre afférence de CA1 : la voie temporo-ammonique.



Fig 39. Afférences différentes pour les interneurones exprimants les récepteurs mu et delta. Représentation schématique illustrant le recrutement différent des cellules en panier (BC) expriant les récepteurs mu (rouge) et delta (vert), qui inhibent tout deux la cellule pyramidale (noir).

3.2.2. La voie temporo-ammonique

La voie temporo-ammonique est une branche de la voie perforante. Elle est formée par les axones des cellules principales de la couche III du cortex entorhinal et arrive dans CA1 au niveau du stratum lacunosum-moleculare (Steward and Scoville 1976). Elle forme 90% de ses synapses sur les dendrites distaux des cellules pyramidales, et 10% sur des interneurones (Desmond *et al.* 1994) identifiés comme étant des cellules paniers (BC) et des cellules axo-axoniques (AAC) exprimant la parvalbumine (Kiss *et al.* 1996). Ces derniers expriment les récepteurs mu (Drake and Milner 2002; Stumm *et al.* 2004) et delta (Bausch *et al.* 1995; Commons and Milner 1996; Commons and Milner 1997). En accord avec les données neuroanatomiques, nos résultats montrent une inhibition par les récepteurs mu et delta de l'inhibition exercée par la voie TA sur l'activité des cellules pyramidales.

Cette afférence est essentielle chez l'animal vigile pour la maintenance du rythme thêta hippocampique (Buzsaki *et al.* 1983; Charpak *et al.* 1995), via son action sur les BC et AAC qui filtrent, en inhibant les cellules pyramidales, l'information transmise par les collatérales de Schaffer (Cobb *et al.* 1995; Ylinen *et al.* 1995), une action qui est perturbée fortement par l'activation du récepteur mu (McQuiston 2011). De même le rythme gamma, associé à l'encodage sensoriel au stockage et au rappel de la mémoire, peut être réduit drastiquement, en tranche et *in vivo* suite à l'action inhibitrice d'agonistes du récepteur mu sur les BC (Gulyas *et al.* 2010).

La voie temporo-ammonique a également été associée aux cellules de lieu hippocampique, des cellules pyramidales qui déchargent à haute fréquence uniquement lorsque l'animal est situé dans un lieu bien précis de son environnement (Quirk *et al.* 1992). En effet, les cellules de lieu localisées dans le CA1 restent synchronisées avec d'autres cellules du cortex entorhinal, même après lésion du gyrus denté (McNaughton *et al.* 1989). La synchronisation des cellules de lieu par la voie temporo-ammonique pourrait donc être modulée par l'activation des récepteurs delta dans le CA1. Cet effet pourrait être à l'origine de l'implication du récepteur delta dans l'association drogue-contexte observé *in vivo* (Le Merrer *et al.* 2011).

Nos observations soulignent donc la dissociation entre les effets liés à l'activation des récepteurs mu et delta, (Fig 39) dont le rôle précis reste à décrire, mais qui peut d'ores et déjà être utilisé comme outil pharmacologique pour inhiber spécifiquement l'inhibition associée à la voie temporo-ammonique sans modifier celle liée aux collatérales de Schaffer.

3.3.3. Conditions physiologiques pouvant mener à l'activation différentielle de ces deux afférences par les opioïdes.

Le fonctionnement du système opioïde hippocampique ne pourra être réellement compris sans une meilleure caractérisation des afférences opioïdes endogènes. En effet, les opioïdes endogènes ne sont pas sélectifs de l'un ou de l'autre récepteur, et il reste à déterminer si la différence de modulation de l'activité du réseau, liée à l'activation des récepteurs mu et delta, a une signification *in vivo*. Si tel est le cas, les deux sous-populations d'interneurones doivent être activées dans des circonstances différentes. Une première hypothèse serait que les afférences opioïdes activant les deux populations (mu et delta) soient différentes. On peut également envisager que les afférences soient les mêmes, mais que l'activation d'une voie ou de l'autre soit modulée par les propriétés dynamiques différentes des récepteurs mu et delta (Wang *et al.* 2008). La compréhension de ces phénomènes nécessite la localisation précise des neurones libérant les opioïdes endogènes et la description de leurs caractéristiques électrophysiologiques.

Les peptides opioïdes sont exprimés au niveau d'interneurones locaux ou de projection (Gall et al. 1981; Stumm et al. 2004). Jusqu'à présent une seule étude, basée sur l'analyse d'une cellule enképhalinergique identifiée par immunohistochimie (Fuentealba et al. 2008) a décrit les propriétés de décharge de cette cellule in vivo. Cette cellule est gabaergique, située dans CA1 et projette vers des cellules pyramidales et des interneurones préférentiellement parvalbumine positifs du subiculum. Son activité de décharge est corrélée au rythme thêta, et durant des épisodes ondulatoires (ripple episodes), son activité est fortement inhibée. A la fin de ces épisodes en revanche, ces cellules présentent un très fort rebond d'activité (200Hz), qui représente un contexte optimal pour l'induction d'une libération d'enképhaline. Les BC exprimant la parvalbumine et responsables du contrôle de la fréquence de décharge des cellules pyramidales, présentent, quant à elles, une activité inverse au cours d'épisodes d'ondulation (Klausberger and Somogyi 2008). Ainsi cette étude propose un modèle selon lequel la libération d'enképhaline au niveau local serait un des mécanismes contrôlant la coordination entre les sous-régions de l'hippocampe. Un rôle similaire pourrait exister entre le cortex entorhinal et la région CA1 puisque la présence de fibres enképhalinergiques au sein de la voie temporoammonique a été décrite (Gall et al. 1981; Kanamatsu et al. 1986; McGinty et al. 1986).

Ces observations invitent à l'étude de l'action des agonistes du récepteur delta sur les rythmes hippocampiques, et la comparaison avec les effets induits par l'application d'agonistes mu, dans des expériences d'électrophysiologie *in vivo* ou en tranche (Fisahn *et al.* 1998).

Conclusion & perspectives

Le but de mon travail était d'aborder la dynamique du récepteur en temps réel dans le réseau neuronal intégré et d'appréhender son impact sur l'activité neuronale en réponse à une stimulation physiologique. Ceci a été réalisé sur tranches aiguës d'hippocampe de souris knockin DOR-eGFP permettant la visualisation directe du récepteur avec une résolution subcellulaire.

Par une approche électrophysiologique, j'ai pu montrer que le récepteur delta, exprimé au niveau d'interneurones, contrôle intimement l'excitabilité des cellules pyramidales chez la souris. Ce contrôle est effectué par une levée de l'inhibition apportée par la voie temporoammonique. Ceci le différencie du récepteur mu, dont l'activation lève à la fois l'inhibition apportée par cette voie, mais également celle issue des collatérales de Schaffer. Nos données suggèrent donc une modulation différente des afférences excitatrices du CA1 par les récepteurs mu et delta. Afin de comprendre le contexte physiologique gouvernant cette modulation, il est maintenant essentiel de caractériser avec précision la distribution des neurones opioïdergiques susceptibles d'activer ces récepteurs.

Par une approche d'imagerie confocale en temps réel, j'ai exploré directement en réseau intégré les paramètres d'internalisation du récepteur delta. Mes travaux suggèrent que l'internalisation est initiée préférentiellement après activation des récepteurs au niveau dendritique, et montrent qu'une activation du récepteur sans internalisation marquée est possible, en accord avec les données publiées. En revanche, l'induction d'une internalisation « physiologique », associée au profil particulier décrite récemment dans notre laboratoire (Faget et al. Non publié) n'a pu être reproduit après application pharmacologique d'un agoniste, même dans un protocole mimant le plus possible les conditions endogènes d'activation du récepteur (application locale de metenképhaline au niveau des dendrites dans la tranche). La prochaine étape dans la caractérisation de l'internalisation physiologique du récepteur en tranche, repose donc sur l'induction d'une vraie libération physiologique, et passe donc également par l'identification et la stimulation des neurones enképhalinergiques qui projettent vers les neurones exprimant le récepteur delta.

Le croisement de la souris DOR-eGFP avec la souris exprimant l'eGFP sous le contrôle du promoteur de la PENK, offre donc des perspectives pertinentes à la fois pour l'étude de l'internalisation du récepteur delta mais également pour la compréhension de son rôle dans l'hippocampe. Les propriétés de stimulations (amplitude, fréquence) nécessaire à la libération d'enképhalines pourront être facilement examinées en culture primaire par enregistrement des

courants potassiques activés par cette libération au niveau des interneurones DOR-eGFP positifs. En parallèle, l'imagerie en temps réel de l'internalisation induite par ces stimulations, permettra de caractériser le lien entre activation et internalisation visible du récepteur. Une fois les caractéristiques fondamentales de libération des enképhalines déterminées, les études en tranches aiguës permettront 1) de vérifier ces caractéristiques en système intégré et 2) de caractériser leur implication dans le réseau hippocampique. Cette caractérisation pourra se faire pour les neurones de projections, par injection de traceurs neuronaux antérograde dans les différentes structures projetant vers CA1. Pour les neurones locaux, une caractérisation morphologique pourra être faite en parallèle d'une caractérisation électrophysiologique, par remplissage de ces neurones avec une sonde fluorescente au cours d'enregistrements de type « whole-cell ».

Enfin, le rôle physiologique du système opioïde et son impact sur le comportement ne peut se limiter à l'examen des conséquences de stimulation pharmacologiques. Une extension possible de ce projet pourrait inclure une approche par optogénétique. L'obtention d'une souris transgénique dans laquelle la channelrhodopsine serait exprimée dans les neurones enképhalinergiques permettrait la caractérisation des effets comportementaux induits par la libération d'enképhaline dans différentes structures du cerveau activées sélectivement.



