

AIX-MARSEILLE UNIVERSITE

Faculté des Sciences de Luminy

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

THESE DE DOCTORAT

En vue de l'obtention du grade de

Docteur d'Aix-Marseille Université

Spécialité Neurosciences

Présentée et soutenue publiquement par :

Laurène SAVE

Le 12 Octobre 2017

**Spécification développementale de la diversité morpho-
fonctionnelle des neurones glutamatergiques du gyrus denté
de la souris adulte**

Jury de thèse

Dr. Valérie CREPEL	Présidente du Jury
Dr. Nora ABROUS	Rapporteur
Dr. Muriel THOBY-BRISSON	Rapporteur
Dr. Frédéric CHAVANE	Examineur
Dr. Xavier LEINEKUGEL	Examineur
Dr. Rosa COSSART	Directrice de thèse

INMED – INSERM U 901
Institut de Neurobiologie de la Méditerranée

« C'est impossible, dit la Fierté
C'est risqué, dit l'Expérience
C'est sans issue, dit la Raison
Essayons, murmure le Cœur »

William Arthur Ward

Résumés

Spécification développementale de la diversité morpho-fonctionnelle des neurones glutamatergiques du gyrus denté de la souris adulte

L'origine temporelle et spatiale détermine de façon critique la diversité des neurones corticaux. Parmi ces structures corticales, nous nous sommes intéressés au gyrus denté (GD) qui est la principale porte d'entrée des afférences du cortex entorhinal (CE) sur l'hippocampe. Il a été récemment rapporté que le GD (hors hile) comprenait deux sous-catégories morpho-physiologiques de cellules glutamatergiques, les cellules granulaires (CG) et les cellules granulaires semilunaires (CGS). Bien que ces dernières ne représentent qu'une très faible proportion des neurones glutamatergiques du GD, caractérisées par une morphologie dendritique et une localisation de leur soma particulière, elles ont été dernièrement identifiées comme étant un composant majeur du traitement de l'information à travers le circuit du GD. Étant donné que les neurones GABAergiques et glutamatergiques pionniers de CA3 ont été montrés comme se développant en neurones supportant les fonctions majeures de réseau, nous nous sommes demandé si une origine temporelle précoce pourrait également spécifier le devenir des CGS. Nous avons alors montré que les CGS sont générées bien avant la population générale des CG. Outre leur morphologie, les CGS adultes présentent des caractéristiques électrophysiologiques particulières contribuant à une excitabilité moindre, qu'elles partagent avec les CG pionnières. De plus, nos observations pour le « fate mapping » ont mis en évidence que les cellules moussues (CM), neurones glutamatergiques principaux du hile du GD, faisaient également partie d'une population de neurones générés tôt. En tenant compte de cette observation, nous avons montré l'existence de contacts présumés entre les fibres moussues (axones des CG et CGS) et les dendrites des CM générées tôt du hile. Cela mettrait donc en exergue un réseau pionnier au sein du GD entre des populations de neurones générés tôt de différentes sous-structures.



Developmental specification of the morpho-functional diversity of the glutamatergic neurons of the adult mouse dentate gyrus

Temporal and spatial origin critically determines the cortical neurons diversity. Among these cortical structures, we are interested in the dentate gyrus (DG), which is the main entry point for afferences of the entorhinal cortex (EC) on the hippocampus. It has been recently reported that GD (excluding hilus) comprised two morpho-physiological subcategories of glutamatergic cells, granular cells (GC) and semilunar granular cells (SGC). Although the latter represent only a very small minority of GD glutamatergic neurons, characterized by a particular dendritic morphology and localization of their soma, they have recently been identified as a major component of information processing across DG circuit. Since both early born GABAergic and glutamatergic neurons in CA3 were shown to develop into neurons supporting major network functions, we wondered whether an early temporal origin could similarly specify the semilunar cell fate. We then showed that SGC, are generated earlier than the general population of GCs. Besides morphology, adult SGC display characteristic electrophysiological features contributing to a lower excitability shared with pioneer GC. In addition, our observations to fate map GC and SGC showed that mossy cells (MC), the main glutamatergic neurons of the DG hilus, were also part of an early born neuronal population. Taking into account this observation, we have shown the existence of contacts between the mossy fibers (GC and SGC axons) and the dendrites of the early born MC of the hilus. This would highlight a pioneer network within the GD between early born neuron populations of different substructures.

Remerciements

Je souhaitais avant toute chose remercier chaleureusement les membres du jury d'avoir accepté aussi rapidement de lire et d'évaluer ce travail de thèse. Merci donc à Nora Abrous, Muriel Thoby-Brisson, Frédéric Chavane, Xavier Leinekugel et Valérie Crépel De m'avoir fait cet immense honneur. Merci également, pour tous les conseils que vous m'avez donnés quand j'en avais besoin !

A l'équipe.

J'adresse mes premiers remerciements à ma directrice de thèse, Rosa Cossart. Tu m'as permis de développer mon côté scientifique à un niveau très élevé. Merci pour tous tes conseils et toutes les discussions qu'on a pu avoir (scientifiques et surtout non-scientifiques !!). J'ai le souvenir de mon stage de M1 où je m'étais rendue compte que je voulais faire ma thèse dans ton équipe. On avait alors fait un bidouillage en catastrophe avec l'aide de Constance Hammond, que je remercie également chaleureusement, pour me permettre de changer de stage de M1 (la loi du master interdisant encore de faire les stages de M1 et M2 dans la même équipe). Encore merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir laissé cette autonomie qui m'a permis de me construire durant ces 3 belles années. J'adresse ensuite mes remerciements les plus sincères à Agnès Baude, la « maman » de l'équipe. Tu ajoutes du pep's au labo et ton côté humain et concerné est réellement indispensable pour la vie de l'équipe. Merci d'avoir pris autant de temps pour me former à l'immuno, au traitement d'image et à l'imagerie. Je garderai un excellent souvenir de nos échanges scientifiques et non-scientifiques.

Merci aussi aux membres passés et présents de l'équipe ! Merci Phil pour ton soutien, ta gentillesse et de m'avoir tout appris sur les PCR, le vibratome et les souris. Merci Vitor pour toutes les blagues qu'on échangeait. Merci Thomas pour ton indéniable aide apportée tout au long de ces 3 années, sans toi j'aurais été perdue plus d'une fois. Merci Claire, ma poulette, ma kékette, mon chaton, et voisine de bureau. Heureusement que tu étais là ! Merci pour à peu près tout : ton soutien, nos discussions philosophiques, nos petits post-it échangés, nos fous-rire. Tu vas me manquer ! Merci Susanne et Laura, votre présence a été très réconfortante quand ça n'allait pas très fort. Merci Davide, je suis très fière que tu aies été le premier étudiant en master que j'ai formé au patch. Je suis également très heureuse que ce soit toi qui prennes le relai sur mon set-up ! Prends-en

soin. Merci Michel, PP, Arnaud, Pierre, Yannick, Marco et David, grâce à vous je peux dire que j'ai été fière d'être dans cette équipe. Merci Catherine pour toutes les révélations immuno que tu as faite pour moi, ça m'a permis d'avancer à pas de géants dans mon projet. Merci également à Loris pour les souris et les génotypages. Et puis je dois ajouter que l'idée d'organiser les sessions d'Urban Training était parfaite !! Grâce à toi, j'ai pu garder la forme tout au long de ma thèse (du moins dans ma tête).

A l'INMED

Merci au groupe d'Urban avec qui j'ai vraiment passé d'excellents moments ! Même si parfois c'était difficile, et que j'étais pleine de courbatures pendant une semaine. Je vais garder toutes les photos précieusement ! Merci aux filles de l'équipe Manzoni (je pense à Anissa, Marion, Milene, Antonia) et à Manal qui ont rendu mes pauses déjeuner très sympas !

Merci à Laurent, mon parrain de thèse et mon sauveur ! Je n'ai pas compté le nombre de fois où tu es venu à mon secours quand tout foirait sur le poste d'électrophysio ! J'essaierai de faire des meringues rien que pour toi !

Merci à Constance Hammond et Edouard Pearlstein de m'avoir formée au patch et à l'analyse des données pendant mon stage de M1. Merci aux animaliers qui ont pris soin de mes petites souris. Le bien-être de mes souris étant à la base de toutes mes manipulations je leur suis très reconnaissante ! Merci à François Michel qui a toujours été de très bons conseils pour l'imagerie. Tu as toujours été à l'écoute et impliqué, ça m'a beaucoup aidé. Merci à Bahija, Nicole, Anne-Marie et Christine de l'administration qui ont fait un travail remarquable, me permettant d'avancer dans mon travail. Merci également à la PBMC qui met à disposition un savoir-faire et un matériel de qualité. Merci à Robert avec qui on s'est plusieurs fois retrouvé à bricoler des bidules pour améliorer les manipulations.

Merci à tous les sourires, tous les bonjours, toutes les petites discussions de couloir qui ont créé un environnement de travail très agréable !

Aux amis,

Un immense merci à vous tous ! Le master, la thèse et ma vie en général n'aurait jamais été aussi fun sans vous !! Merci au groupe du master (Tristan, Lucie, Lousie, Fx, Laetitia, Julie, Maureen, Antoine, Elise) avec qui j'ai passé les meilleurs moments de toute ma vie

étudiante ! Et avec qui je continue de partager plein de fous-rire et de coups de gueule. Vous avez toujours été là pour me remonter le moral quand j'étais au fond du seau. Votre enthousiasme m'a été très précieux surtout à la fin de la thèse où je croulais sous le travail.

Je remercie également tous mes amis et collègues du labo. Au groupe Lucie, Agathe, Morgane et Alex avec qui on a tellement rigolé et tellement pleuré de tout ce qui nous arrivait ! Je vous souhaite de terminer votre thèse en beauté et d'être fier de votre travail. Et pour Agathe, je te souhaite de pulvériser tous les concours pour enfin devenir la prof de bio kiffée par tous les élèves !! Petite mention spéciale pour le film de première année que nous avons écrit, réalisé et produit ensemble ! Merci à Romain, Manue, Fanny, Robin, Baptiste, Camille, Carola, avec qui j'ai toujours bien rigolé. Merci également pour votre soutien moral quand j'en ai vraiment eu besoin. Je repense à cette fois sur le plongeur où Robin et Baptiste étaient venus me consoler après un petit craquage. Et j'ai une question pour toi Fanny, aurais-tu vu Catherine ? Je la cherche toujours depuis San Diego ! J'ai adoré parlé science avec toi Romain. Tu es un peu l'amoureux des neurosciences et j'admire ta passion. Force et robustesse, Manue, tu vas y arriver (de toute façon, on n'a pas le choix... lol) !

Je remercie également tous mes amis et collègues hors du labo ! Merci à Steph, nos petites marches dans la colline étaient parfaites pour évacuer mon stress et ma fatigue intellectuelle du boulot. Promis, à la rentrée on s'y remet ! Merci à Kevin avec qui j'ai pu parler moto. Merci à Elsa et Guillaume pour les discussions boulot et non-boulot qui m'ont fait du bien. Merci à la bande (Ben, Bastien, Christophe, Julie, Maxime, Florent) avec qui j'ai passé de supers soirées qui m'ont fait sortir la tête du guidon.

Merci à Olivia et Christophe avec qui j'ai créé Blog'n'Brain. Cela restera une de mes plus grandes fiertés que de voir le blog évoluer et s'enrichir de tous nos articles de vulgarisation des neurosciences !

Merci à l'équipe du LNC (Francesca, Bruno P., Vincent, Franck, Bruno T.) qui m'a vue grandir dans le monde scientifique. Toutes les discussions que l'on a eues ont enrichie ma vie. Votre soutien a été précieux.

Merci à l'équipe de Lydia Kerkerian qui m'a donné le goût de la recherche en L3.

A la famille.

Tout d'abord je souhaiterais remercier ma moitié, Rémy. Le monde de la recherche t'était inconnu mais tu as toujours été d'un soutien sans faille ! Tu m'as poussée à donner le meilleur de moi-même car comme tu dis, « le boulot d'abord, le reste après », parfois poussé à l'extrême. Je me rappelle de la fois où j'avais été clouée au lit avec de la fièvre et où le lendemain, mettant la main sur mon front alors que j'étais toujours couchée, tu m'avais dit, tu n'as plus de fièvre va au boulot. J'étais revenue le soir avec 39,5° de fièvre... Tu as été parfait et encore plus dans les derniers moments avant d'envoyer ma thèse ! J'ai été chouchoutée comme jamais (surtout avec le rizotto du feu de dieu que tu m'avais cuisiné) ! Je dois avouer que si je ne pars pas en post-doc, si je ne continue pas dans la recherche c'est aussi pour rester à tes côtés chaque jour de ma vie, et ce, j'ose espérer, jusqu'à la fin de mes jours. Tu es mon étoile du nord, mon Ange gardien (ton deuxième prénom te va si bien !), mon casse-pied de maniaque en chef ! Avec toi à mes côtés je n'ai peur de rien ! Tu m'as fait découvrir la vie. Tu m'as appris que tout est possible avec de la volonté, du calcul et de la force de caractère. J'espère avoir pris de toi pour tout ça. En tous les cas, grâce à toi et pour toi, je me lance sereinement dans ma future vie de prof de bio !