PUBLICATION SCIENTIFIQUE ANNEXE

En 2009, j'ai collaboré avec le Dr Yann Humeau, et effectué des enregistrements électrophysiologiques visant a comparer l'excitabilité des cellules pyramidales de CA1 chez des souris sauvages ou possédant la mutation IL1RAPL1, mutation impliquée dans une forme de retard mental. Ce travail à donné lieu à publication :

PMID: 20096586

Curr Biol. 2010 Jan 26;20(2):103-15. Epub 2010 Jan 21.

A postsynaptic signaling pathway that may account for the cognitive defect due to IL1RAPL1 mutation.

Pavlowsky A, Gianfelice A, Pallotto M, Zanchi A, Vara H, Khelfaoui M, Valnegri P, Rezai X, Bassani S, Brambilla D, Kumpost J, Blahos J, Roux MJ, Humeau Y, Chelly J, Passafaro M, Giustetto M, Billuart P, Sala C.

Bibliographie

- Ahmed, S. H., P. J. Kenny, et al. (2002). "Neurobiological evidence for hedonic allostasis associated with escalating cocaine use." <u>Nat Neurosci</u> **5**(7): 625-626.
- Akil, H., C. Owens, et al. (1998). "Endogenous opioids: overview and current issues." <u>Drug Alcohol Depend</u> **51**(1-2): 127-140.
- Almeida, O. F., K. E. Nikolarakis, et al. (1988). "Evidence for the involvement of endogenous opioids in the inhibition of luteinizing hormone by corticotropin-releasing factor." <u>Endocrinology</u> **122**(3): 1034-1041.
- Alves, I. D., Z. Salamon, et al. (2003). "Direct observation of G-protein binding to the human delta-opioid receptor using plasmon-waveguide resonance spectroscopy." <u>The Journal of biological chemistry</u> 278(49): 48890-48897.
- Amaral, D. G. and M. P. Witter (1989). "The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data." <u>Neuroscience</u> **31**(3): 571-591.
- Ang, C. W., G. C. Carlson, et al. (2005). "Hippocampal CA1 circuitry dynamically gates direct cortical inputs preferentially at theta frequencies." <u>The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience</u> **25**(42): 9567-9580.
- Ang, C. W., G. C. Carlson, et al. (2005). "Hippocampal CA1 circuitry dynamically gates direct cortical inputs preferentially at theta frequencies." <u>I Neurosci</u> **25**(42): 9567-9580.
- Arttamangkul, S., N. Quillinan, et al. (2008). "Differential activation and trafficking of micro-opioid receptors in brain slices." <u>Mol Pharmacol</u> **74**(4): 972-979.
- Avoli, M., M. D'Antuono, et al. (2002). "Network and pharmacological mechanisms leading to epileptiform synchronization in the limbic system in vitro." <u>Prog Neurobiol</u> **68**(3): 167-207.
- Bagnol, D., A. Mansour, et al. (1997). "Cellular localization and distribution of the cloned mu and kappa opioid receptors in rat gastrointestinal tract." <u>Neuroscience</u> 81(2): 579-591.
- Bailey, C. P. and M. Connor (2005). "Opioids: cellular mechanisms of tolerance and physical dependence." <u>Curr Opin</u> <u>Pharmacol</u> **5**(1): 60-68.
- Baker, A. M., A. Sauliere, et al. (2007). "CD4 interacts constitutively with multiple CCR5 at the plasma membrane of living cells. A fluorescence recovery after photobleaching at variable radii approach." <u>The Journal of</u> <u>biological chemistry</u> 282(48): 35163-35168.
- Barkus, C., S. B. McHugh, et al. (2010). "Hippocampal NMDA receptors and anxiety: at the interface between cognition and emotion." <u>Eur J Pharmacol</u> **626**(1): 49-56.
- Bast, T. (2007). "Toward an integrative perspective on hippocampal function: from the rapid encoding of experience to adaptive behavior." <u>Rev Neurosci</u> **18**(3-4): 253-281.
- Bausch, S. B., T. A. Patterson, et al. (1995). "Immunocytochemical localization of delta opioid receptors in mouse brain." <u>J Chem Neuroanat</u> 8(3): 175-189.
- Bausch, S. B., T. A. Patterson, et al. (1995). "Immunocytochemical localization of delta opioid receptors in mouse brain." <u>Journal of chemical neuroanatomy</u> 8(3): 175-189.
- Beckett, A. H. and A. F. Casy (1954). "Stereochemistry of certain analgesics." Nature 173(4417): 1231-1232.
- Befort, K., M. G. Mattei, et al. (1994). "Chromosomal localization of the delta opioid receptor gene to human 1p34.3p36.1 and mouse 4D bands by in situ hybridization." <u>Genomics</u> **20**(1): 143-145.
- Besse, D., M. C. Lombard, et al. (1991). "Autoradiographic distribution of mu, delta and kappa opioid binding sites in the superficial dorsal horn, over the rostrocaudal axis of the rat spinal cord." <u>Brain research</u> 548(1-2): 287-291.

- Bilecki, W., A. Wawrzczak-Bargiela, et al. (2004). "Activation of AP-1 and CRE-dependent gene expression via muopioid receptor." <u>J Neurochem</u> **90**(4): 874-882.
- Bilsky, E. J., S. N. Calderon, et al. (1995). "SNC 80, a selective, nonpeptidic and systemically active opioid delta agonist." <u>The Journal of pharmacology and experimental therapeutics</u> **273**(1): 359-366.
- Blanchet, C. and C. Luscher (2002). "Desensitization of mu-opioid receptor-evoked potassium currents: initiation at the receptor, expression at the effector." <u>Proceedings of the National Academy of Sciences of the United</u> <u>States of America</u> 99(7): 4674-4679.
- Bloom, F. E., J. Rossier, et al. (1978). "beta-endorphin: cellular localization, electrophysiological and behavioral effects." <u>Adv Biochem Psychopharmacol</u> **18**: 89-109.
- Bockaert, J. and J. P. Pin (1999). "Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success." <u>Embo J</u> **18**(7): 1723-1729.
- Bodnar, R. J. (2007). "Endogenous opiates and behavior: 2006." Peptides **28**(12): 2435-2513.
- Boettcher, C., M. Fellermeier, et al. (2005). "How human neuroblastoma cells make morphine." <u>Proceedings of the</u> <u>National Academy of Sciences of the United States of America</u> **102**(24): 8495-8500.
- Bohn, L. M., R. R. Gainetdinov, et al. (2000). "Mu-opioid receptor desensitization by beta-arrestin-2 determines morphine tolerance but not dependence." <u>Nature</u> **408**(6813): 720-723.
- Bonanomi, D., F. Benfenati, et al. (2006). "Protein sorting in the synaptic vesicle life cycle." <u>Prog Neurobiol</u> **80**(4): 177-217.
- Brix-Christensen, V., E. Tonnesen, et al. (1997). "Endogenous morphine levels increase following cardiac surgery as part of the antiinflammatory response?" International journal of cardiology **62**(3): 191-197.
- Brun, V. H., M. K. Otnass, et al. (2002). "Place cells and place recognition maintained by direct entorhinal-hippocampal circuitry." <u>Science</u> **296**(5576): 2243-2246.
- Brun, V. H., T. Solstad, et al. (2008). "Progressive increase in grid scale from dorsal to ventral medial entorhinal cortex." <u>Hippocampus</u> **18**(12): 1200-1212.
- Burgess, N. (2008). "Spatial cognition and the brain." <u>Ann N Y Acad Sci</u> 1124: 77-97.
- Buzsaki, G., L. W. Leung, et al. (1983). "Cellular bases of hippocampal EEG in the behaving rat." <u>Brain research</u> **287**(2): 139-171.
- Cahill, C. M., S. V. Holdridge, et al. (2007). "Trafficking of delta-opioid receptors and other G-protein-coupled receptors: implications for pain and analgesia." <u>Trends Pharmacol Sci</u> **28**(1): 23-31.
- Cahill, C. M., S. V. Holdridge, et al. (2007). "Trafficking of delta-opioid receptors and other G-protein-coupled receptors: implications for pain and analgesia." <u>Trends Pharmacol Sci</u> **28**(1): 23-31.
- Cahill, C. M., K. A. McClellan, et al. (2001). "Immunohistochemical distribution of delta opioid receptors in the rat central nervous system: evidence for somatodendritic labeling and antigen-specific cellular compartmentalization." <u>J Comp Neurol</u> **440**(1): 65-84.
- Calderon, S. N., R. B. Rothman, et al. (1994). "Probes for narcotic receptor mediated phenomena. 19. Synthesis of (+)-4-[(alpha R)-alpha-((2S,5R)-4-allyl-2,5-dimethyl-1-piperazinyl)-3- methoxybenzyl]-N,N-diethylbenzamide (SNC 80): a highly selective, nonpeptide delta opioid receptor agonist." <u>I Med Chem</u> **37**(14): 2125-2128.
- Cezanne, L., S. Lecat, et al. (2004). "Dynamic confinement of NK2 receptors in the plasma membrane. Improved FRAP analysis and biological relevance." <u>The Journal of biological chemistry</u> **279**(43): 45057-45067.
- Chan, F., A. Bradley, et al. (2004). "Knock-in human rhodopsin-GFP fusions as mouse models for human disease and targets for gene therapy." <u>Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America</u> **101**(24): 9109-9114.
- Chan, J. S., J. W. Lee, et al. (2000). "Preactivation permits subsequent stimulation of phospholipase C by G(i)-coupled receptors." <u>Mol Pharmacol</u> **57**(4): 700-708.

- Chang, K. J., G. C. Rigdon, et al. (1993). "A novel, potent and selective nonpeptidic delta opioid receptor agonist BW373U86." <u>The Journal of pharmacology and experimental therapeutics</u> **267**(2): 852-857.
- Charpak, S., D. Pare, et al. (1995). "The entorhinal cortex entrains fast CA1 hippocampal oscillations in the anaesthetized guinea-pig: role of the monosynaptic component of the perforant path." <u>Eur J Neurosci</u> 7(7): 1548-1557.
- Chaturvedi, K., K. H. Christoffers, et al. (2000). "Structure and regulation of opioid receptors." <u>Biopolymers</u> **55**(4): 334-346.
- Chieng, B. and J. T. Williams (1998). "Increased opioid inhibition of GABA release in nucleus accumbens during morphine withdrawal." <u>The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience</u> **18**(17): 7033-7039.
- Chitwood, R. A. and D. B. Jaffe (1998). "Calcium-dependent spike-frequency accommodation in hippocampal CA3 nonpyramidal neurons." <u>I Neurophysiol</u> **80**(2): 983-988.
- Chuang, T. K., K. F. Killam, Jr., et al. (1995). "Mu opioid receptor gene expression in immune cells." <u>Biochemical and</u> <u>biophysical research communications</u> **216**(3): 922-930.
- Ciccocioppo, R., R. Martin-Fardon, et al. (2002). "Effect of selective blockade of mu(1) or delta opioid receptors on reinstatement of alcohol-seeking behavior by drug-associated stimuli in rats." <u>Neuropsychopharmacology</u> 27(3): 391-399.
- Ciccocioppo, R., R. Martin-Fardon, et al. (2002). "Effect of selective blockade of mu(1) or delta opioid receptors on reinstatement of alcohol-seeking behavior by drug-associated stimuli in rats." <u>Neuropsychopharmacology</u> 27(3): 391-399.
- Cobb, S. R., E. H. Buhl, et al. (1995). "Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABAergic interneurons." <u>Nature</u> **378**(6552): 75-78.
- Commons, K. G. and T. A. Milner (1996). "Cellular and subcellular localization of delta opioid receptor immunoreactivity in the rat dentate gyrus." <u>Brain Res</u> **738**(2): 181-195.
- Commons, K. G. and T. A. Milner (1996). "Cellular and subcellular localization of delta opioid receptor immunoreactivity in the rat dentate gyrus." <u>Brain research</u> **738**(2): 181-195.
- Commons, K. G. and T. A. Milner (1997). "Localization of delta opioid receptor immunoreactivity in interneurons and pyramidal cells in the rat hippocampus." <u>The Journal of comparative neurology</u> **381**(3): 373-387.
- Commons, K. G. and T. A. Milner (1997). "Localization of delta opioid receptor immunoreactivity in interneurons and pyramidal cells in the rat hippocampus." <u>J Comp Neurol</u> **381**(3): 373-387.
- Corkin, S. (2002). "What's new with the amnesic patient H.M.?" <u>Nat Rev Neurosci</u> **3**(2): 153-160.
- Dahan, A., E. Sarton, et al. (2001). "Anesthetic potency and influence of morphine and sevoflurane on respiration in mu-opioid receptor knockout mice." <u>Anesthesiology</u> **94**(5): 824-832.
- Daumas, F., N. Destainville, et al. (2003). "Confined diffusion without fences of a g-protein-coupled receptor as revealed by single particle tracking." <u>Biophysical journal</u> **84**(1): 356-366.
- de Wied, D. (1990). "Neurotrophic effects of ACTH/MSH neuropeptides." <u>Acta Neurobiol Exp (Wars)</u> **50**(4-5): 353-366.
- Deakin, J. F., J. O. Dostrovsky, et al. (1980). "Influence of N-terminal acetylation and C-terminal proteolysis on the analgesic activity of beta-endorphin." <u>The Biochemical journal</u> **189**(3): 501-506.
- Decaillot, F. M., K. Befort, et al. (2003). "Opioid receptor random mutagenesis reveals a mechanism for G proteincoupled receptor activation." <u>Nat Struct Biol</u> **10**(8): 629-636.
- Del Turco, D. and T. Deller (2007). "Organotypic entorhino-hippocampal slice cultures--a tool to study the molecular and cellular regulation of axonal regeneration and collateral sprouting in vitro." <u>Methods Mol Biol</u> **399**: 55-66.

- DePaoli, A. M., K. M. Hurley, et al. (1994). "Distribution of kappa opioid receptor mRNA in adult mouse brain: an in situ hybridization histochemistry study." <u>Mol Cell Neurosci</u> **5**(4): 327-335.
- Desmond, N. L., C. A. Scott, et al. (1994). "Ultrastructural identification of entorhinal cortical synapses in CA1 stratum lacunosum-moleculare of the rat." <u>Hippocampus</u> **4**(5): 594-600.
- Drake, C. T. and T. A. Milner (2002). "Mu opioid receptors are in discrete hippocampal interneuron subpopulations." <u>Hippocampus</u> **12**(2): 119-136.
- Dugue, G. P., N. Brunel, et al. (2009). "Electrical coupling mediates tunable low-frequency oscillations and resonance in the cerebellar Golgi cell network." <u>Neuron</u> **61**(1): 126-139.
- Duncan, G. and L. Wang (2005). "Focus on molecules: the Sigma-1 receptor." Exp Eye Res 81(2): 121-122.
- Dunwiddie, T., A. Mueller, et al. (1980). "Electrophysiological interactions of enkephalins with neuronal circuitry in the rat hippocampus. I. Effects on pyramidal cell activity." <u>Brain research</u> **184**(2): 311-330.
- Duzel, E., W. D. Penny, et al. "Brain oscillations and memory." Curr Opin Neurobiol 20(2): 143-149.

Duzel, E., W. D. Penny, et al. (2010). "Brain oscillations and memory." Curr Opin Neurobiol 20(2): 143-149.

- Dvorak-Carbone, H. and E. M. Schuman (1999). "Long-term depression of temporoammonic-CA1 hippocampal synaptic transmission." <u>I Neurophysiol</u> **81**(3): 1036-1044.
- Eichenbaum, H., A. P. Yonelinas, et al. (2007). "The medial temporal lobe and recognition memory." <u>Annu Rev</u> <u>Neurosci **30**</u>: 123-152.
- Empson, R. M. and U. Heinemann (1995). "The perforant path projection to hippocampal area CA1 in the rat hippocampal-entorhinal cortex combined slice." <u>J Physiol</u> **484 (Pt 3)**: 707-720.
- Erspamer, V., P. Melchiorri, et al. (1989). "Deltorphins: a family of naturally occurring peptides with high affinity and selectivity for delta opioid binding sites." <u>Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America</u> **86**(13): 5188-5192.
- Escriche, M., J. Burgueno, et al. (2003). "Ligand-induced caveolae-mediated internalization of A1 adenosine receptors: morphological evidence of endosomal sorting and receptor recycling." <u>Exp Cell Res</u> **285**(1): 72-90.
- Evans, C. J., D. E. Keith, Jr., et al. (1992). "Cloning of a delta opioid receptor by functional expression." <u>Science</u> **258**(5090): 1952-1955.
- Fallon, J. H. and F. M. Leslie (1986). "Distribution of dynorphin and enkephalin peptides in the rat brain." <u>The Journal</u> of comparative neurology **249**(3): 293-336.
- Filipek, S., R. E. Stenkamp, et al. (2003). "G protein-coupled receptor rhodopsin: a prospectus." <u>Annu Rev Physiol</u> **65**: 851-879.
- Filliol, D., S. Ghozland, et al. (2000). "Mice deficient for delta- and mu-opioid receptors exhibit opposing alterations of emotional responses." <u>Nat Genet</u> **25**(2): 195-200.
- Filliol, D., S. Ghozland, et al. (2000). "Mice deficient for delta- and mu-opioid receptors exhibit opposing alterations of emotional responses." <u>Nat Genet</u> **25**(2): 195-200.
- Fisahn, A., F. G. Pike, et al. (1998). "Cholinergic induction of network oscillations at 40 Hz in the hippocampus in vitro." <u>Nature</u> **394**(6689): 186-189.
- Fraser, G. L., G. A. Gaudreau, et al. (2000). "Antihyperalgesic effects of delta opioid agonists in a rat model of chronic inflammation." <u>Br J Pharmacol</u> **129**(8): 1668-1672.
- Fredriksson, R., M. C. Lagerstrom, et al. (2003). "The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints." <u>Mol Pharmacol</u> **63**(6): 1256-1272.
- Fredriksson, R. and H. B. Schioth (2005). "The repertoire of G-protein-coupled receptors in fully sequenced genomes." <u>Mol Pharmacol</u> **67**(5): 1414-1425.
- Frenk, H., G. Urca, et al. (1978). "Epileptic properties of leucine- and methionine-enkephalin: comparison with morphine and reversibility by naloxone." <u>Brain research</u> **147**(2): 327-337.

Freund, T. F. and G. Buzsaki (1996). "Interneurons of the hippocampus." Hippocampus 6(4): 347-470.