Je remercie également mes parents pour le soutien qu'ils m'ont apporté. Ils m'ont suivi tout au long de mes études écoutant mes doutes et mes joies, tout en me conseillant à chaque moment décisif. Si j'ai fait une thèse, c'est aussi en partie parce que j'ai baigné dans la science depuis toute petite. Je me rappelle avoir dessiné toute mon enfance sur des feuilles de brouillon pleines d'images de cerveaux et de cellules de lieu. Et au lieu de me dégouter cela attisé ma curiosité, jusqu'à en faire une thèse. Lors de mon stage de 3^{ème} au sein du labo de mon père, j'ai entendu pour la première fois une cellule de lieu décharger au cours d'un enregistrement électrophysiologique. J'ai été émerveillée. J'avais envie d'être un chercheur ! Merci de m'avoir aidé pour le manuscrit de ma thèse quand j'étais noyée. Merci également à mes petites sœurs, Ariane et Pauline. Je vous souhaite de réussir et de vous épanouir dans votre domaine (graphisme et médecine).

Merci également à Gérard et Chantal, mes beaux-parents, qui ont toujours été adorables avec moi, au grand damne de Rémy. Merci à Simone et Denis, mes grands-parents d'adoption qui ont été toujours très attentionnés et compréhensifs. Merci à Maurice et Aimée pour tous ces apéros qui m'ont fait prendre des kilos de bonheur ! Merci Laury et

Thibaut qui m'ont souvent posé des questions sur mon boulot auxquelles j'ai toujours eu du plaisir à répondre.

Je finirai en disant que j'ai de la chance de vous avoir tous à mes côtés. Si je suis la personne forte qui se présente au jury le 12 c'est beaucoup grâce à tout ce que vous m'avez apporté !!



Table des matières

<i>Liste des figures</i>	15
<i>Liste des abréviations</i>	17
<i>Préambule.....</i>	19
<i>Avant-propos</i>	20
Partie 1 : Contexte Scientifique	23
I. Structure étudiée : le gyrus denté (GD) de l'hippocampe.....	24
A/ Qu'est-ce que l'hippocampe et le GD ?	25
1. Il était une fois l'hippocampe	25
2. Qu'appelle-t-on hippocampe ?	26
3. Qu'appelle-t-on gyrus denté ?	28
4. Le circuit tri-synaptique : le fil rouge de l'hippocampe.....	30
5. Les autres circuits de l'hippocampe.....	31
B/ Quelles fonctions pour l'hippocampe et le GD ?	33
1. La mémoire dans la peau	33
1.1 Le cas Henri Molaison : la fonction mnésique chez l'homme	33
1.2 Une pluralité de mémoires	34
2. Les mécanismes de la mémorisation d'un épisode.....	37
2.1 La mémoire épisodique	37
2.2 Echanges de bons procédés entre le cortex et l'hippocampe	38
a) Le cortex envoie des informations à l'hippocampe	38
b) L'hippocampe envoie des informations au cortex : consolidation mnésique.....	39
2.3 La navigation spatiale : encoder le « où » d'un épisode	40
2.4 Encodage des souvenirs : implication du gyrus denté	41
a) Définition de la séparation des représentations	42
b) Séparation des représentations : un rôle du GD.....	42
2.5 Restitution des souvenirs : la Madeleine de Proust.....	48
C/ Une construction cytologique organisée et connectée	49
1. Les cellules granulaires (CG).....	50
1.1 Morphologie du soma et des dendrites.....	50
1.2 Connexions afférentes.....	51
1.3 Morphologie de l'axone et cibles post-synaptiques	53
1.4 Implications fonctionnelles en condition physio-pathologique	55

2. Les cellules granulaires semilunaires (CGS).....	56
3. Les cellules moussues (CM).....	61
3.1 Morphologie du soma et des dendrites.....	61
3.2 Connexions afférentes.....	62
3.3 Cibles post-synaptiques.....	63
3.4 Implications fonctionnelles et vulnérabilité.....	64
4. Les interneurons (IN)	64
4.1 Les Cellules en panier ou « Basket Cell »	65
4.2 Les Cellules Chandelier ou « axo-axoniques ».....	66
4.3 Les Cellules HIPP/HICAP/MOPP.....	66
4.4 Les Cellules Calrétinine.....	68
4.5 Les interneurons du gyrus denté dans un contexte connecté.....	68
II. Neurogénèse Développementale et Neurogénèse Adulte du gyrus denté ..	69
A/ Neurogénèse embryonnaire.....	70
1. Genèse des progéniteurs et migration	73
1.1 Détermination des progéniteurs neuronaux.....	73
1.2 Mise en place d'un guide gliale pour la migration.....	74
1.3 Migration de neurones nouvellement formés ainsi que de progéniteurs	74
1.4 Formation de la deuxième zone de neurogénèse.....	74
1.5 Formation de la couche granulaire	75
2. Intégration et maturation électrophysiologique.....	75
B/ Neurogénèse adulte.....	77
1. Particularité et régulation	78
1.1 Maturation et intégration au réseau.....	78
1.2 Propriétés électrophysiologiques particulières durant la période critique	81
2. Régulation multi-factorielle de cette neurogénèse.....	82
3. A quoi servent les neurones formés à l'âge adulte.....	82
3.1 Corrélation entre neurogénèse adulte et performance mnésique	83
3.2 Mais un rôle très compliqué à élucider	83
III. Une nouvelle notion : les neurones pionniers	85
A/ Les neurones hubs GABAergiques.....	86
B/ Les neurones GABAergiques pionniers de CA3.....	87
C/ Les neurones glutamatergiques pionniers de CA3.....	88

Partie 2 : Matériel et méthode	93
I. Souris transgéniques et fate mapping	94
A/ Modèle animal	94
1. De la théorie	94
2. A la pratique	97
B/ Comptage de neurones pour la fate mapping	98
II. Enregistrements électrophysiologiques	100
A/ Préparation des tranches maintenues en survie	100
B/ Paramètres d'enregistrement et protocoles de stimulation	101
III. Reconstruction morphologique des neurones enregistrés	104
A/ Traitement des tranches : fixation, congélation et révélation	104
B/ Microscopie : prise des images, reconstruction et analyse morphométrique	105
IV. Statistiques et analyse en cluster	105
A/ Tests statistiques	105
B/ Analyse en cluster	106
V. Obtention des images des contacts entre les cellules moussues (CM) et les fibres moussues	106
VI. Protocole de l'expérience c-fos	107
Partie 3 : Résultats	109
I. Les résultats de l'article	110
A/ Des neurones pionniers	110
B/ Caractéristiques morphologiques des CG et CGS du GD	111
C/ Caractéristiques électrophysiologiques des neurones pionniers	112
D/ Distribution spatiale particulière des neurones pionniers	115
E/ Des neurones pionniers contactant d'autres neurones pionniers	116
II. Résultats hors article	118
A/ Chronologie de l'apparition des voie glutamatergiques afférentes dans la couche moléculaire	118
B/ Stimulation de la voie perforante	119

C/ Recrutement des neurones du GD in vivo en condition physiologique.....	120
<i>Article</i>	<i>123</i>
Partie 4 : Discussion et conclusion	157
<i>I. Contraintes expérimentales.....</i>	<i>158</i>
A/ La lignée de souris transgénique	158
B/ Etude de neurones rares et marquage à la neurobiotine.....	160
<i>II. Discussion des résultats obtenus.....</i>	<i>162</i>
A/ Un échafaudage de neurones pionniers	162
B/ Connexion préférentielle entre les neurones pionniers de différents types cellulaires.....	164
C/ Une réponse sans décharge persistante pour la stimulation de la voie perforante	165
D/ L'excitabilité moins importante des neurones pionniers.....	166
<i>III. Perspectives.....</i>	<i>168</i>
A/ Implication fonctionnelle au cours du développement	169
B/ Implication fonctionnelle dans les processus de séparation des représentations chez l'adulte	169
1. La place des CGS pionnières dans une séquence d'activation neuronale.....	169
2. Le rôle des CGS pionnières dans la discrimination d'épisodes similaires.....	171
C/ Leur rôle dans un contexte pathologie.....	172
<i>Références Bibliographiques.....</i>	<i>175</i>

Liste des figures

Figure 1 : Illustration de l'hippocampe chez l'homme et chez le rongeur.....	27
Figure 2 : Schéma des différentes sous-parties du gyrus denté	29
Figure 3 : Représentation classique du circuit tri-synaptique de l'hippocampe	30
Figure 4 : Deux autres façons plus complexes de représenter les connexions du circuit tri-synaptique	32
Figure 5 : Schéma d'organisation de la mémoire à long-terme	36
Figure 6 : Représentation des étapes amenant à mémoriser et à restituer des souvenirs	38
Figure 7: Anatomie du système cortico-hippocampique des processus mnésiques	39
Figure 8 : Modèle classique de la consolidation.....	40
Figure 9 : Illustration de la séparation des représentations opérée par le gyrus denté sur les afférences du cortex entorhinal.....	43
Figure 10 : Schéma du flux d'informations vers la formation hippocampique	45
Figure 11 : Bilan des étapes de l'étude de l'hippocampe et du gyrus denté.....	47
Figure 12 : La morphologie des cellules granulaires.....	51
Figure 13 : Les différentes afférences contactant les cellules granulaires.....	52
Figure 14 : Les fibres moussues et les types de synapses formées.....	55
Figure 15 : Propriétés morpho-physiologiques des CGS et des CG	58
Figure 16 : Réponse soutenue des SGC par stimulation de la voie perforante.....	59
Figure 17 : Propriétés électrophysiologiques des CGS après une commotion cérébrale	60
Figure 18 : Exemples de cellules moussues	62
Figure 19 : Cibles post-synaptiques locales des cellules moussues	63
Figure 20 : Reconstruction d'une cellule en panier	65
Figure 21 : Reconstruction d'une cellule chandelier	66
Figure 22 : Reconstruction des interneurones faisant synapse au niveau des dendrites.....	67
Figure 23 : Hétérogénéité des interneurones GABAergiques du gyrus denté.....	69
Figure 24 : Localisation du futur gyrus denté en formation au cours du développement	70
Figure 25 : Expression des molécules architectes de la couche granulaire en regard des différentes étapes conduisant à sa formation	72

Figure 26 : Séquence d'activation électrophysiologique des cellules granulaires.....	76
Figure 27 : Modèle de la neurogénèse adulte.....	79
Figure 28 : Neurogénèse adulte et intégration au réseau	81
Figure 29 : Modèle de l'encodage des informations temporelles par les nouveaux neurones formés immatures.....	85
Figure 30 : Schéma du système d'induction du marquage des neurones glutamatergiques après administration de tamoxifène	96
Figure 31 : Croisement initial pour la génération des mâles reproducteurs ayant le gène activateur et rapporteur.....	97
Figure 32 : Croisement de souris permettant le marquage des neurones glutamatergiques selon leur date de naissance.....	98
Figure 33 : Marquage des pierres en fonction de leur jour de fabrication dans les 4 premiers bâtiments.....	99
Figure 34 : Synthèse des différentes dates et du mode d'administration du tamoxifène.....	99
Figure 35 : Illustration des neurones enregistrés en patch-clamp.....	102
Figure 36 : Illustration de la méthode de patch-clamp et protocole de stimulation.....	103
Figure 37 : Enregistrement en patch-clamp de paires de neurones pionniers.....	104
Figure 38 : Protocole expérimental de l'expérience c-fos	108
Figure 39 : Fenêtre de génèse des CG et des CGS.....	111
Figure 40 : Reconstruction de CG et de CGS.....	112
Figure 41 : Obtention de 3 groupes de neurones après l'analyse en cluster basée sur 11 paramètres électrophysiologiques	114
Figure 42 : Distribution radiale des CG en fonction de leur date de génèse.....	115
Figure 43 : Fenêtre de neurogénèse des CGS et des CM.....	116
Figure 44 : Un réseau pionnier de CGS, CG et CM pionnières	117
Figure 45 : Apparition temporelle et spatiale des voies afférentes glutamatergiques dans la couche moléculaire.....	118
Figure 46 : Réponse à la stimulation de la voie perforante	120
Figure 47 : Expression de c-fos en condition contrôle et lors d'un exercice physique libre	121
Figure 48 : Exemple de tapis indicés.....	170