- Fuchs, P. N., C. Roza, et al. (1999). "Characterization of mechanical withdrawal responses and effects of mu-, delta- and kappa-opioid agonists in normal and mu-opioid receptor knockout mice." <u>Brain research</u> **821**(2): 480-486.
- Fuentealba, P., R. Tomioka, et al. (2008). "Rhythmically active enkephalin-expressing GABAergic cells in the CA1 area of the hippocampus project to the subiculum and preferentially innervate interneurons." <u>The Journal of</u> <u>neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience</u> **28**(40): 10017-10022.
- Gahwiler, B. H. (1980). "Excitatory action of opioid peptides and opiates on cultured hippocampal pyramidal cells." Brain research **194**(1): 193-203.
- Gahwiler, B. H. (1981). "Organotypic monolayer cultures of nervous tissue." Journal of neuroscience methods **4**(4): 329-342.
- Gall, C., N. Brecha, et al. (1981). "Localization of enkephalin-like immunoreactivity to identified axonal and neuronal populations of the rat hippocampus." <u>The Journal of comparative neurology</u> **198**(2): 335-350.
- Gaudriault, G., D. Nouel, et al. (1997). "Receptor-induced internalization of selective peptidic mu and delta opioid ligands." <u>The Journal of biological chemistry</u> **272**(5): 2880-2888.
- Gaveriaux, C., J. Peluso, et al. (1995). "Identification of kappa- and delta-opioid receptor transcripts in immune cells." <u>FEBS letters</u> **369**(2-3): 272-276.
- Gaveriaux-Ruff, C., C. Nozaki, et al. (2011). "Genetic ablation of delta opioid receptors in nociceptive sensory neurons increases chronic pain and abolishes opioid analgesia." <u>Pain</u> **152**(6): 1238-1248.
- Gerrits, M. A., H. B. Lesscher, et al. (2003). "Drug dependence and the endogenous opioid system." <u>Eur</u> <u>Neuropsychopharmacol</u> **13**(6): 424-434.
- Ghozland, S., H. W. Matthes, et al. (2002). "Motivational effects of cannabinoids are mediated by mu-opioid and kappaopioid receptors." <u>The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience</u> 22(3): 1146-1154.
- Glykys, J. and I. Mody (2007). "The main source of ambient GABA responsible for tonic inhibition in the mouse hippocampus." J Physiol **582**(Pt 3): 1163-1178.
- Gogolla, N., I. Galimberti, et al. (2006). "Long-term live imaging of neuronal circuits in organotypic hippocampal slice cultures." <u>Nat Protoc</u> **1**(3): 1223-1226.
- Gogolla, N., I. Galimberti, et al. (2006). "Long-term live imaging of neuronal circuits in organotypic hippocampal slice cultures." <u>Nat Protoc</u> **1**(3): 1223-1226.
- Gogolla, N., I. Galimberti, et al. (2006). "Preparation of organotypic hippocampal slice cultures for long-term live imaging." <u>Nat Protoc</u> **1**(3): 1165-1171.
- Goldstein, A., S. Tachibana, et al. (1979). "Dynorphin-(1-13), an extraordinarily potent opioid peptide." <u>Proceedings of</u> <u>the National Academy of Sciences of the United States of America</u> **76**(12): 6666-6670.
- Goodman, R. R., S. H. Snyder, et al. (1980). "Differentiation of delta and mu opiate receptor localizations by light microscopic autoradiography." <u>Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of</u> <u>America</u> 77(10): 6239-6243.
- Goody, R. J., S. M. Oakley, et al. (2002). "Quantitative autoradiographic mapping of opioid receptors in the brain of delta-opioid receptor gene knockout mice." <u>Brain research</u> **945**(1): 9-19.
- Goumon, Y., A. Muller, et al. (2006). "Identification of morphine-6-glucuronide in chromaffin cell secretory granules." <u>The Journal of biological chemistry</u> **281**(12): 8082-8089.
- Goumon, Y. and G. B. Stefano (2000). "Identification of morphine in the rat adrenal gland." <u>Brain Res Mol Brain Res</u> **77**(2): 267-269.
- Grobe, N., M. Lamshoft, et al. (2010). "Urinary excretion of morphine and biosynthetic precursors in mice." <u>Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America</u> **107**(18): 8147-8152.

- Gulyas, A. I., G. G. Szabo, et al. (2010). "Parvalbumin-containing fast-spiking basket cells generate the field potential oscillations induced by cholinergic receptor activation in the hippocampus." <u>The Journal of neuroscience :</u> <u>the official journal of the Society for Neuroscience</u> **30**(45): 15134-15145.
- Guo, J., Y. Wu, et al. (2000). "Identification of G protein-coupled receptor kinase 2 phosphorylation sites responsible for agonist-stimulated delta-opioid receptor phosphorylation." <u>Mol Pharmacol</u> **58**(5): 1050-1056.
- Hafting, T., M. Fyhn, et al. (2005). "Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex." <u>Nature</u> **436**(7052): 801-806.
- Handa, B. K., A. C. Land, et al. (1981). "Analogues of beta-LPH61-64 possessing selective agonist activity at mu-opiate receptors." <u>Eur J Pharmacol</u> **70**(4): 531-540.
- Harlan, R. E., B. D. Shivers, et al. (1987). "Localization of preproenkephalin mRNA in the rat brain and spinal cord by in situ hybridization." <u>The Journal of comparative neurology</u> **258**(2): 159-184.
- Hasbi, A., S. Allouche, et al. (2000). "Internalization and recycling of delta-opioid receptor are dependent on a phosphorylation-dephosphorylation mechanism." <u>The Journal of pharmacology and experimental</u> <u>therapeutics</u> **293**(1): 237-247.
- Heim, R., A. B. Cubitt, et al. (1995). "Improved green fluorescence." Nature 373(6516): 663-664.
- Heinemann, U., D. Schmitz, et al. (2000). "Properties of entorhinal cortex projection cells to the hippocampal formation." <u>Ann N Y Acad Sci</u> **911**: 112-126.
- Herkenham, M. and C. B. Pert (1980). "In vitro autoradiography of opiate receptors in rat brain suggests loci of "opiatergic" pathways." <u>Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America</u> 77(9): 5532-5536.
- Hermans, E. (2003). "Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors." <u>Pharmacol Ther</u> **99**(1): 25-44.
- Hersh, L. B. (1984). "Reaction of opioid peptides with neutral endopeptidase ("enkephalinase")." <u>J Neurochem</u> **43**(2): 487-493.
- Herskovits, J. S., C. C. Burgess, et al. (1993). "Effects of mutant rat dynamin on endocytosis." <u>The Journal of cell biology</u> **122**(3): 565-578.
- Heuser, J. E. and R. G. Anderson (1989). "Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation." <u>J Cell Biol</u> **108**(2): 389-400.
- Hughes, J., T. Smith, et al. (1975). "Purification and properties of enkephalin the possible endogenous ligand for the morphine receptor." Life Sci **16**(12): 1753-1758.
- Hyman, S. E., R. C. Malenka, et al. (2006). "Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory." <u>Annu Rev Neurosci</u> **29**: 565-598.
- Ingram, S. L. and J. T. Williams (1994). "Opioid inhibition of Ih via adenylyl cyclase." Neuron 13(1): 179-186.
- Irazusta, J., G. Larrinaga, et al. (2003). "Effects of morphine administration and its withdrawal on rat brain aminopeptidase activities." <u>Regul Pept</u> **110**(3): 225-230.
- Ito, H. T. and E. M. Schuman (2011). "Functional division of hippocampal area CA1 via modulatory gating of entorhinal cortical inputs." <u>Hippocampus</u>.
- Jafari-Sabet, M. and I. Jannat-Dastjerdi (2009). "Muscimol state-dependent memory: involvement of dorsal hippocampal mu-opioid receptors." <u>Behav Brain Res</u> **202**(1): 5-10.
- Jafari-Sabet, M. and I. Jannat-Dastjerdi (2009). "Muscimol state-dependent memory: involvement of dorsal hippocampal mu-opioid receptors." <u>Behav Brain Res</u> **202**(1): 5-10.
- Jay, T. M. and M. P. Witter (1991). "Distribution of hippocampal CA1 and subicular efferents in the prefrontal cortex of the rat studied by means of anterograde transport of Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin." <u>The Journal of</u> <u>comparative neurology</u> **313**(4): 574-586.

Jin, W., N. M. Lee, et al. (1994). "Opioids mobilize calcium from inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive stores in NG108-15 cells." <u>The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience</u> **14**(4): 1920-1929.

Joels, M. (2008). "Functional actions of corticosteroids in the hippocampus." Eur J Pharmacol 583(2-3): 312-321.

- Johnson, E. E., M. J. Christie, et al. (2005). "The role of opioid receptor phosphorylation and trafficking in adaptations to persistent opioid treatment." <u>Neurosignals</u> **14**(6): 290-302.
- Jones, D. L. and S. C. Baraban (2007). "Characterization of inhibitory circuits in the malformed hippocampus of Lis1 mutant mice." J Neurophysiol **98**(5): 2737-2746.
- Jongkamonwiwat, N., P. Phansuwan-Pujito, et al. (2003). "The presence of opioid receptors in rat inner ear." <u>Hear Res</u> **181**(1-2): 85-93.
- Kalyuzhny, A. E. and M. W. Wessendorf (1997). "CNS GABA neurons express the mu-opioid receptor: immunocytochemical studies." <u>Neuroreport</u> **8**(15): 3367-3372.
- Kanamatsu, T., J. F. McGinty, et al. (1986). "Dynorphin- and enkephalin-like immunoreactivity is altered in limbic-basal ganglia regions of rat brain after repeated electroconvulsive shock." <u>The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience</u> **6**(3): 644-649.
- Kelley, A. E. (2004). "Memory and addiction: shared neural circuitry and molecular mechanisms." <u>Neuron</u> **44**(1): 161-179.
- Khachaturian, H., M. E. Lewis, et al. (1983). "Enkephalin systems in diencephalon and brainstem of the rat." <u>The</u> <u>Journal of comparative neurology</u> **220**(3): 310-320.
- Khachaturian, H., S. J. Watson, et al. (1982). "Dynorphin immunocytochemistry in the rat central nervous system." <u>Peptides</u> **3**(6): 941-954.
- Kieffer, B. L., K. Befort, et al. (1992). "The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization." <u>Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of</u> <u>America</u> 89(24): 12048-12052.
- Kieffer, B. L. and C. J. Evans (2009). "Opioid receptors: from binding sites to visible molecules in vivo." <u>Neuropharmacology</u> **56 Suppl 1**: 205-212.
- Kieffer, B. L. and C. Gaveriaux-Ruff (2002). "Exploring the opioid system by gene knockout." <u>Prog Neurobiol</u> **66**(5): 285-306.
- Kiss, J., G. Buzsaki, et al. (1996). "Entorhinal cortical innervation of parvalbumin-containing neurons (Basket and Chandelier cells) in the rat Ammon's horn." <u>Hippocampus</u> **6**(3): 239-246.
- Kitchen, I., S. J. Slowe, et al. (1997). "Quantitative autoradiographic mapping of mu-, delta- and kappa-opioid receptors in knockout mice lacking the mu-opioid receptor gene." <u>Brain research</u> **778**(1): 73-88.
- Klausberger, T. (2009). "GABAergic interneurons targeting dendrites of pyramidal cells in the CA1 area of the hippocampus." <u>Eur J Neurosci</u> **30**(6): 947-957.
- Klausberger, T. (2009). "GABAergic interneurons targeting dendrites of pyramidal cells in the CA1 area of the hippocampus." <u>Eur J Neurosci</u> **30**(6): 947-957.
- Klausberger, T. and P. Somogyi (2008). "Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations." <u>Science</u> **321**(5885): 53-57.
- Ko, J. L., U. Arvidsson, et al. (1999). "Visualization of time-dependent redistribution of delta-opioid receptors in neuronal cells during prolonged agonist exposure." <u>Brain Res Mol Brain Res 69(2)</u>: 171-185.
- Koob, G. F. and M. Le Moal (1997). "Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation." <u>Science</u> **278**(5335): 52-58.
- Koshimizu, Y., S. X. Wu, et al. (2008). "Paucity of enkephalin production in neostriatal striosomal neurons: analysis with preproenkephalin-green fluorescent protein transgenic mice." <u>Eur J Neurosci</u> **28**(10): 2053-2064.

- Kouhen, O. M., G. Wang, et al. (2000). "Hierarchical phosphorylation of delta-opioid receptor regulates agonistinduced receptor desensitization and internalization." <u>The Journal of biological chemistry</u> 275(47): 36659-36664.
- Kovoor, A., J. P. Celver, et al. (1998). "Agonist induced homologous desensitization of mu-opioid receptors mediated by G protein-coupled receptor kinases is dependent on agonist efficacy." <u>Mol Pharmacol</u> **54**(4): 704-711.
- Kovoor, A., V. Nappey, et al. (1997). "Mu and delta opioid receptors are differentially desensitized by the coexpression of beta-adrenergic receptor kinase 2 and beta-arrestin 2 in xenopus oocytes." <u>The Journal of biological</u> <u>chemistry</u> 272(44): 27605-27611.
- Kuffler, S. W. and D. Yoshikami (1975). "The number of transmitter molecules in a quantum: an estimate from iontophoretic application of acetylcholine at the neuromuscular synapse." <u>J Physiol</u> **251**(2): 465-482.
- Laux, A., A. H. Muller, et al. (2011). "Mapping of endogenous morphine-like compounds in the adult mouse brain: Evidence of their localization in astrocytes and GABAergic cells." <u>The Journal of comparative neurology</u> 519(12): 2390-2416.
- Law, P. Y., O. M. Kouhen, et al. (2000). "Deltorphin II-induced rapid desensitization of delta-opioid receptor requires both phosphorylation and internalization of the receptor." <u>The Journal of biological chemistry</u> 275(41): 32057-32065.
- Law, P. Y., Y. H. Wong, et al. (1999). "Mutational analysis of the structure and function of opioid receptors." <u>Biopolymers</u> **51**(6): 440-455.
- Le Merrer, J., J. A. Becker, et al. (2009). "Reward processing by the opioid system in the brain." <u>Physiol Rev</u> **89**(4): 1379-1412.
- Le Merrer, J., A. Plaza-Zabala, et al. (2010). "Deletion of the delta Opioid Receptor Gene Impairs Place Conditioning But Preserves Morphine Reinforcement." <u>Biol Psychiatry</u>.
- Le Merrer, J., A. Plaza-Zabala, et al. (2011). "Deletion of the delta opioid receptor gene impairs place conditioning but preserves morphine reinforcement." <u>Biol Psychiatry</u> **69**(7): 700-703.
- Lecoq, I., N. Marie, et al. (2004). "Different regulation of human delta-opioid receptors by SNC-80 [(+)-4-[(alphaR)alpha-((2S,5R)-4-allyl-2,5-dimethyl-1-piperazinyl)-3-meth oxybenzyl]-N,N-diethylbenzamide] and endogenous enkephalins." <u>The Journal of pharmacology and experimental therapeutics</u> **310**(2): 666-677.
- Lecoq, I., N. Marie, et al. (2004). "Different regulation of human delta-opioid receptors by SNC-80 [(+)-4-[(alphaR)alpha-((2S,5R)-4-allyl-2,5-dimethyl-1-piperazinyl)-3-meth oxybenzyl]-N,N-diethylbenzamide] and endogenous enkephalins." <u>I Pharmacol Exp Ther</u> **310**(2): 666-677.
- Lee, H. K., T. Dunwiddie, et al. (1980). "Electrophysiological interactions of enkephalins with neuronal circuitry in the rat hippocampus. II. Effects on interneuron excitability." <u>Brain research</u> **184**(2): 331-342.
- Lesscher, H. M., A. Bailey, et al. (2003). "Receptor-selective changes in mu-, delta- and kappa-opioid receptors after chronic naltrexone treatment in mice." <u>Eur J Neurosci</u> **17**(5): 1006-1012.
- Li, J., B. Xiang, et al. (2003). "Agonist-induced formation of opioid receptor-G protein-coupled receptor kinase (GRK)-G beta gamma complex on membrane is required for GRK2 function in vivo." <u>The Journal of biological</u> <u>chemistry</u> **278**(32): 30219-30226.
- Lill, Y., K. L. Martinez, et al. (2005). "Kinetics of the initial steps of G protein-coupled receptor-mediated cellular signaling revealed by single-molecule imaging." <u>Chemphyschem</u> **6**(8): 1633-1640.
- Loh, H. H., L. F. Tseng, et al. (1976). "beta-endorphin is a potent analgesic agent." <u>Proceedings of the National Academy</u> of Sciences of the United States of America **73**(8): 2895-2898.
- Lopes da Silva, F. H., M. P. Witter, et al. (1990). "Anatomic organization and physiology of the limbic cortex." <u>Physiol</u> <u>Rev</u> **70**(2): 453-511.
- Lord, J. A., A. Waterfield, et al. (1977). "Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors." <u>Nature</u> **267**(5611): 495-499.
- Lossi, L., S. Alasia, et al. (2009). "Cell death and proliferation in acute slices and organotypic cultures of mammalian CNS." <u>Prog Neurobiol</u> **88**(4): 221-245.
- Lupica, C. R. (1995). "Delta and mu enkephalins inhibit spontaneous GABA-mediated IPSCs via a cyclic AMPindependent mechanism in the rat hippocampus." <u>J Neurosci</u> **15**(1 Pt 2): 737-749.
- Lupica, C. R. (1995). "Delta and mu enkephalins inhibit spontaneous GABA-mediated IPSCs via a cyclic AMPindependent mechanism in the rat hippocampus." <u>The Journal of neuroscience : the official journal of the</u> <u>Society for Neuroscience</u> **15**(1 Pt 2): 737-749.
- Lupica, C. R., W. R. Proctor, et al. (1992). "Dissociation of mu and delta opioid receptor-mediated reductions in evoked and spontaneous synaptic inhibition in the rat hippocampus in vitro." <u>Brain Res</u> **593**(2): 226-238.
- Lupica, C. R., W. R. Proctor, et al. (1992). "Dissociation of mu and delta opioid receptor-mediated reductions in evoked and spontaneous synaptic inhibition in the rat hippocampus in vitro." <u>Brain research</u> **593**(2): 226-238.
- Maccaferri, G. and C. J. McBain (1995). "Passive propagation of LTD to stratum oriens-alveus inhibitory neurons modulates the temporoammonic input to the hippocampal CA1 region." <u>Neuron</u> **15**(1): 137-145.
- Madamba, S. G., P. Schweitzer, et al. (1999). "Dynorphin selectively augments the M-current in hippocampal CA1 neurons by an opiate receptor mechanism." <u>J Neurophysiol</u> **82**(4): 1768-1775.
- Madamba, S. G., P. Schweitzer, et al. (1999). "Dynorphin selectively augments the M-current in hippocampal CA1 neurons by an opiate receptor mechanism." <u>J Neurophysiol</u> **82**(4): 1768-1775.
- Madison, D. V. and R. A. Nicoll (1988). "Enkephalin hyperpolarizes interneurones in the rat hippocampus." <u>J Physiol</u> **398**: 123-130.
- Mansour, A., C. A. Fox, et al. (1995). "Immunohistochemical localization of the cloned mu opioid receptor in the rat CNS." Journal of chemical neuroanatomy **8**(4): 283-305.
- Mansour, A., C. A. Fox, et al. (1994). "Mu, delta, and kappa opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: an in situ hybridization study." <u>The Journal of comparative neurology</u> **350**(3): 412-438.
- Mansour, A., H. Khachaturian, et al. (1987). "Autoradiographic differentiation of mu, delta, and kappa opioid receptors in the rat forebrain and midbrain." <u>The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for</u> <u>Neuroscience</u> **7**(8): 2445-2464.
- Marie, N., B. Aguila, et al. (2006). "Tracking the opioid receptors on the way of desensitization." <u>Cell Signal</u> **18**(11): 1815-1833.
- Marie, N., I. Lecoq, et al. (2003). "Differential sorting of human delta-opioid receptors after internalization by peptide and alkaloid agonists." <u>The Journal of biological chemistry</u> **278**(25): 22795-22804.
- Marinelli, P. W., D. Funk, et al. (2009). "Roles of opioid receptor subtypes in mediating alcohol-seeking induced by discrete cues and context." <u>Eur J Neurosci</u> **30**(4): 671-678.
- Marinelli, P. W., D. Funk, et al. (2009). "Roles of opioid receptor subtypes in mediating alcohol-seeking induced by discrete cues and context." <u>Eur J Neurosci</u> **30**(4): 671-678.
- Martin, S. J. and R. E. Clark (2007). "The rodent hippocampus and spatial memory: from synapses to systems." <u>Cell Mol</u> <u>Life Sci</u> **64**(4): 401-431.
- Martin, W. R. (1967). "Opioid antagonists." Pharmacol Rev 19(4): 463-521.
- Martin, W. R., C. G. Eades, et al. (1976). "The effects of morphine- and nalorphine- like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog." <u>The Journal of pharmacology and experimental therapeutics</u> 197(3): 517-532.
- Martin-Kleiner, I., T. Balog, et al. (2006). "Signal transduction induced by opioids in immune cells: a review." <u>Neuroimmunomodulation</u> **13**(1): 1-7.