Liste des abréviations

AA : Axo-axonic cells – cellules chandelier
ACh : Acétylcholine
ATV : Aire Tegmentale Ventrale
BC : Basket cells – cellules en panier
CA1/2/3 : Corne d'Amon 1/2/3
CCK : Cholécystokinine
CE : Cortex Entorhinal
cfos : Gène d'expression immédiate
cg : Couche granulaire
CG : Cellules Granulaires
CGS : Cellules Granulaires Semilunaires
CM : Cellules Moussues
cm : Couche moléculaire
comm : Commissure
CR : Calrétinine
cr : Connexion récurrente
cS : Collatérale de Schaffer
DA : Dopamine
EFN/LFN : Early/late firing neuron
EGN/LGN : Early/late generated neuron
fim : Fimbria
fm: Fibres moussues
GABA : Gamma-Amino Butiric Acid
GD : Gyrus Denté
GFP : Green fluorescent protein
Glut : Glutamatergique
H : Hile
HICAP : Hilar commissural-associational pathway-associated cells
HI : Interneurones hilaires
HIPPA : Hilus perforant path associated cells
IN : Interneurones
IP : Intrapéritonéale
LEC : Entorhinal cortex latéral

MEC : Entorhinal cortex médian
MOPP : Molecular layer performant pathway cells
mt : Terminaisons moussues
nb GC : new born Granule Cell – Cellules Granulaires néoformées
NMDA : N-méthyl-D-aspartate
Ngn2 : Neurogénine 2
PA : Potential d'Action
PDG : Potentiel Dépolarisant Géant
PLT : Potentialisation à Long-Terme
pp : Voie perforante
PréSub : Présubiculum
ParaSub : Parasubiculum
PV : Parvalbumine
SC : Cellules Etoilées
SOM : Somatostatine
Sub : Subiculum
VIP : vasoactive intestinal peptide
ZSG : Zone sous-granulaire
ZSV : Zone sous-ventriculaire
ZV : Zone ventriculaire
5-HT : sérotonine

Préambule

Sur le conseil de ma directrice de thèse, Rosa, j'ai ajouté à mon manuscrit un préambule non scientifique afin d'expliquer ma démarche de rédaction. Comme vous le verrez très rapidement, le ton employé sort volontairement du cadre classique d'une thèse. Il existe deux raisons à cela, liées entre-elles.

Tout d'abord, la passion pour les neurosciences qui m'anime m'a poussée au cours de mon doctorat à créer Blog'n'brain, un blog de vulgarisation neuroscientifique également animé par deux autres doctorants (Olivia Lhomond et Christophe Rodo, voir blognbrain.wordpress.com). Cette plateforme était l'outil idéal pour partager notre passion et offrir un support d'expression pour les autres étudiants en neurosciences. C'est donc dans cet esprit que se situe cette thèse, souhaitant que mon compagnon, ma famille et bien d'autres puissent comprendre ce que j'ai vécu scientifiquement au cours de ces trois belles années.

La deuxième motivation de cette orientation atypique est d'ordre professionnel. En effet, cette passion pour la vulgarisation m'a tout doucement conduite vers l'enseignement. Cette voie, dans laquelle je compte m'engager à l'issue de mon travail de thèse, se dessine avec l'idée que changer le regard du grand public sur la Recherche commence par l'éveil aux sciences des jeunes. C'est donc en cohérence avec mon projet professionnel que je me suis engagée à essayer de rendre accessible mon travail de thèse à un public plus large.

J'espère donc qu'à la lumière de ces explications vous comprendrez mieux le ton que j'emploie dans les lignes qui vont suivre, sans toutefois dénaturer le propos scientifique à la base de ce travail.

Avant-propos

Je me suis souvent demandé au cours de mon doctorat comment j'allais bien pouvoir introduire ma thèse. Et puis finalement, c'est en ce froid matin de Janvier que tout devint limpide. Je montais à pied les 700m de pente qui séparent l'arrêt de bus de l'institut, quand l'image qui allait illustrer mon projet me sauta aux yeux comme une évidence : le développement du cerveau c'est comme la construction d'un grand bâtiment.

Afin d'étayer mon illustration, prenez le bâtiment de l'INMED. Pour sa construction, il a fallu tout d'abord élaborer un plan. Etape que l'on retrouve dans notre parallèle biologique car l'encéphale a également besoin d'un plan d'organisation et de croissance qui est inscrit dans l'ADN de nos cellules et mis en œuvre par une armée de facteurs de transcription.

Revenons à notre bâtiment. Quand la construction débute, vous commencez toujours par les fondations. C'est une étape cruciale, chaque parpaing posé va devoir soutenir l'ensemble du bâtiment. Je ne dis pas que les étapes suivantes sont moins importantes, mais si vous avez une fenêtre qui se casse ou un trou dans le mur, vous serez toujours à temps de la remplacer ou de boucher le trou. Par contre, si une seule pierre de la fondation est mal placée ou endommagée, c'est tout le bâtiment qui en pâti. L'institut tout entier peu devenir bancal de façon irréversible et vulnérable à toute agression extérieure (mouvement de terrain, infiltration d'eau...).

Pour ajouter un niveau de complexité, il existerait au sein même des fondations de notre bâtiment deux types de pierres mélangées : des pierres faites en granit et les parpaings classiques. Les pierres en granit sont fabriquées bien avant les parpaings, sont très rares et sont réparties un peu partout dans les fondations. Ce qui devient intéressant, c'est que ces pierres pionnières ressemblent en tous points aux autres mais elles sont beaucoup plus solides et ont un rôle de soutien bien plus important que les parpaings.

Pour traduire cela à l'aide de notre parallèle biologique, l'équipe du Dr Cossart a démontré par deux fois (Marissal et al., 2012; Picardo et al., 2011) l'existence de neurones dans l'hippocampe qui seraient générés plus tôt que tous les autres et qui seraient cruciaux pour le développement de la structure. Ces neurones pionniers sont

très rares et coexistent localement avec tous les autres neurones plus récents, d'où la difficulté pour les étudier.

Si vous avez compris cette image, vous aurez alors compris l'hypothèse fondamentale sur laquelle repose mon projet de thèse, selon laquelle les neurones générés en tout premier au cours du développement (nos pierres fondatrices en granit, appelés aussi neurones pionniers) ont des rôles très importants au sein des réseaux neuronaux au cours du développement (base solide pour la suite de la construction), et aussi à l'âge adulte (soutien de la structure bâtie tout au long de sa durée de vie).

Suivant cette idée, comprendre le déroulement du chantier étape par étape devient essentiel pour comprendre les défauts du bâtiment qui peuvent survenir au cours de sa construction (comme des problèmes d'alignement de certaines parties), ou bien des années après avoir été achevé (comme des problèmes d'infiltration). De la même façon, comprendre le développement du cerveau est également essentiel pour comprendre ce qui cause des maladies comme l'autisme ou l'épilepsie que l'on lie bien souvent à des dysfonctionnements lors du développement cérébral.

Au cours de ma thèse je me suis en quelque sorte initiée à l'archéologie en sondant les sous-sols d'une structure appelée gyrus denté (GD). Pourquoi le gyrus denté ? C'est une structure organisée en couches qui possède en plus d'une population très dense de cellules excitatrices, appelées cellules granulaires (CG), une population de neurones excitateurs beaucoup plus rare qui aurait un rôle dans la fonction de barrage du réseau, les cellules granulaires semilunaires (CGS). « Rare » et « fonction dans un réseau » sont deux éléments qui nous mettent sur la piste des neurones pionniers. La description première de ces neurones a été faite par Ramon y Cajal en 1909, puis remise au goût du jour par Strowbridge et al. en 2007. Il me restait à faire le lien entre ces neurones et les neurones générés tôt de cette structure. Pour reprendre l'image de maçonnerie, j'ai donc cherché à observer les caractéristiques des pierres fondatrices en granit du GD bien après qu'elle ait été achevée. Si on retranscrit en langage biologique, cela veut dire que j'ai étudié les neurones pionniers chez des souris adultes.

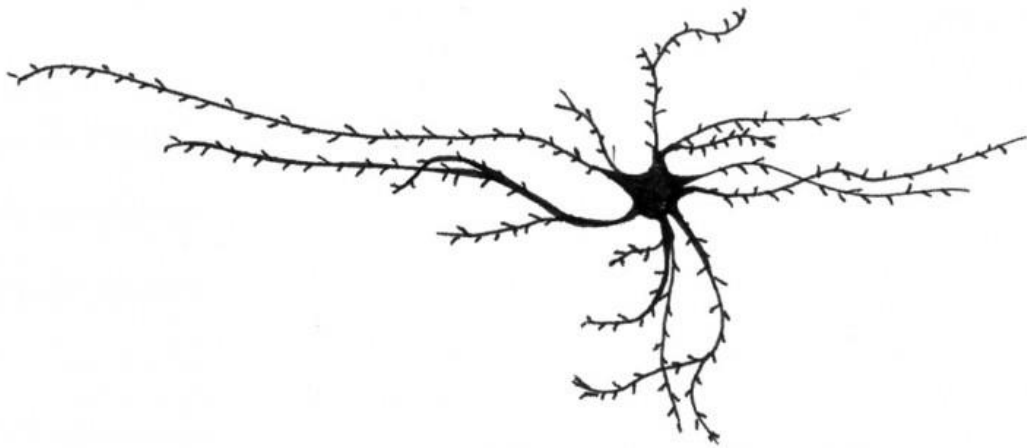
Afin d'introduire au mieux mes résultats, il nous faut dans un premier temps comprendre l'organisation cytologique du gyrus denté au sein de l'hippocampe, ainsi que son rôle fonctionnel. Par la suite, je voulais décrire la formation de cette structure au

cours du développement, ainsi que la poursuite de sa construction à l'âge adulte, étant l'une des deux seules structures du cerveau à produire de nouveaux neurones à l'âge adulte. Dans la troisième et dernière partie, il me semblait essentiel d'aborder l'origine et les caractéristiques des neurones pionniers ou générés tôt.

A l'issue de ma thèse, j'ai démontré que ces pierres fondatrices, qu'étaient les neurones pionniers du gyrus denté, observaient une organisation spatiale bien spécifique au regard des autres pierres plus récentes de l'édifice. Ensuite, malgré une morphologie différente entre les deux types de cellules étudiées (CG et CGS), on pouvait les regrouper ensemble en se basant sur leurs propriétés électrophysiologiques. Enfin, nous avons montré que ces neurones générés tôt entraient en contact avec des neurones pionniers d'une autre structure, les cellules moussues du hile.

PARTIE 1

Contexte Scientifique



Partie 1

Contexte scientifique

I. Structure étudiée : le gyrus denté (GD) de l'hippocampe

Afin d'entrer progressivement dans l'étude temporelle et morpho-physiologique des neurones glutamatergiques du gyrus denté (GD), je vais d'abord décrire la structure et la fonction de l'hippocampe et du GD. En effet, en reprenant l'idée de l'avant-propos, on ne peut concevoir un bâtiment sans savoir à quelle fin il va servir. Par exemple pour le bâtiment de l'Inmed, afin de réaliser des expériences et de les analyser ou les discuter il fallait prévoir des bureaux et des salles d'expériences, sans oublier des salles de réunions ou de conférence.

Ainsi en étudiant les propriétés des neurones pionniers du développement du GD, on ne peut se passer de connaître l'organisation structurale et cytologique de cette formation ainsi que son rôle, puisque la création des neurones et l'élaboration des réseaux au cours du développement a pour but, à terme, de réaliser la fonction pour laquelle ils ont été créés.

Dans un premier temps je décrirai l'organisation de ces deux structures avec une première approche historique puis dans un contexte connecté en prenant l'exemple du circuit tri-synaptique. Par la suite, je vais m'attacher à décrire les fonctions principales attribuées à l'hippocampe et au gyrus denté, à savoir l'encodage, la consolidation et le rappel de souvenirs. Dans une dernière partie, il est indispensable de détailler l'organisation cytologique du GD, puisqu'une partie de mon projet repose sur une étude morphométrique des neurones générés tôt.

A/ Qu'est-ce que l'hippocampe et le GD ?