- Martin-Moutot, N., O. el Far, et al. (1993). "Synaptotagmin: a Lambert-Eaton myasthenic syndrome antigen that associates with presynaptic calcium channels." J Physiol Paris **87**(1): 37-41.
- Matthes, H. W., R. Maldonado, et al. (1996). "Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene." <u>Nature</u> **383**(6603): 819-823.
- McGaugh, J. L., I. B. Introini-Collison, et al. (1993). "Neuromodulatory systems and memory storage: role of the amygdala." <u>Behav Brain Res</u> **58**(1-2): 81-90.
- McGinty, J. F., T. Kanamatsu, et al. (1986). "Amygdaloid kindling increases enkephalin-like immunoreactivity but decreases dynorphin-A-like immunoreactivity in rat hippocampus." <u>Neurosci Lett</u> **71**(1): 31-36.
- McGinty, J. F., T. Kanamatsu, et al. (1986). "Amygdaloid kindling increases enkephalin-like immunoreactivity but decreases dynorphin-A-like immunoreactivity in rat hippocampus." <u>Neurosci Lett</u> **71**(1): 31-36.
- McNaughton, B. L., C. A. Barnes, et al. (1989). "Hippocampal granule cells are necessary for normal spatial learning but not for spatially-selective pyramidal cell discharge." <u>Experimental brain research. Experimentelle</u> <u>Hirnforschung. Experimentation cerebrale</u> **76**(3): 485-496.
- McQuiston, A. R. (2008). "Layer selective presynaptic modulation of excitatory inputs to hippocampal cornu Ammon 1 by mu-opioid receptor activation." <u>Neuroscience</u> **151**(1): 209-221.
- McQuiston, A. R. (2011). "Mu opioid receptor activation normalizes temporo-ammonic pathway driven inhibition in hippocampal CA1." <u>Neuropharmacology</u> **60**(2-3): 472-479.
- McQuiston, A. R. and P. Saggau (2003). "Mu-opioid receptors facilitate the propagation of excitatory activity in rat hippocampal area CA1 by disinhibition of all anatomical layers." <u>J Neurophysiol</u> **90**(3): 1936-1948.
- Merchenthaler, I., J. L. Maderdrut, et al. (1997). "In situ hybridization histochemical localization of prodynorphin messenger RNA in the central nervous system of the rat." <u>The Journal of comparative neurology</u> **384**(2): 211-232.
- Mettlen, M., T. Pucadyil, et al. (2009). "Dissecting dynamin's role in clathrin-mediated endocytosis." <u>Biochem Soc</u> <u>Trans</u> **37**(Pt 5): 1022-1026.
- Minnis, J. G., S. Patierno, et al. (2003). "Ligand-induced mu opioid receptor endocytosis and recycling in enteric neurons." <u>Neuroscience</u> **119**(1): 33-42.
- Morris, R. G., P. Garrud, et al. (1982). "Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions." <u>Nature</u> **297**(5868): 681-683.
- Mosberg, H. I., R. Hurst, et al. (1983). "Conformationally constrained cyclic enkephalin analogs with pronounced delta opioid receptor agonist selectivity." Life Sci **32**(22): 2565-2569.
- Nakauchi, S., R. J. Brennan, et al. (2007). "Nicotine gates long-term potentiation in the hippocampal CA1 region via the activation of alpha2* nicotinic ACh receptors." <u>Eur J Neurosci</u> **25**(9): 2666-2681.
- Nicoll, R. A., B. E. Alger, et al. (1980). "Enkephalin blocks inhibitory pathways in the vertebrate CNS." <u>Nature</u> **287**(5777): 22-25.
- Nicoll, R. A., G. R. Siggins, et al. (1977). "Neuronal actions of endorphins and enkephalins among brain regions: a comparative microiontophoretic study." <u>Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America</u> **74**(6): 2584-2588.
- Noraberg, J., F. R. Poulsen, et al. (2005). "Organotypic hippocampal slice cultures for studies of brain damage, neuroprotection and neurorepair." <u>Curr Drug Targets CNS Neurol Disord</u> **4**(4): 435-452.
- Olmstead, M. C. and K. B. Franklin (1997). "The development of a conditioned place preference to morphine: effects of microinjections into various CNS sites." <u>Behav Neurosci</u> **111**(6): 1324-1334.
- Parkar, N. S., B. S. Akpa, et al. (2009). "Vesicle formation and endocytosis: function, machinery, mechanisms, and modeling." <u>Antioxid Redox Signal</u> **11**(6): 1301-1312.

- Pasternak, G. W., R. Goodman, et al. (1975). "An endogenous morphine-like factor in mammalian brain." <u>Life Sci</u> **16**(12): 1765-1769.
- Pei, G., B. L. Kieffer, et al. (1995). "Agonist-dependent phosphorylation of the mouse delta-opioid receptor: involvement of G protein-coupled receptor kinases but not protein kinase C." <u>Mol Pharmacol</u> 48(2): 173-177.
- Pert, C. B. and S. H. Snyder (1973). "Opiate receptor: demonstration in nervous tissue." Science 179(77): 1011-1014.
- Pol, O., J. R. Palacio, et al. (2003). "The expression of delta- and kappa-opioid receptor is enhanced during intestinal inflammation in mice." <u>The Journal of pharmacology and experimental therapeutics</u> **306**(2): 455-462.
- Poole, D. P., J. C. Pelayo, et al. (2011). "Localization and Regulation of Fluorescence-Labeled Delta Opioid Receptor, Expressed in Enteric Neurons of Mice." <u>Gastroenterology</u>.
- Portoghese, P. S., M. Sultana, et al. (1990). "Naltrindole 5'-isothiocyanate: a nonequilibrium, highly selective delta opioid receptor antagonist." <u>I Med Chem</u> **33**(6): 1547-1548.
- Pradhan, A. A., J. A. Becker, et al. (2009). "In vivo delta opioid receptor internalization controls behavioral effects of agonists." <u>PLoS One</u> **4**(5): e5425.
- Pradhan, A. A. and P. B. Clarke (2005). "Comparison between delta-opioid receptor functional response and autoradiographic labeling in rat brain and spinal cord." <u>The Journal of comparative neurology</u> **481**(4): 416-426.
- Pradhan, A. A., W. Walwyn, et al. (2010). "Ligand-directed trafficking of the delta-opioid receptor in vivo: two paths toward analgesic tolerance." <u>The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience</u> **30**(49): 16459-16468.
- Pradhan, A. A., W. Walwyn, et al. (2010). "Ligand-directed trafficking of the delta-opioid receptor in vivo: two paths toward analgesic tolerance." <u>I Neurosci</u> **30**(49): 16459-16468.
- Qiu, C., I. Sora, et al. (2000). "Enhanced delta-opioid receptor-mediated antinociception in mu-opioid receptordeficient mice." <u>Eur J Pharmacol</u> **387**(2): 163-169.
- Quirk, G. J., R. U. Muller, et al. (1992). "The positional firing properties of medial entorhinal neurons: description and comparison with hippocampal place cells." <u>The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for</u> <u>Neuroscience</u> **12**(5): 1945-1963.
- Raynor, K., H. Kong, et al. (1994). "Pharmacological characterization of the cloned kappa-, delta-, and mu-opioid receptors." <u>Mol Pharmacol</u> **45**(2): 330-334.
- Raynor, K., H. Kong, et al. (1996). "Molecular biology of opioid receptors." <u>NIDA Res Monogr</u> **161**: 83-103.
- Rekling, J. C. (1993). "Effects of met-enkephalin on GABAergic spontaneous miniature IPSPs in organotypic slice cultures of the rat hippocampus." <u>The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for</u> <u>Neuroscience</u> **13**(5): 1954-1964.
- Remondes, M. and E. M. Schuman (2002). "Direct cortical input modulates plasticity and spiking in CA1 pyramidal neurons." <u>Nature</u> **416**(6882): 736-740.
- Rhee, S. G. (2001). "Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C." <u>Annu Rev Biochem</u> 70: 281-312.
- Roberts, A. J., J. S. McDonald, et al. (2000). "mu-Opioid receptor knockout mice do not self-administer alcohol." <u>The</u> Journal of pharmacology and experimental therapeutics **293**(3): 1002-1008.
- Robles, Y., P. E. Vivas-Mejia, et al. (2003). "Hippocampal gene expression profiling in spatial discrimination learning." <u>Neurobiol Learn Mem</u> **80**(1): 80-95.
- Robles, Y., P. E. Vivas-Mejia, et al. (2003). "Hippocampal gene expression profiling in spatial discrimination learning." <u>Neurobiol Learn Mem</u> **80**(1): 80-95.
- Rossier, J. (1988). "[Biosynthesis of opioid peptides]." <u>Ann Endocrinol (Paris)</u> 49(4-5): 371-373.