« La mémoire est un livre qui ne se referme jamais. »

Laurence-Marie Coupier

1. Il était une fois l'hippocampe

Que serait l'étude du cerveau sans trois des grands prédécesseurs que sont Lewis, Golgi et Ramon y Cajal ? Munis de leur science systématique et de leur souci du détail, ils ont posé des bases solides sur lesquelles toute notre biologie moderne repose encore. Mais bien avant eux, d'autres scientifiques restés dans l'ombre s'étaient déjà lancés dans l'exploration du cerveau.

Si nous nous recentrons sur l'hippocampe, on retrouve sa première description la plus exacte en 1587 par un dénommé Arantius, chirurgien et anatomiste italien, de son vrai nom Giulio Cesare Aranzio (Aranzio, 1587). Il est le premier à avoir donné le nom d'*Hippocampus* à cette structure si particulière. Cette dénomination fut quelque peu tombée dans l'oubli pour être un temps remplacée par *Cornes de Bélier*, avant d'être finalement adoptée par le corps scientifique comme en atteste *Histoire de l'académie Royale des Sciences* de 1744 dans le chapitre *Anatomie* (Morand, 1744).

Par la suite, Golgi et Ramon y Cajal ont réalisé une description illustrée extrêmement précise et toujours valable de nos jours de cette structure (Golgi, 1883; Ramon y Cajal, 1909). Lewis, quant à lui, s'est attelé à décrire avec exactitude la structure qu'Arantius avait nommée *hippocampus* en gardant en tête les raisons de cette dénomination (Lewis, 1924).

Mais nous devons les premières approches replaçant l'hippocampe dans un contexte plus connecté et fonctionnel au scientifique James W. Papez (Papez, 1937). Selon lui, l'hippocampe ferait partie d'un circuit comprenant également l'hypothalamus et le gyrus cingulaire qui aurait pour fonction de traiter les émotions à travers les actes (l'expression de l'émotion), ainsi que le ressenti (l'expérience de l'émotion).

Ce circuit de Papez a été plus récemment précisé et renommé « système limbique » (cortex cingulaire, région parahippocampique, amygdale et hippocampe). Cet ensemble

serait effectivement impliqué dans le traitement des émotions comme l'avait noté J. Papez.

2. Qu'appelle-t-on hippocampe ?

Ce que l'on nomme couramment « hippocampe » ne correspond pas exactement à l'organisation de la « région hippocampique » conventionnellement décrite (Anderson et al., 2007; Witter and Amaral, 2004). Cette région est composée de deux structures sous-corticales : la *formation hippocampique* à proprement parler (ou archicortex) et la *région parahippocampique* (Figure 1).

La *région parahippocampique* se compose du cortex entorhinal (CE), du cortex périrhinal et postrhinal, ainsi que du présubiculum et du parasubiculum (Figure 3 ; Scharfman et al., 2000).

Quant à la *formation hippocampique*, en forme de C chez la souris, elle est constituée de trois régions aux organisations cellulaires (cytoarchitectonie) distinctes : le gyrus denté (GD) appelé aussi *fascia dentata* par son aspect dentelé, la corne d'Ammon, elle-même divisée en trois sous-régions (CA1, CA2 et CA3) et le subiculum (Ramon y Cajal, 1909). Les neurones principaux de ces structures sont glutamatergiques et sont appelés : cellules granulaires (CG) pour le GD et cellules pyramidales pour les régions CA1, CA2 et CA3.

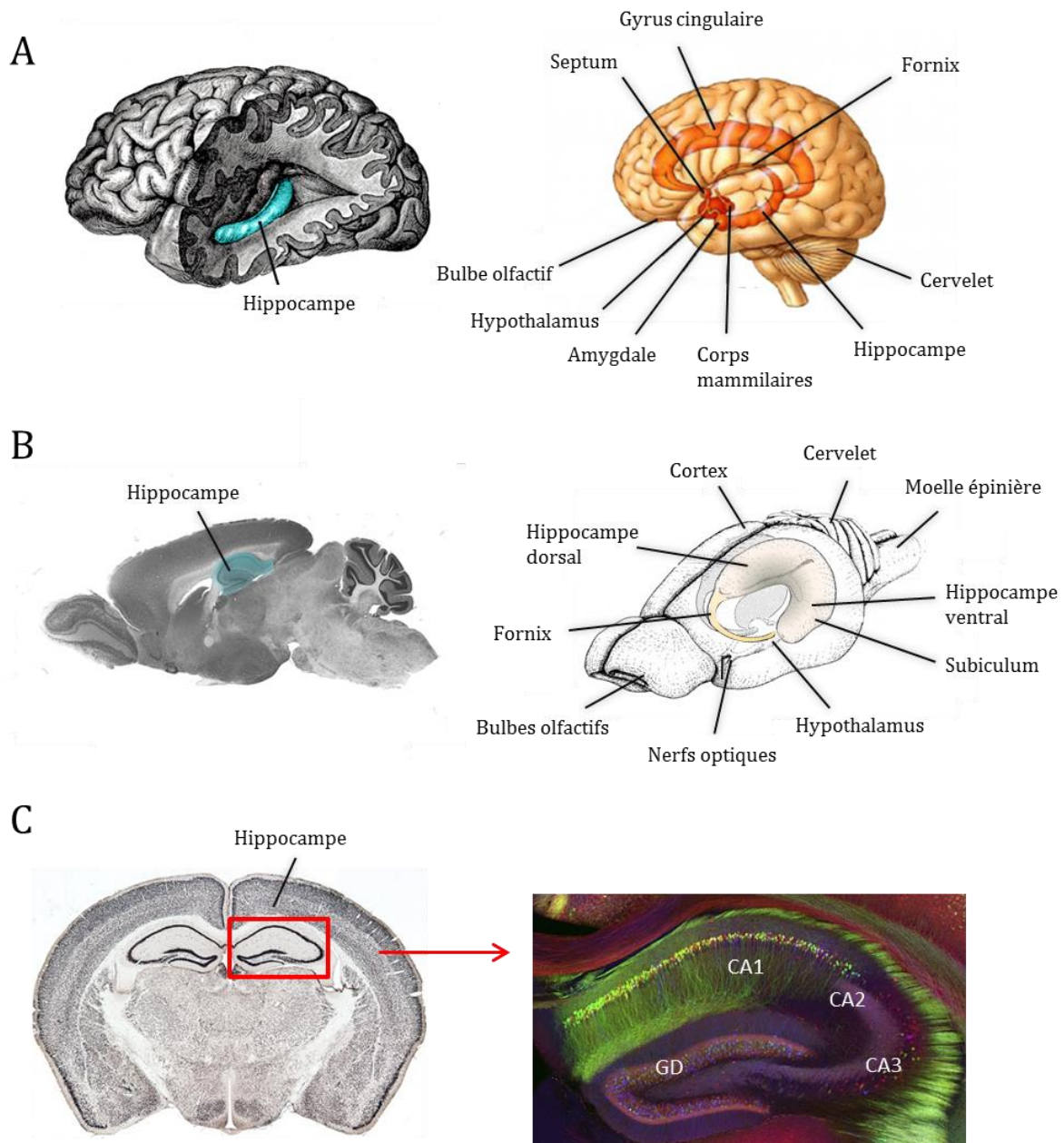


Figure 1 : Illustration de l'hippocampe chez l'homme et chez le rongeur. **A**, Chez l'homme l'hippocampe est une structure profonde et ventrale avec un fornix très important en dorsal. **B**, Localisation de l'hippocampe chez le rongeur. **C**, Coupe coronale de cerveau de souris adulte (à gauche) dont un des hippocampes est encadré en rouge. À droite (Weisman and Lichtman) nous avons l'image agrandie de l'hippocampe encadré, avec ses différentes sous-structures (GD, gyrus denté ; CA1, CA2 et CA3) dont les neurones expriment des marqueurs fluorescents différents selon leur lignée (souris brainbow).

Après avoir d'abord donné une vue d'ensemble de l'hippocampe, nous pouvons nous attacher à décrire notre structure d'intérêt, le gyrus denté.

3. Qu'appelle-t-on gyrus denté ?

Appelée « porte d'entrée », le GD constitue le premier relais du circuit tri-synaptique. Il comprend trois sous-parties comportant chacune des types neuronaux particuliers. La partie la plus à l'externe, très pauvre en soma et très dense en fibres (axones et dendrites) est appelée *stratum moleculare* ou couche moléculaire. Cette partie, est elle-même divisée en trois : les couches externes, médianes et internes. Vient ensuite le *stratum granulosum* ou couche granulaire qui est la couche la plus dense en corps cellulaires de l'hippocampe et qui contient les neurones principaux du GD, les cellules granulaires. Enfin nous avons le hile, appelé aussi couche polymorphique car il contient de nombreux types cellulaires différents, comme les cellules moussues (CM) et des interneurones (Figure 2).

On peut également séparer le gyrus denté en lame suprapyramidale et lame infrapyramidale. La première se situe au-dessus de CA3 et est séparée de CA1 par la fissure hippocampique, la deuxième est située en dessous de CA3 ; et ces deux lames se rejoignent pour former la partie que l'on nomme la crête (Figure 2).

Nous reviendrons par la suite plus en détail sur la description des neurones du GD. Cependant il m'était nécessaire de les présenter afin de parler des connexions intrinsèques et extrinsèques des différentes structures de la formation hippocampique.

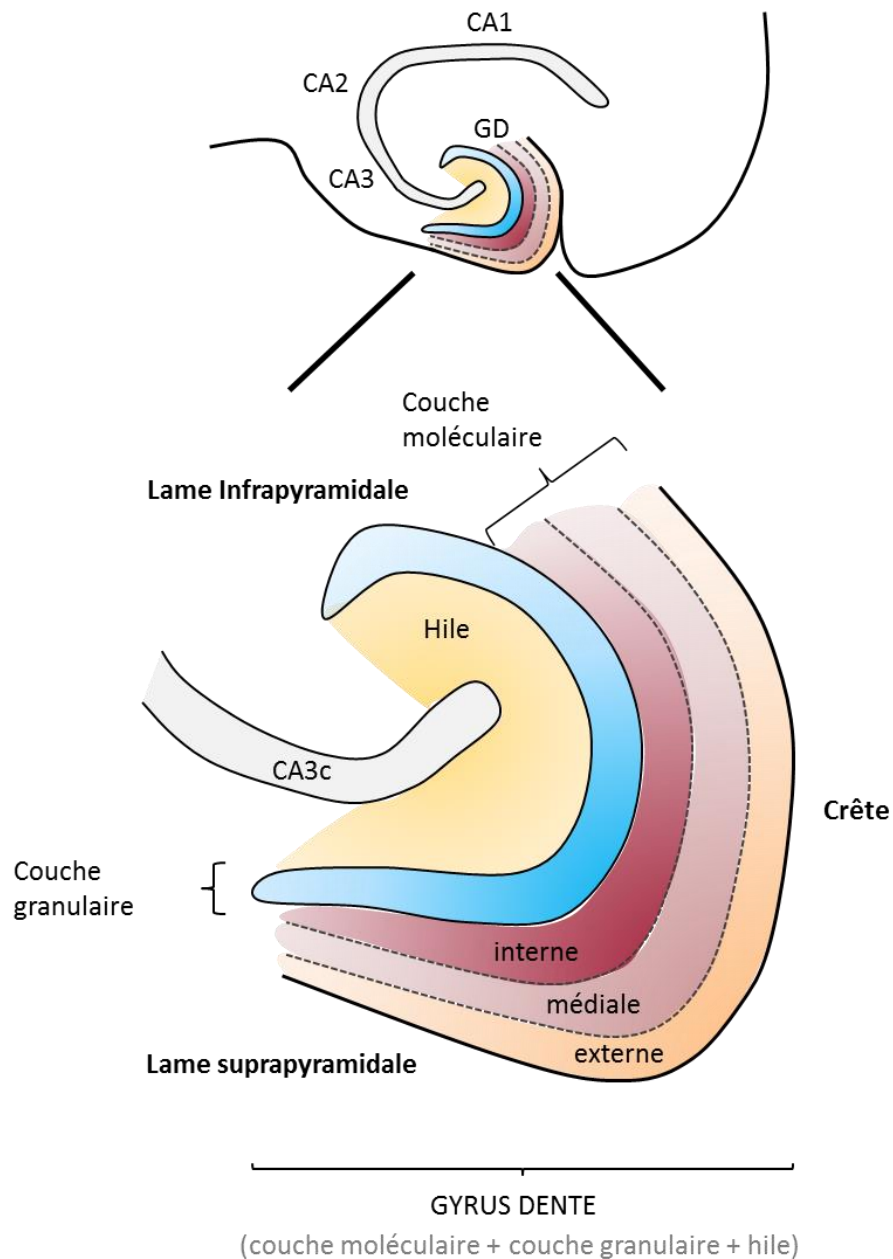


Figure 2 : Schéma des différentes sous-parties du gyrus denté. De droite à gauche. La structure la plus externe en bordure de la fissure hippocampique est la couche moléculaire. Elle est divisée en trois sous-parties : le tiers externe (en orange), le tiers médian (en rose) et le tiers interne (en rouge), caractérisées par des afférences spécifiques. La couche granulaire en bleu contient les cellules granulaires, neurones principaux du gyrus denté. Le hile (en jaune) fait la jonction entre la couche granulaire (en bleu) et CA3 (en gris). La lame infrapyramidale est la partie du GD la plus proches de CA1 tandis que la lame suprapyramidale est la portion de couche granulaire la plus éloignée de CA1 et la crête est la zone où les deux lames se rejoignent.