- Rudy, J. W. (2009). "Context representations, context functions, and the parahippocampal-hippocampal system." <u>Learn Mem</u> **16**(10): 573-585.
- Salemi, S., A. Aeschlimann, et al. (2005). "Detection of kappa and delta opioid receptors in skin--outside the nervous system." <u>Biochemical and biophysical research communications</u> **338**(2): 1012-1017.
- Salvadori, S., R. Guerrini, et al. (1999). "Further studies on the Dmt-Tic pharmacophore: hydrophobic substituents at the C-terminus endow delta antagonists to manifest mu agonism or mu antagonism." <u>I Med Chem</u> **42**(24): 5010-5019.
- Sar, M., W. E. Stumpf, et al. (1978). "Immunohistochemical localization of enkephalin in rat brain and spinal cord." <u>The</u> <u>Journal of comparative neurology</u> **182**(1): 17-37.
- Scherrer, G., P. Tryoen-Toth, et al. (2006). "Knockin mice expressing fluorescent delta-opioid receptors uncover G protein-coupled receptor dynamics in vivo." <u>Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America</u> **103**(25): 9691-9696.
- Scherrer, G., P. Tryoen-Toth, et al. (2006). "Knockin mice expressing fluorescent delta-opioid receptors uncover G protein-coupled receptor dynamics in vivo." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **103**(25): 9691-9696.
- Schetz, J. A., S. N. Calderon, et al. (1996). "Rapid in vivo metabolism of a methylether derivative of (+/-)-BW373U86: the metabolic fate of [3H]SNC121 in rats." <u>The Journal of pharmacology and experimental therapeutics</u> 279(3): 1069-1076.
- Schikorski, T. "Pre-embedding immunogold localization of antigens in mammalian brain slices." <u>Methods Mol Biol</u> **657**: 133-144.
- Schiller, P. W., G. Weltrowska, et al. (1993). "TIPP[psi]: a highly potent and stable pseudopeptide delta opioid receptor antagonist with extraordinary delta selectivity." <u>J Med Chem</u> **36**(21): 3182-3187.
- Seizinger, B. R., V. Hollt, et al. (1984). "Proenkephalin B (prodynorphin)-derived opioid peptides: evidence for a differential processing in lobes of the pituitary." <u>Endocrinology</u> **115**(2): 662-671.
- Shippenberg, T. S., V. I. Chefer, et al. (2009). "Delta-opioid receptor antagonists prevent sensitization to the conditioned rewarding effects of morphine." <u>Biol Psychiatry</u> **65**(2): 169-174.
- Shippenberg, T. S., V. I. Chefer, et al. (2009). "Delta-opioid receptor antagonists prevent sensitization to the conditioned rewarding effects of morphine." <u>Biol Psychiatry</u> **65**(2): 169-174.
- Shiraishi, Y., A. Mizutani, et al. (2003). "Coincidence in dendritic clustering and synaptic targeting of homer proteins and NMDA receptor complex proteins NR2B and PSD95 during development of cultured hippocampal neurons." <u>Mol Cell Neurosci</u> **22**(2): 188-201.
- Shoda, T., K. Fukuda, et al. (2001). "Activation of mu-opioid receptor induces expression of c-fos and junB via mitogenactivated protein kinase cascade." <u>Anesthesiology</u> **95**(4): 983-989.
- Shook, J. E., W. D. Watkins, et al. (1990). "Differential roles of opioid receptors in respiration, respiratory disease, and opiate-induced respiratory depression." <u>Am Rev Respir Dis</u> **142**(4): 895-909.
- Simmons, M. L. and C. Chavkin (1996). "Endogenous opioid regulation of hippocampal function." <u>Int Rev Neurobiol</u> **39**: 145-196.
- Simon, E. J. (1973). "In search of the opiate receptor." <u>Am J Med Sci</u> 266(3): 160-168.
- Simonin, F., C. Gaveriaux-Ruff, et al. (1995). "kappa-Opioid receptor in humans: cDNA and genomic cloning, chromosomal assignment, functional expression, pharmacology, and expression pattern in the central nervous system." <u>Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America</u> 92(15): 7006-7010.
- Simonin, F., O. Valverde, et al. (1998). "Disruption of the kappa-opioid receptor gene in mice enhances sensitivity to chemical visceral pain, impairs pharmacological actions of the selective kappa-agonist U-50,488H and attenuates morphine withdrawal." <u>Embo J</u> 17(4): 886-897.

- Slowe, S. J., F. Simonin, et al. (1999). "Quantitative autoradiography of mu-,delta- and kappa1 opioid receptors in kappa-opioid receptor knockout mice." <u>Brain research</u> **818**(2): 335-345.
- Smart, D., G. Smith, et al. (1994). "mu-Opioid receptor stimulation of inositol (1,4,5)trisphosphate formation via a pertussis toxin-sensitive G protein." <u>J Neurochem</u> **62**(3): 1009-1014.
- Sodickson, D. L. and B. P. Bean (1998). "Neurotransmitter activation of inwardly rectifying potassium current in dissociated hippocampal CA3 neurons: interactions among multiple receptors." <u>The Journal of neuroscience</u> <u>: the official journal of the Society for Neuroscience</u> **18**(20): 8153-8162.
- Somogyi, P. and T. Klausberger (2005). "Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus." <u>I Physiol</u> **562**(Pt 1): 9-26.
- Sora, I. (2001). "[Study of drug dependence using genetically modified animals]." <u>Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku</u> <u>Zasshi</u> **21**(5): 163-164.
- Sora, I., M. Funada, et al. (1997). "The mu-opioid receptor is necessary for [D-Pen2,D-Pen5]enkephalin-induced analgesia." <u>Eur J Pharmacol</u> **324**(2-3): R1-2.
- Sora, I., X. F. Li, et al. (1999). "Visceral chemical nociception in mice lacking mu-opioid receptors: effects of morphine, SNC80 and U-50,488." <u>Eur J Pharmacol</u> **366**(2-3): R3-5.
- Spanagel, R., A. Herz, et al. (1992). "Opposing tonically active endogenous opioid systems modulate the mesolimbic dopaminergic pathway." <u>Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America</u> 89(6): 2046-2050.
- Speed, H. E. and L. E. Dobrunz (2009). "Developmental changes in short-term facilitation are opposite at temporoammonic synapses compared to Schaffer collateral synapses onto CA1 pyramidal cells." <u>Hippocampus</u> **19**(2): 187-204.
- Stefano, G. B., M. Salzet, et al. (1998). "Delta2 opioid receptor subtype on human vascular endothelium uncouples morphine stimulated nitric oxide release." <u>International journal of cardiology</u> **64 Suppl 1**: S43-51.
- Stein, C. and L. J. Lang (2009). "Peripheral mechanisms of opioid analgesia." Curr Opin Pharmacol 9(1): 3-8.
- Steward, O. and S. A. Scoville (1976). "Retrograde labeling of central nervous pathways with tritiated or Evans bluelabeled bovine serum albumin." <u>Neurosci Lett</u> **3**(4): 191-196.
- Stoppini, L., P. A. Buchs, et al. (1991). "A simple method for organotypic cultures of nervous tissue." Journal of <u>neuroscience methods</u> **37**(2): 173-182.
- Stumm, R. K., C. Zhou, et al. (2004). "Neuronal types expressing mu- and delta-opioid receptor mRNA in the rat hippocampal formation." <u>The Journal of comparative neurology</u> **469**(1): 107-118.
- Stumm, R. K., C. Zhou, et al. (2004). "Neuronal types expressing mu- and delta-opioid receptor mRNA in the rat hippocampal formation." J Comp Neurol **469**(1): 107-118.
- Surratt, C. K. and W. R. Adams (2005). "G protein-coupled receptor structural motifs: relevance to the opioid receptors." <u>Curr Top Med Chem</u> **5**(3): 315-324.
- Svoboda, K. R., C. E. Adams, et al. (1999). "Opioid receptor subtype expression defines morphologically distinct classes of hippocampal interneurons." <u>J Neurosci</u> **19**(1): 85-95.
- Svoboda, K. R., C. E. Adams, et al. (1999). "Opioid receptor subtype expression defines morphologically distinct classes of hippocampal interneurons." <u>The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for</u> <u>Neuroscience</u> **19**(1): 85-95.
- Svoboda, K. R. and C. R. Lupica (1998). "Opioid inhibition of hippocampal interneurons via modulation of potassium and hyperpolarization-activated cation (Ih) currents." <u>The Journal of neuroscience : the official journal of the</u> <u>Society for Neuroscience</u> **18**(18): 7084-7098.
- Swearengen, E. and C. Chavkin (1989). "Comparison of opioid and GABA receptor control of excitability and membrane conductance in hippocampal CA1 pyramidal cells in rat." <u>Neuropharmacology</u> **28**(7): 689-697.