4. Le circuit tri-synaptique : le fil rouge de l'hippocampe

Décrit et schématisé par de nombreux scientifiques, le circuit ou boucle tri-synaptique met en jeu les cellules glutamatergiques principales de l'hippocampe qui sont les cellules granulaires du gyrus denté et les cellules pyramidales de CA3 et CA1 (Shepherd and Harris, 1998).

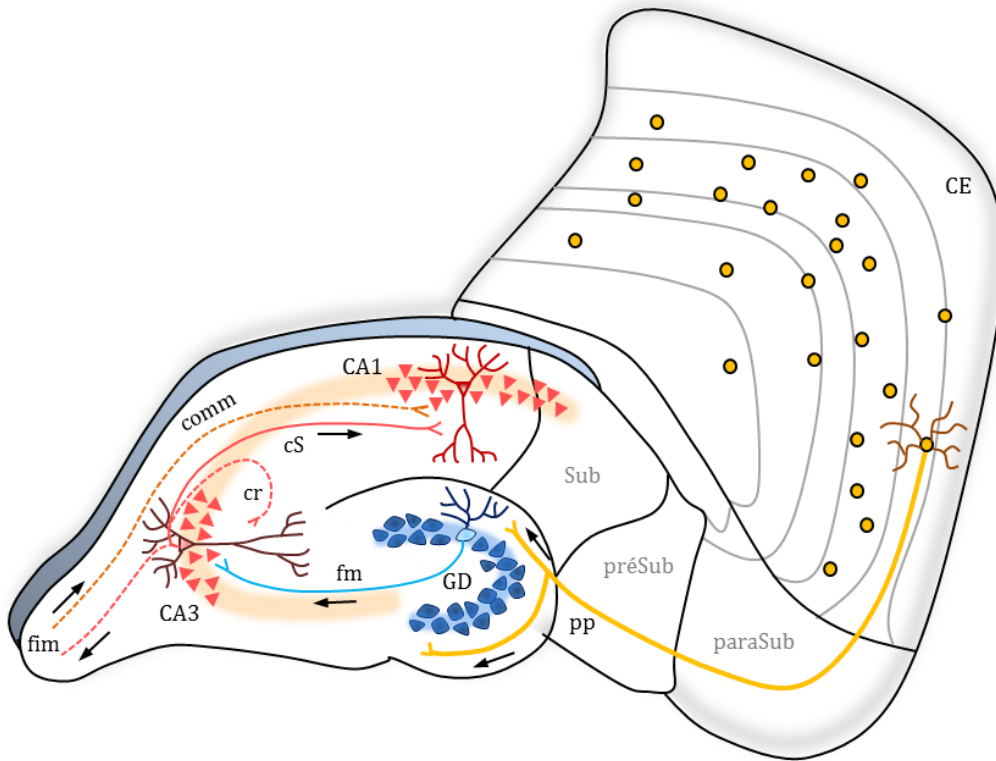


Figure 3 : Représentation classique du circuit tri-synaptique de l'hippocampe. Les cellules du CE sont représentées par des ronds jaunes et projettent vers le GD. La cellule avec le soma bleu clair est une cellule granulaire de la couche granulaire qui projette vers CA3. En orange pâle, nous avons la couche pyramidale de CA3 et CA1, et les cellules représentées par leur soma en rouge sont des cellules pyramidales. Les connexions du circuit tri-synaptique sont représentées par des traits pleins (jaune, bleu et rouge). Les connexions récurrentes, celles provenant du côté contralatéral et celles en direction de la fimbria sont représentées en pointillés. GD, gyrus denté ; pp, voie perforante ; fm, fibres moussues ; fim, fimbria ; cr, connexion récurrente ; cS, collatérale de Schaffer ; comm, commisure ; Sub, subiculum ; préSub et paraSub, présubiculum et parasubiculum. (D'après Rees et al. 2016; Yassa, 2011).

Dans ce circuit, la voie perforante arrivant du cortex entorhinal (CE) réalise un contact synaptique sur les cellules granulaires qui transmettent le signal aux cellules pyramidales de CA3 via les fibres moussues (Claiborne et al., 1986). Ces cellules font un dernier relai synaptique via les collatérales de Schaffer sur les cellules pyramidales de CA1 avant de retourner vers le cortex entorhinal (Figure 3 ; Cenquizca and Swanson, 2007; Yassa, 2011).

Même s'il s'agit là du circuit « fil rouge » de l'hippocampe, la diversité des connexions existant dans cette structure ne se limite pas à ce circuit.

5. Les autres circuits de l'hippocampe

A partir de cette connectivité quasi-linéaire, nous devons y ajouter les afférences provenant des cellules pyramidales de CA1 du côté contra-latéral et transitant par la commissure. Puis les cellules pyramidales de CA3 projettent vers des structures externes à l'hippocampe via la fimbria et rétro-projettent vers le gyrus denté sur les cellules moussues du hile (Myers and Scharfman, 2011). Un autre niveau de complexité peut être ajouté avec la boucle interne de fibres récurrentes des cellules pyramidales de CA3 (Figures 3 et 4), sans oublier les afférences directes du CE sur les cellules pyramidales de CA3 et de CA1 (Witter, 2007).

Au sein même du GD, les cellules moussues contactent les cellules granulaires du côté ipsi et contra-latéral et également sur toute la profondeur antéro-postérieure du gyrus denté.

Enfin, afin de décrire encore plus précisément le réseau de l'hippocampe, nous devons y ajouter tous les interneurons GABAergiques qui modulent l'activité des neurones du circuit tri-synaptique. Or parmi ces neurones GABAergiques, certains à projections longues sortent de l'hippocampe en empruntant la fimbria pour connecter des neurones du septum (Jinno et al., 2007). D'autres jouent un rôle crucial dans la boucle inhibitrice du gyrus denté en étant contactés directement par les cellules granulaires ou indirectement par les cellules moussues du hile.

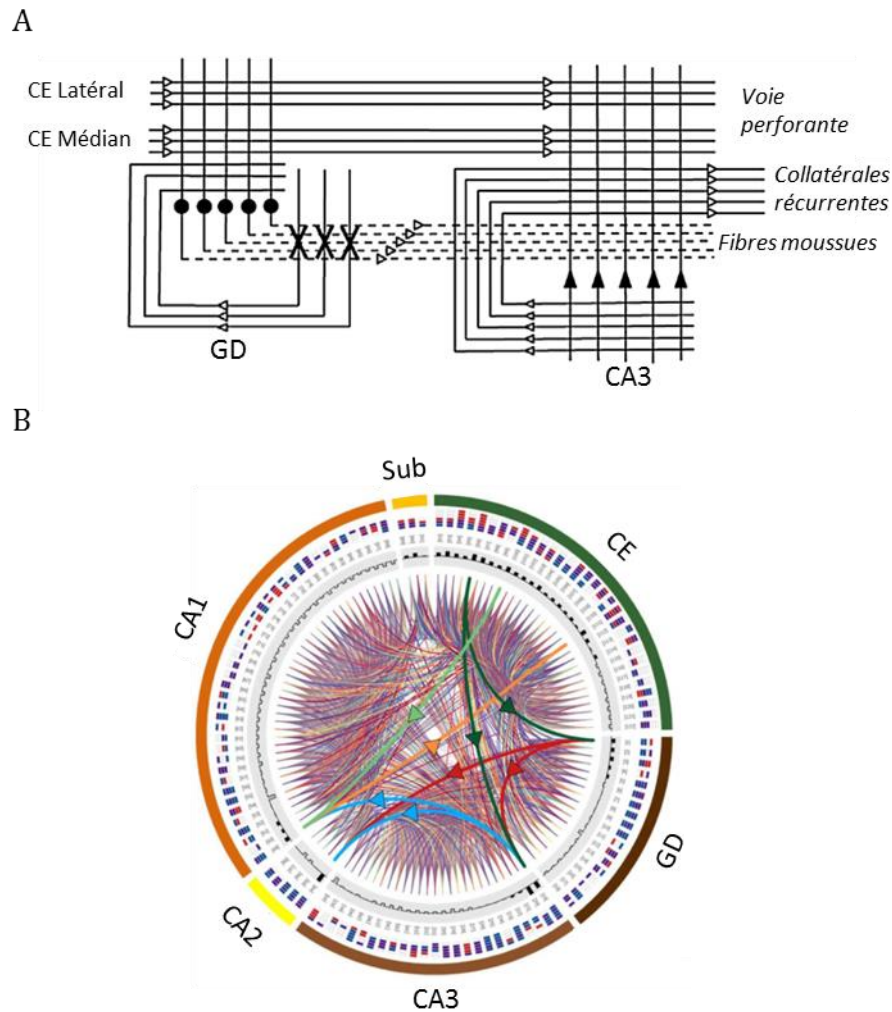


Figure 4 : Deux autres façons plus complexes de représenter les connexions du circuit tri-synaptique. A, Diagramme schématique montrant les connexions entre le GD et CA3 (CA1 non représenté) (D'après Lee and Jung, 2017). **B,** Diagramme du connectome entre les différents acteurs du circuit tri-synaptique (CE, GD, CA3, CA2, CA1 et Sub). On retrouve bien la voie perforante (flèche verte foncée), les fibres moussues (flèches rouges), les collatérales de Schaffer (flèches bleues) puis le retour au cortex entorhinal (flèche orange). CE, cortex entorhinal ; Sub, subiculum ; DG, gyrus denté. (D'après Rees et al., 2016).

B/ Quelles fonctions pour l'hippocampe et le GD ?

« La mémoire est la sentinelle de l'esprit. »

William Shakespeare, Macbeth

1. La mémoire dans la peau

1.1. Le cas Henri Molaison : la fonction mnésique chez l'homme

De nos jours quand on parle de mémoire, nous pensons immédiatement à l'hippocampe. Mais avant les années 1950 le rôle de l'hippocampe dans les phénomènes mnésiques était peu inconnu.

Il faut remonter jusqu'en 1953 pour que l'implication de l'hippocampe dans la mémoire soit mise en évidence. Cette année-là, un chirurgien américain procède à la première lésion bilatérale radicale de cette structure sur un patient afin de traiter l'épilepsie sévère dont il était atteint. Toutefois, si l'épilepsie d'Henry Molaison (H.M.) a presque complètement disparu suite à l'intervention, l'opération a produit des séquelles invalidantes et irréversibles qui ont affecté la vie quotidienne du patient jusqu'à sa mort à l'âge de 82 ans en 2008.

L'étude des cas cliniques comme le cas H.M. a permis de faire des progrès considérables dans la connaissance de l'organisation et des bases neurales de la mémoire. Le docteur William Beecher Scoville qui avait opéré H.M. parle alors de graves pertes de la mémoire récente ainsi que de sévères difficultés à se rappeler chaque jour des éléments pourtant appris la veille ou même quelques heures auparavant (Scoville and Milner, 1957). Il fait allusion d'une part à l'*amnésie rétrograde* partielle où Henry n'a plus accès à ses récents souvenirs (seuls les plus anciens de sa jeunesse restent intacts), d'autre part à l'*amnésie antérograde* qui empêche le patient de former de nouveaux souvenirs. Il poursuit en déclarant que la personnalité d'Henry n'avait pas été altérée, que son langage était toujours très bon, que son QI n'avait pas non plus changé et enfin qu'il était toujours capable d'acquérir de nouvelles compétences motrices (mémoire procédurale, voir chapitre 1.2 page 31).

Ainsi, l'étude des syndromes amnésiques chez les patients comme H.M., a conduit à définir deux types de mémoires s'articulant autour du traumatisme à l'origine de l'amnésie, une mémoire rétrograde, mémoire déjà constituée, récente ou ancienne et une mémoire antérograde qui est la capacité à former de nouveaux souvenirs. H.M. avait des déficits de mémoire antérograde et un déficit de mémoire rétrograde avec un gradient temporel, les souvenirs les plus anciens étant préservés mais pas les souvenirs récents. Le déficit de mémoire antérograde ne touchait que la mémoire épisodique, la mémoire procédurale restant fonctionnelle.

Pendant des années le chirurgien en charge de l'opération a fait part de son regret pour les conséquences tragiques de cette intervention. Ainsi, afin de ne jamais oublier la contribution d'Henry Molaison à la science et le danger de cette opération, trois médecins de Louisiane aux États-Unis ont publié un rapport complet sur l'intervention qu'il a subi (Dossani et al., 2015).

L'opération d'Henry Molaison reste la plus célèbre de l'histoire des neurosciences car ses conséquences ont permis de mieux comprendre l'implication de l'hippocampe dans la mémoire.

1.2 Une pluralité de mémoires

La formation de la mémoire et son utilisation dépendent des processus d'acquisition, de stockage et de rappel. Ces processus s'inscrivent dans une dynamique temporelle. Fondamentalement, on distingue une mémoire à *long-terme* et une mémoire à *court-terme*. La mémoire à long-terme, correspondant à une capacité de stockage illimitée pour une durée illimitée, a fait l'objet d'une taxonomie par des auteurs comme Tulving identifiant différents types de mémoire par : leur contenu, leurs règles de fonctionnement et leurs bases neuronales. La mémoire à court-terme contenant un nombre limité d'informations pour une durée limitée a été au cœur du modèle de mémoire de travail élaboré par Baddeley (Baddeley, 1981). Comme je l'évoquerai brièvement par la suite, la mémoire à court terme peut se transformer en mémoire à long-terme par le processus de consolidation.

Il n'existe pas une seule mémoire mais de multiples mémoires contenant des informations différentes, aux propriétés différentes et impliquant des structures

nerveuses différentes. Tulving (1995) a proposé un modèle des différents types de mémoire à *long-terme* qui reste toujours très influent. Il fait une distinction fondamentale entre la mémoire déclarative et non-déclarative (Figure 5).

La mémoire *déclarative* est celle que l'on peut exprimer et rappeler verbalement. Elle comporte la mémoire épisodique, c'est-à-dire, toutes les informations qui caractérisent un épisode de notre vie et qui font qu'il est unique, ainsi que la mémoire sémantique traitant des informations abstraites comme les mots, les idées ou encore les concepts (le feu brûle et l'eau mouille). Ces mémoires impliquent l'hippocampe.

La mémoire *non-déclarative* a été nommée ainsi car ce sont des souvenirs inscrits dans votre corps et qui ne peuvent donc être formulés ou déclarés. Elle ne dépend pas de l'hippocampe. Elle se décompose en deux sous-parties : la mémoire procédurale et le conditionnement émotionnel. La première est liée à l'apprentissage d'une habileté motrice, comme lorsque l'on apprend à faire du vélo ou à jongler, et implique les ganglions de la base dont le striatum. Quant à la deuxième, il s'agit d'une mémoire associative qui met en jeu des réactions émotionnelles. Un exemple de ce type de mémoire est mis en jeu dans la peur conditionnée, un modèle d'apprentissage très utilisé. L'animal, placé dans une cage reçoit un stimulus conditionnel, par exemple un son qui précède un stimulus inconditionnel, un choc électrique (modéré). Après plusieurs expositions à l'appariement son-choc l'animal apprend l'association de ces stimuli de telle manière qu'il présente une réaction de "freezing" (l'animal reste figé) à la simple émission du son. Cette réaction émotionnelle de freezing qui traduit la peur de l'animal à recevoir le choc électrique montre qu'il a associé les 2 stimuli. Ce type de mémoire implique notamment l'amygdale.

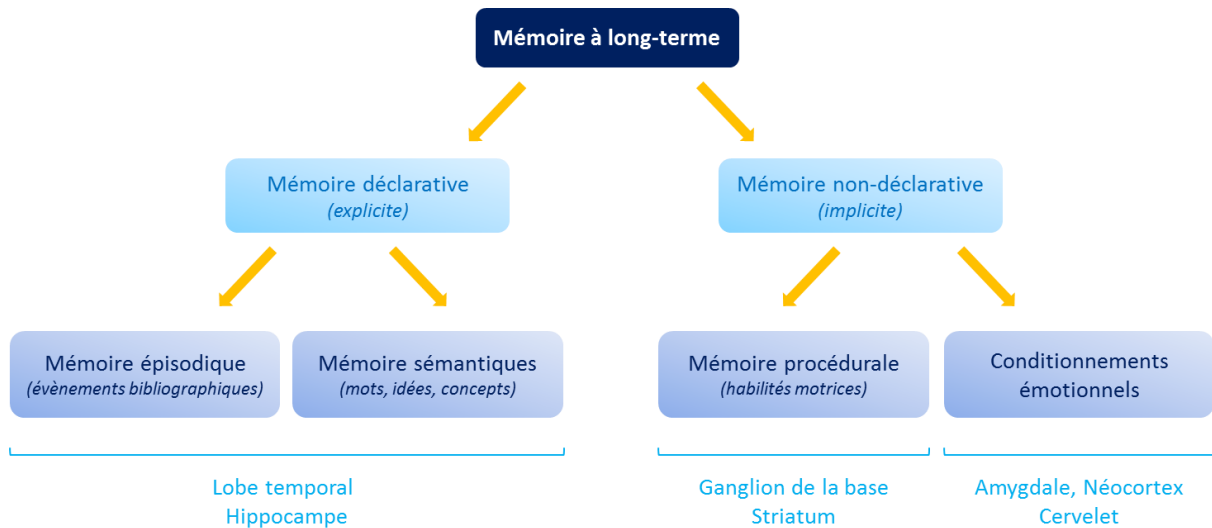


Figure 5 : Schéma d'organisation de la mémoire à long-terme. Les régions cérébrales impliquées dans ces mémoires sont indiquées en bleu clair. Ainsi, la mémoire déclarative est prise en charge par le lobe temporal (hippocampe et les structures associées) tandis qu'au sein de la mémoire non-déclarative, la mémoire procédurale est traitée par les ganglions de la base dont le striatum, et le conditionnement émotionnel serait géré par un ensemble de régions comprenant l'amygdale, le cervelet et le néocortex. (D'après Tulving, 1995).

La mémoire à *court-terme* permet de conserver des souvenirs sur un temps plus court, comme lorsque vous vous souvenez ce que vous avez mangé la semaine passée, chose que vous aurez totalement oublié d'ici deux semaines. Au sein de cette mémoire à stockage limité dans le temps il faut également prendre en compte la mémoire de travail (Baddeley, 1981). Cette mémoire est capitale pour réaliser vos tâches quotidiennes, mais elle est très rapidement effacée car elle n'a plus d'utilité une fois qu'une tâche a été réalisée. Pour donner un exemple, lorsque vous faites de la solution pour vos enregistrements, si vous devez aller chercher de l'eau distillée dans une autre salle vous allez poser la bouteille quelque part en attendant. Quand vous revenez, vous savez exactement où vous l'avez mise. Par contre une fois cette étape passée, cette information n'a plus de raison d'être et ne sera pas imprimée durablement.

2. Les mécanismes de la mémorisation d'un épisode

2.1 La mémoire épisodique

Le GD fait partie de la formation hippocampique, et son rôle est nécessairement lié à celui de l'hippocampe. Il est largement accepté que l'hippocampe est à l'origine de la formation de la mémoire épisodique. Les événements constituant la mémoire épisodique sont caractérisés par 3 composantes, ce qui les identifie de manière unique : une composante temporelle (appelée "When" dans la littérature: le "quand"), une composante spatiale ("where": le "où") et une composante d'identification ("what": le "quoi"). En anglais on dit que l'hippocampe établit les 3W « What, Where, When » d'un événement (Clayton and Dickinson, 1998; Eichenbaum and Fortin, 2005).

Ces 3 composantes ont d'abord été considérées chez l'Homme et des travaux ont montré qu'il y a des aspects communs entre la mémoire épisodique chez l'homme et celle chez l'animal. Le « quoi » fait allusion à l'aspect qualitatif des objets à disposition (couleur, forme, quantité) en temps qu'indices caractérisant une situation. Le « où » caractérise à la fois la position de l'individu dans un espace et sa position relative aux différents objets présents. Des travaux classiques réalisés chez l'animal indiquent que la composante spatiale de la mémoire épisodique découle de l'activité des cellules de lieu de CA1 et CA3 de l'hippocampe ainsi que d'autres catégories de neurones dont l'activité est modulée par la position spatiale ou l'orientation de l'animal. Parmi les principales catégories, il y a les cellules de direction de la tête (head direction cells), les cellules de bordure (border cells) et les cellules de vitesse (speed cells), ... etc, (voir *chapitre 2.3* page 40).

L'hippocampe n'est cependant pas le seul acteur de la mémorisation. En effet, il est étroitement connecté avec les régions corticales et les théories actuelles attribuent à l'hippocampe un rôle dans l'encodage et le stockage de l'information à court-terme et au cortex un rôle dans le stockage à long-terme (Figure 6). Le passage du stockage à court terme au stockage à long-terme s'effectue par un processus de consolidation.

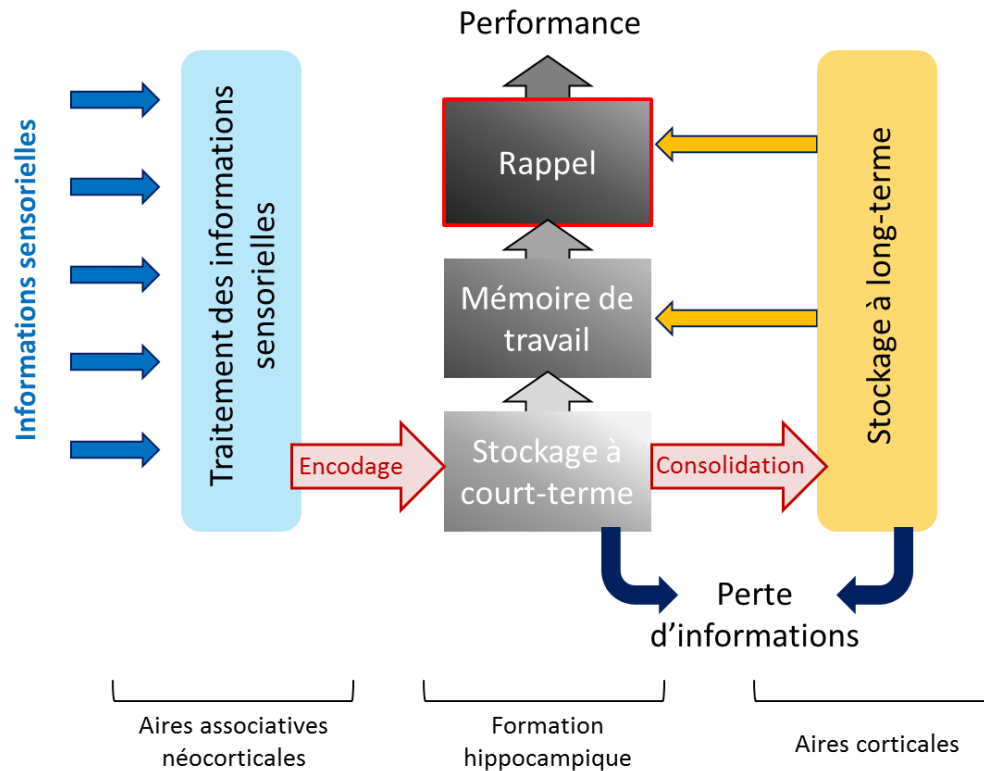


Figure 6 : Représentation des étapes amenant à mémoriser et à restituer des souvenirs.

Arrivée des informations sensorielles traitées par les aires associatives néocorticales et qui sont ensuite encodées pour être stockées à court-terme par l'hippocampe. Puis par consolidation ces informations basculent dans la mémoire à long-terme pour être restituées lors des rappels pour produire une performance. La notion d'encodage est un processus cognitif développé par la suite.