- Tanowitz, M. and M. von Zastrow (2003). "A novel endocytic recycling signal that distinguishes the membrane trafficking of naturally occurring opioid receptors." <u>The Journal of biological chemistry</u> **278**(46): 45978-45986.
- Terenius, L. (1973). "Characteristics of the "receptor" for narcotic analgesics in synaptic plasma membrane fraction from rat brain." <u>Acta Pharmacol Toxicol (Copenh</u>) **33**(5): 377-384.
- Terenius, L. and A. Wahlstrom (1975). "Search for an endogenous ligand for the opiate receptor." <u>Acta Physiol Scand</u> **94**(1): 74-81.
- Toll, L., I. P. Berzetei-Gurske, et al. (1998). "Standard binding and functional assays related to medications development division testing for potential cocaine and opiate narcotic treatment medications." <u>NIDA Res</u> <u>Monogr</u> **178**: 440-466.
- Trapaidze, N., D. E. Keith, et al. (1996). "Sequestration of the delta opioid receptor. Role of the C terminus in agonistmediated internalization." <u>The Journal of biological chemistry</u> **271**(46): 29279-29285.
- Tsao, P. I. and M. von Zastrow (2000). "Type-specific sorting of G protein-coupled receptors after endocytosis." <u>The</u> <u>Journal of biological chemistry</u> **275**(15): 11130-11140.
- Twitchell, W. A. and S. G. Rane (1993). "Opioid peptide modulation of Ca(2+)-dependent K+ and voltage-activated Ca2+ currents in bovine adrenal chromaffin cells." <u>Neuron</u> **10**(4): 701-709.
- Ungewickell, E. J. and L. Hinrichsen (2007). "Endocytosis: clathrin-mediated membrane budding." <u>Curr Opin Cell Biol</u> **19**(4): 417-425.
- Urca, G., H. Frenk, et al. (1977). "Morphine and enkephalin: analgesic and epileptic properties." <u>Science</u> **197**(4298): 83-86.
- Vaccarino, A. L. and A. J. Kastin (2000). "Endogenous opiates: 1999." Peptides 21(12): 1975-2034.
- Verwer, R. W., R. J. Meijer, et al. (1997). "Collateral projections from the rat hippocampal formation to the lateral and medial prefrontal cortex." <u>Hippocampus</u> **7**(4): 397-402.
- von Zastrow, M., A. Svingos, et al. (2003). "Regulated endocytosis of opioid receptors: cellular mechanisms and proposed roles in physiological adaptation to opiate drugs." <u>Curr Opin Neurobiol</u> **13**(3): 348-353.
- Vonvoigtlander, P. F., R. A. Lahti, et al. (1983). "U-50,488: a selective and structurally novel non-Mu (kappa) opioid agonist." <u>The Journal of pharmacology and experimental therapeutics</u> **224**(1): 7-12.
- Waldhoer, M., S. E. Bartlett, et al. (2004). "Opioid receptors." <u>Annu Rev Biochem</u> 73: 953-990.
- Wang, H. L. (2000). "A cluster of Ser/Thr residues at the C-terminus of mu-opioid receptor is required for G proteincoupled receptor kinase 2-mediated desensitization." <u>Neuropharmacology</u> **39**(3): 353-363.
- Wang, J. B., P. S. Johnson, et al. (1994). "Human mu opiate receptor. cDNA and genomic clones, pharmacologic characterization and chromosomal assignment." <u>FEBS letters</u> **338**(2): 217-222.
- Wang, Y., E. J. Van Bockstaele, et al. (2008). "In vivo trafficking of endogenous opioid receptors." <u>Life Sci</u> **83**(21-22): 693-699.
- Wei, Z. Y., W. Brown, et al. (2000). "N,N-Diethyl-4-(phenylpiperidin-4-ylidenemethyl)benzamide: a novel, exceptionally selective, potent delta opioid receptor agonist with oral bioavailability and its analogues." J <u>Med Chem</u> 43(21): 3895-3905.
- Wetherington, J. P. and N. A. Lambert (2002). "Differential desensitization of responses mediated by presynaptic and postsynaptic A1 adenosine receptors." <u>The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for</u> <u>Neuroscience</u> 22(4): 1248-1255.
- Whistler, J. L., P. Tsao, et al. (2001). "A phosphorylation-regulated brake mechanism controls the initial endocytosis of opioid receptors but is not required for post-endocytic sorting to lysosomes." <u>The Journal of biological</u> <u>chemistry</u> 276(36): 34331-34338.

- Williams, J. T., M. J. Christie, et al. (2001). "Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence." <u>Physiol</u> <u>Rev</u> **81**(1): 299-343.
- Williams, J. T., T. M. Egan, et al. (1982). "Enkephalin opens potassium channels on mammalian central neurones." <u>Nature</u> **299**(5878): 74-77.
- Williams, T. J., A. Torres-Reveron, et al. (2011). "Hormonal regulation of delta opioid receptor immunoreactivity in interneurons and pyramidal cells in the rat hippocampus." <u>Neurobiol Learn Mem</u> **95**(2): 206-220.
- Witter, M. P., F. G. Wouterlood, et al. (2000). "Anatomical organization of the parahippocampal-hippocampal network." <u>Ann N Y Acad Sci</u> **911**: 1-24.
- Xiang, B., G. H. Yu, et al. (2001). "Heterologous activation of protein kinase C stimulates phosphorylation of deltaopioid receptor at serine 344, resulting in beta-arrestin- and clathrin-mediated receptor internalization." <u>The Journal of biological chemistry</u> 276(7): 4709-4716.
- Ylinen, A., A. Bragin, et al. (1995). "Sharp wave-associated high-frequency oscillation (200 Hz) in the intact hippocampus: network and intracellular mechanisms." <u>The Journal of neuroscience : the official journal of</u> <u>the Society for Neuroscience</u> **15**(1 Pt 1): 30-46.
- Zastawny, R. L., S. R. George, et al. (1994). "Cloning, characterization, and distribution of a mu-opioid receptor in rat brain." <u>J Neurochem</u> **62**(6): 2099-2105.
- Zhang, X., F. Wang, et al. (2008). "Post-endocytic fates of delta-opioid receptor are regulated by GRK2-mediated receptor phosphorylation and distinct beta-arrestin isoforms." <u>J Neurochem</u> **106**(2): 781-792.
- Zhang, X., F. Wang, et al. (2005). "Beta-arrestin1 and beta-arrestin2 are differentially required for phosphorylationdependent and -independent internalization of delta-opioid receptors." <u>J Neurochem</u> **95**(1): 169-178.
- Zhu, F., C. X. Yan, et al. "Effects of pre-training morphine on spatial memory acquisition and retrieval in mice." <u>Physiol</u> <u>Behav</u> **104**(5): 754-760.
- Zhu, W., P. Cadet, et al. (2005). "Human white blood cells synthesize morphine: CYP2D6 modulation." Journal of immunology **175**(11): 7357-7362.
- Zhu, Y., M. A. King, et al. (1999). "Retention of supraspinal delta-like analgesia and loss of morphine tolerance in delta opioid receptor knockout mice." <u>Neuron</u> **24**(1): 243-252.
- Zieglgansberger, W., E. D. French, et al. (1979). "Opioid peptides may excite hippocampal pyramidal neurons by inhibiting adjacent inhibitory interneurons." <u>Science</u> **205**(4404): 415-417.

Résumé

Le récepteur aux opioïdes δ fait partie du système opioïde, un système neuromodulateur composé de peptides endogènes (enképhalines, dynorphines et beta-endorphine) et de trois récepteurs (μ , δ et κ). Notre laboratoire s'intéresse aux réponses adaptatives des récepteurs aux opioïdes à l'usage abusif des drogues. Le récepteur δ est exprimé dans l'hippocampe, siège de la mémoire épisodique, et son implication dans les interactions entre drogue et contexte d'administration fait l'objet d'un intérêt croissant. Bien qu'identifiés de longue date, l'expression et le rôle de ces récepteurs dans les interneurones de l'hippocampe restent peu étudiés, tout comme la localisation et la fonction de ces derniers au sein des différents réseaux hippocampiques, en particulier le CA1. Par ailleurs, la majorité des études portant sur le récepteur δ ont été réalisées en systèmes hétérologues ou en cultures primaires de neurones. Si ces modèles ont permis de comprendre les mécanismes de base du fonctionnement de ce récepteur, ils ne prennent pas en compte la diversité des types neuronaux. De plus, la morphologie et la physiologie des neurones isolés sont vraisemblablement modifiées par rapport à la situation *in vivo*. Il apparaît donc primordial d'aborder l'étude de ce récepteur en réseau intégré afin d'appréhender l'activation et l'internalisation du récepteur δ dans le contexte le plus physiologique possible.

Pour aborder ces questions, j'ai utilisé une souris knock-in DOR-eGFP développée au laboratoire, qui exprime en lieu et place du récepteur δ natif, une version rendue fluorescente par couplage à son extrémité C terminale de la protéine verte fluorescente (eGFP). Cette souris est un excellent outil pour visualiser *in vivo* le récepteur avec une résolution subcellulaire et ainsi pallier le manque d'anticorps spécifiques.

Dans la première partie de ma thèse, j'ai mis au point et validé l'utilisation de tranches aiguës d'hippocampe de souris DOR-eGFP, pour l'étude de l'activation et de l'internalisation du récepteur δ . J'ai montré, par des expériences de traçage neuronal et d'électrophysiologie, un recrutement différent des sous-populations neuronales exprimant les récepteurs m et δ par les deux afférences excitatrices du CA1, les collatérales de Schaffer et la voie temporoammonique. Ce travail est présenté sous forme d'un manuscrit en cours de soumission: *« Schaffer collateral and temporoammonic pathways differentially recruit mu and* δ *opioid receptor expressing interneurons in the mouse hippocampus."* Xavier Rezaï, Brigitte Kieffer, Michel Roux, and Dominique Massotte.

Dans la seconde partie de mon travail, je me suis intéressé à la dynamique en temps réel du récepteur delta. En effet, l'application systémique d'un agoniste exogène *in vivo* induit un phénomène d'internalisation massive du récepteur conduisant à une déplétion totale de la membrane plasmique et prohibant toute réponse à une stimulation ultérieure. Ceci ne paraît pas compatible avec une activation physiologique par des peptides endogènes libérés localement au niveau synaptique. Je me suis donc intéressé à la réponse du récepteur δ à une activation locale par un agoniste exogène. En particulier, j'ai cherché à établir de potentielles différences entre soma et dendrites. Pour ce faire, j'ai développé une approche associant visualisation en temps réel au microscope confocal et injection locale de ligand en tranche aiguë au niveau du neurone d'intérêt. J'ai ensuite comparé l'effet de la deltorphine II, peptide exogène et de la Met-enképhaline, peptide opioïde endogène.

Dans la troisième partie, j'ai développé au laboratoire la culture organotypique à partir de tranches d'hippocampe de souris knock-in DOR-eGFP. Le but était de fournir une alternative aux tranches aiguës pour l'étude de la dynamique en temps réel de l'internalisation du récepteur δ . Ce système a été utilisé pour étudier la localisation pré- ou post-synaptique du récepteur δ aux niveau de la couche pyramidale de l'hippocampe. Ce travail est présenté sous forme d'un manuscrit soumis: «*Mouse* δ *opioid receptors are located on presynaptic afferences to hippocampal pyramidal cells.*» Xavier Rezaï, Lauren faget, Ewa Bednareck, Yannick Schwab, Pico Caroni, Brigitte L. Kieffer, Dominique Massotte