2.2 Echanges de bons procédés entre le cortex et l'hippocampe

a) Le cortex envoie des informations à l'hippocampe

La région parahippocampique reçoit des informations des différentes modalités sensorielles en provenance des régions néocorticales d'association. Les informations sensorielles sont d'abord recueillies par les capteurs spécifiques des différentes modalités sensorielles et traitées par les régions des cortex sensoriels primaires (ex : cortex visuel, auditif, etc) puis des cortex d'association qui combinent ces différentes modalités (Figure 7). Par la suite, le cortex entorhinal (parahippocampe) transmet ces informations à l'hippocampe à proprement parlé avec qui il est étroitement connecté. C'est ce qu'on appelle la boucle cortico-hippocampique (Eichenbaum, 2000). Cet afflux

arrive en tout premier lieu sur le gyrus denté, via la voie perforante, avant d'atteindre les différentes sous-régions de la corne d'Amon. C'est le circuit tri-synaptique, que nous avons décrit en amont, qui prend le relais. L'hippocampe permettrait donc le stockage à court-terme de toutes ces informations entrantes.

On replace alors le gyrus denté dans ce contexte à l'interface entre deux types structures et circuiteries radicalement différentes.

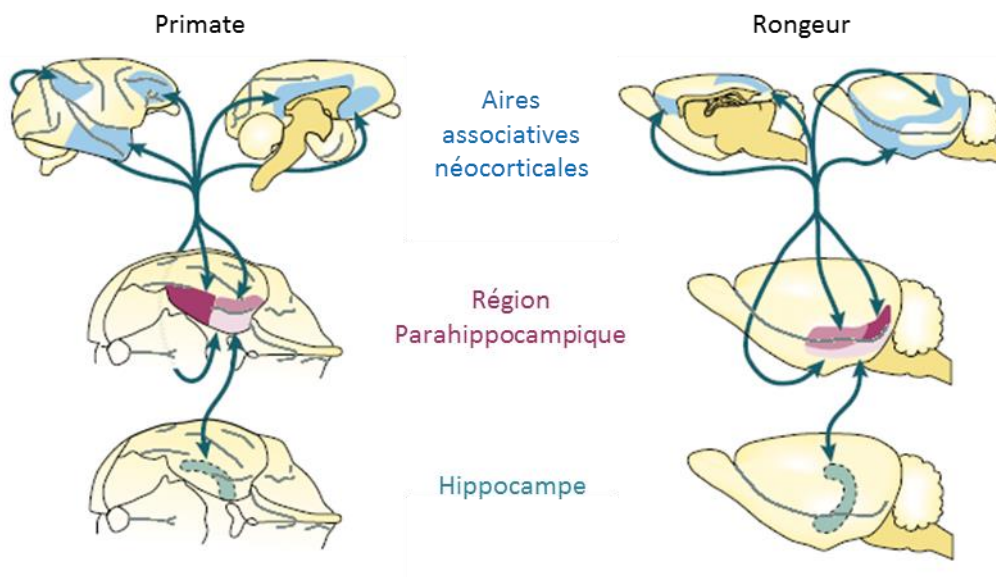


Figure 7 : Anatomie du système cortico-hippocampique des processus mnésiques.

Associations des informations sensorielles, somatosensorielles et vestibulaires dans les aires associatives néocorticales (en bleu). Transmission vers la région parahippocampique comprenant le cortex entorhinal (en rose). Puis, transmission vers l'hippocampe via le gyrus denté (en vert) pour enfin retourner au cortex entorhinal. (D'après Eichenbaum, 2000).

b) L'hippocampe envoie des informations au cortex : consolidation mnésique

Selon la théorie classique de la mémorisation, l'hippocampe serait un support de stockage temporaire pour la mémoire à court-terme (Frankland and Bontempi, 2005, 2006). La mémoire à long-terme résulterait d'un processus de consolidation de la mémoire à court terme et serait stockée dans le cortex de façon indépendante de l'hippocampe. Ce processus se ferait par plusieurs étapes (Figure 8). Suite à l'encodage initial des informations par l'hippocampe, ce dernier activerait une assemblée neuronale particulière dans les modules corticaux. Au fil du temps, les neurones corticaux activés

reçoivent de moins en moins de signaux de l'hippocampe, jusqu'à ce que l'assemblée corticale devienne complètement indépendante de l'hippocampe.

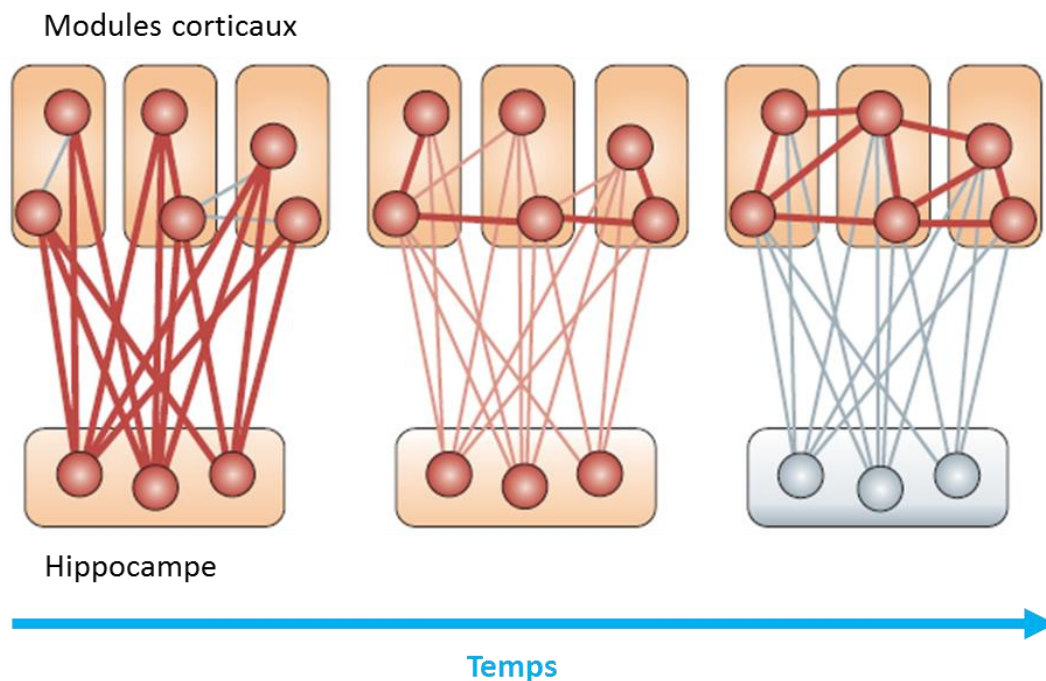


Figure 8 : Modèle classique de la consolidation. L'hippocampe active des réseaux neuronaux spécifiques à chaque épisode dans les modules corticaux. Ces traces mnésiques sont consolidées au cours du temps au sein du cortex, devenant petit à petit indépendant de l'hippocampe, jusqu'à ce que cette trace n'ait plus besoin des afférences provenant de l'hippocampe. (D'après Frankland and Bontempi, 2005).

Cela dit, il existe une théorie différente prônant l'existence d'une interdépendance dans la consolidation des souvenirs entre l'hippocampe et les régions corticales (Moscovitch and Nadel, 1999). Ainsi, les modules corticaux stockeraient bien les informations mais il y aurait toujours une interaction avec l'hippocampe lors du rappel, c'est ce qu'ils appellent la théorie des *traces multiples*.

2.3 La navigation spatiale : encoder le « Où » d'un épisode

Le Prix Nobel de médecine 2014 partagé entre l'anglais O'Keefe et les norvégiens Edward et May-Britt Moser, nous rappelle à quel point les éléments d'ordre spatial revêtent une grande importance dans la caractérisation et la mémorisation d'un épisode.

On ne peut donc se passer de la notion d'orientation spatiale dans la compréhension de la fonction hippocampique.

Les travaux de John O'Keefe révèlent notamment l'existence de neurones dans CA1 dont la particularité est de s'activer lorsque l'animal se situe à un endroit particulier dans l'espace d'une arène (O'Keefe and Dostrovsky, 1971). Cette cartographie réalisée par les « cellules de lieu » a permis d'élaborer une théorie toujours en vigueur en 2017 qui concède à l'hippocampe la faculté d'établir des cartes cognitives de l'espace (O'Keefe et Nadel, 1978 ; Burgess et al., 2002).

Pour venir compléter ce décodage spatial, d'autres cellules sensibles à la position dans l'espace de l'animal ont été découvertes dans les structures parahippocampiques, comme les « cellules de grilles » dont le champ d'activation forme un quadrillage de l'environnement exploré (Boccaro et al., 2010; Hafting et al., 2005; Sargolini et al., 2006), les « cellules de direction de la tête » qui s'active lorsque la tête pointe dans une direction particulière (Hafting et al., 2005; Taube et al., 1990a, 1990b), les « cellules de bordure » dont le champ d'activation se trouve en au niveau de la bordure d'un environnement (Zhang et al., 2014), ainsi que les « cellules de vitesse » qui codent pour la vitesse de l'animal (Kropff et al., 2015).

Lorsque l'on rassemble les propriétés de toutes ces cellules on peut alors parler de GPS interne du cerveau. Ce GPS nous permettrait de nous orienter précisément dans une pièce ou encore de retrouver notre chemin dans une ville (pour revue : Poucet et al., 2015). Il nous permettrait d'ancrer les épisodes dans l'espace.

2.4 Encodage des souvenirs : implication du GD

L'élaboration des représentations et leur réactivation sont contrôlées par deux processus dont les termes ont été empruntés aux neurosciences computationnelles : la « pattern séparation » (séparation des représentations) et la « pattern completion » (recomposition des représentations). Sur le plan neuronal, les représentations correspondent à des ensembles de neurones qui sont activés au cours d'un évènement ou d'une situation particulière. Par exemple, les cellules de lieu de l'hippocampe qui sont activées quand l'animal se trouve dans un environnement particulier constituent une représentation de cet environnement. Si un changement dans l'environnement est

décelé par l'animal, une nouvelle représentation est élaborée qui correspond à un nouvel ensemble de neurones activés (Leutgeb et al., 2007). Deux représentations peuvent impliquer des neurones communs mais chaque représentation correspond à un ensemble spécifique.

a) Définition de la séparation des représentations

Dans la revue publiée en 2004 dans *Neuron*, Guzowski et al., (2004) définissent ce processus comme étant la capacité à créer des représentations distinctes (correspondant à des ensembles de neurones de l'hippocampe activés conjointement) de deux épisodes très semblables, dans le but de diminuer le taux d'erreur lors du rappel. Pour illustrer ce processus imaginez que vous entrez dans une pièce dans laquelle vous n'êtes jamais allés. Vous allez alors mémoriser les différents éléments qui s'y trouvent comme la position des fenêtres, la couleur des murs, la disposition des objets. Et tout cela sans que vous n'y prêtiez attention. C'est alors que l'on vous mène dans une deuxième pièce très similaire à la première où seuls quelques éléments ont été modifiés. Quand on est re-exposé à l'une ou l'autre de ces deux pièces, il faut répondre à deux questions : la disposition des différents objets était-elle similaire entre les deux pièces ? Suis-je dans la même pièce ou dans une pièce différente ? Le processus de séparation de représentations permet de mettre en jeu des représentations très différentes de ces deux situations très semblables afin de réduire l'ambiguïté et de distinguer les deux situations sur le plan neuronal.

b) Séparation des représentations : un rôle du GD

L'un des premiers à avoir étudié le rôle du gyrus denté, est David Marr qui en 1971 (Marr, 1971) propose que cette structure joue un rôle dans l'augmentation « du clairsemage des représentations » fournies par le cortex entorhinal et à destination de CA3 (Willshaw et al., 2015). Plus tard McNaughton (1989) propose l'idée d'une séparation des représentations ("pattern separation") basée sur les modalités de la projection des neurones du cortex entorhinal sur les cellules granulaires (McNaughton et al., 1989). C'est-à-dire que le gyrus denté agirait comme un filtre qui réduirait la superposition des schémas de codage grâce à une population neuronale beaucoup plus dense que celle du cortex entorhinal (Figure 9).

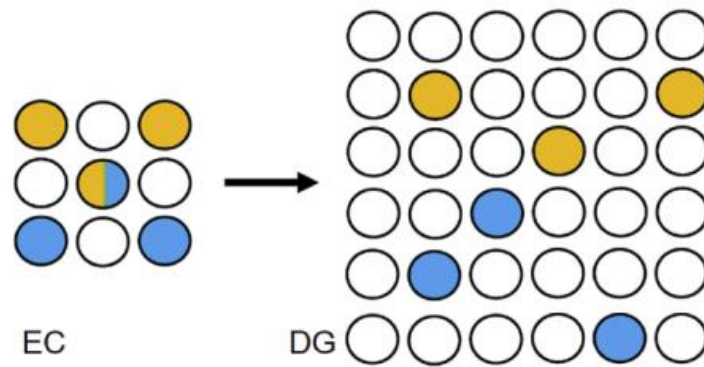


Figure 9 : Illustration de la séparation des représentations opérée par le gyrus denté sur les afférences du cortex entorhinal. Deux représentations qui se superposent dans le réseau du cortex entorhinal (bleu et jaune) deviennent disjointes au sein du réseau du gyrus denté. (D'après Lee and Jung 2017).

Ce sont les cellules principales du cortex entorhinal (CE) qui transmettraient les informations sensorielles collectées en amont par les cortex sensoriel et somatosensoriel jusqu'au GD. Ces informations se heurtent alors au barrage inhibiteur du GD. Cette filtration des informations entrantes serait produite par la faible excitabilité des cellules granulaires (CG) du GD et leur très grand nombre (augmentation d'un facteur 10 entre le CE et le GD). Il en résulte alors qu'une très faible proportion de cellules s'active pour un contexte donné. C'est ce qu'on appelle le « sparse coding » (codage clairsemé), (Chavlis et al., 2017). Cette propriété est à la base du processus de séparation des représentations. Ainsi, en créant des représentations uniques et non-superposées entre différents événements, on produirait la discrimination de ces événements (pour revue : Aimone et al., 2011).

En appliquant ces observations sur l'exemple précédent, on aurait alors un petit ensemble de neurones activés dans le GD lors de l'exploration de la pièce 1, et un autre petit ensemble de neurones activés lors de l'exploration de la pièce 2. En ajoutant qu'aucun des neurones activés pour la pièce 1 ne l'est pour la pièce 2, et inversement. D'un point de vu comportemental, c'est comme si on se disait : « ces pièces sont vraiment très semblables mais je peux affirmer qu'il s'agit bien de deux pièces différentes ».

A l'aide de la réalisation de modèles computationnels de l'hippocampe, de nombreux autres scientifiques ont adopté cette théorie de la séparation des représentations par le gyrus denté (Myers and Scharfman, 2009, 2011; O'Reilly and McClelland, 1994; Rolls et al., 1998).

En 2001 apparaît la première étude lésionnelle sur animal appuyant cette théorie (Gilbert et al., 2001). Les auteurs ont montré que la lésion ciblée du gyrus denté chez des rats affectait drastiquement la discrimination de deux emplacements très proches dans une arène sans affecter la différenciation des emplacements plus éloignés.

Suite à ces travaux, deux autres études sont parues en 2007. La première étude par McHugh et al., montre que lorsque les cellules granulaires sont spécifiquement déficientes pour le récepteur au glutamate de type N-méthyl-D-aspartate (NMDA), ces cellules n'exprimaient plus de réponse sélective de peur dans des contextes similaires (McHugh et al., 2007). Quant à la deuxième étude publiée dans *Science* (Leutgeb et al., 2007; Leutgeb and Moser, 2007), les auteurs montrent que si on modifie très progressivement la forme d'une arène pour la faire passer d'une forme ronde à une forme carrée on obtient que l'activité des cellules granulaires est plus facilement modifiée que l'activité des cellules pyramidales de CA3, donc qu'elles seraient plus sensibles aux changements minimalistes d'environnements.

Tous ces résultats montrent la dualité du mécanisme sous-tendant le processus de séparation des représentations qui s'initie en créant une orthogonalisation du signal provenant du CE puis qui se traduit par le recrutement d'une population indépendante au sein du réseau de CA3 lorsque l'environnement le nécessite. De nombreux autres résultats abondant dans ce sens furent publiés dans les années suivantes et la question du rôle des neurones générés dans le GD dans ce processus est très récente mais fondamentale car le gyrus denté est la deuxième source de neurogénèse du cerveau adulte. Mais nous aborderont plus en détails cette question par la suite.

L'hypothèse du rôle du GD dans la séparation des représentations n'est cependant pas partagée par tous les auteurs. Lee et Jung (2017) proposent que le GD aurait plutôt un rôle dans les processus de liage (« binding ») de différents types d'informations.

Les auteurs mettent en avant le fait que les oiseaux, pourtant champions dans l'orientation spatiale et la discrimination d'environnements, n'auraient pas de structure équivalente au gyrus denté. Ils énoncent aussi le fait qu'il a été montré que les représentations superposées dans le cortex entorhinal étaient décorréliées par le gyrus denté mais qu'elles se retrouvaient de nouveau superposées dans CA3. Ce qui ne leur paraît pas aller dans le sens de la théorie de la séparation des schémas.

Ils parlent alors de « binding pattern », autrement dit de schéma d'attachement pour offrir une alternative à la théorie classique. Cette idée viendrait de l'observation faite sur le type d'informations collectées et transmises par le cortex entorhinal où sa partie médiane (MEC) traiterait les informations spatiales et sa partie latérale (LEC) les informations non-spatiales (Deshmukh and Knierim, 2011). Ces deux signaux convergent dans le gyrus denté, ce qui suggère alors que son rôle consisterait à les « lier » pour en ressortir un signal à haute valeur informative pour les cellules de CA3 ce qui permettrait de faciliter la discrimination de deux événements similaires (Figure 10).

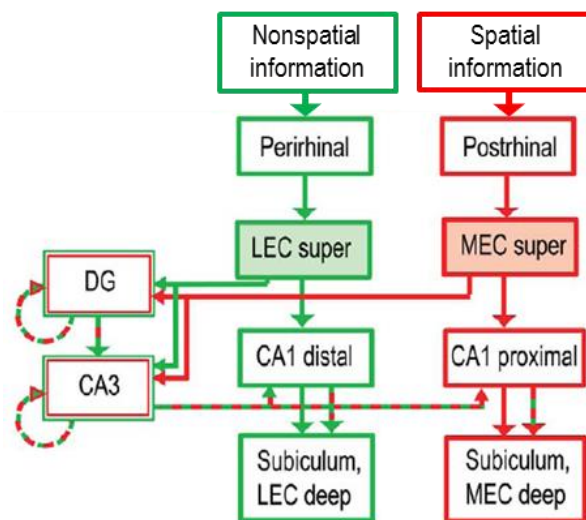


Figure 10 : Schéma du flux d'informations vers la formation hippocampique. En rouge est représenté le flux des informations spatiales et en vert, le flux des informations non-spatiales. SUB, subiculum. (D'après Knierim, 2006; Deshmukh and Knierim, 2011).

En outre, les auteurs revenant à leur histoire d'oiseau dépourvu de GD, spéculent sur la raison évolutive de cette constatation. Ils écrivent alors que les mammifères sont des navigateurs du sol et ont besoin d'associer beaucoup plus d'informations spatiales de proximité avec des informations distales que les oiseaux qui sont des navigateurs du ciel

qui sont le plus souvent confrontés à des informations distales au vu de la distance au sol.

Même si le doute est toujours permis, il ne faut pas pour autant prendre cette nouvelle information comme étant une vérité absolue. Cela dit, cette revue est un parfait exemple pour nous rappeler que toute théorie, même les plus démontrées et admises dans l'histoire de la biologie, peuvent être remises en question par exemple grâce à l'évolution des techniques et par de nouvelles approches.

Pour conclure, nous avons pu replacer sur la frise temporelle ci-après ces études que nous avons répertoriées par date de publication (Figure 11). Celles concernant l'hippocampe en général sont en noir tandis que celles se recentrant plus particulièrement sur le gyrus denté sont en rouge. De plus, nous avons résumé leur principale découverte en une phrase (en bleu). Cette chronologie depuis les premières études reconnues jusqu'aux plus récentes réalisées dernièrement illustre parfaitement le fait que la science prend du temps et que de nombreux scientifiques contribuent chaque jour un peu plus à la compréhension de cette structure.

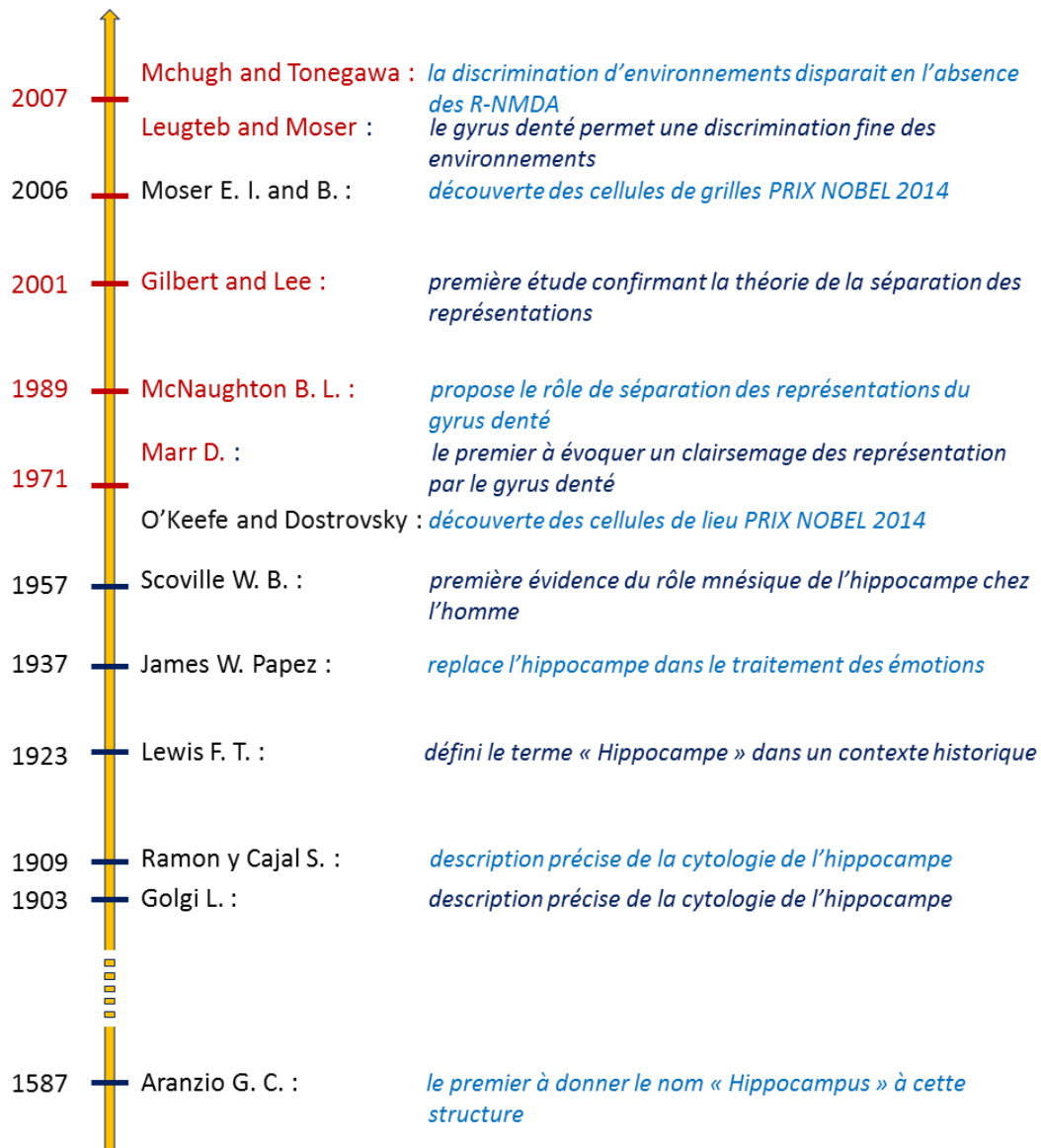


Figure 11 : Bilan des étapes de l'étude de l'hippocampe et du gyrus denté. Les dates noires correspondent à l'étude de l'hippocampe et les dates rouges concernent le gyrus denté en particulier. A droite de la frise vous avez le nom du scientifique. En bleu il s'agit d'une résumé de l'avancé scientifique.

En tout dernier lieu, il me faut préciser que nous ne pouvons pas résumer le rôle d'une structure aussi complexe que le GD à la seule séparation des représentations issues du cortex entorhinal, terme initialement emprunté aux neurosciences cognitives. Une étude dans la fin des années 1990 employant des lésions à la colchicine du GD révèle que sa fonction est un peu plus complexe. Les auteurs ont ainsi observé que la disparition de 90% de la population de cellules granulaires en particulier induisait une diminution des performances dans la mémoire de travail et dans les stratégies d'orientation dans la tâche consistant à trouver une plateforme dissimulée dans un bassin d'eau opaque

(piscine de Morris), (Xavier et al., 1999). De plus, des études tendent de plus en plus à séparer les rôles du GD ventral et du GD dorsal. Une revue de 2013 développe l'idée que le GD ventral aurait la gestion de la séparation des représentations provenant d'informations olfactives, tandis que le GD dorsal procèderait à la séparation des représentations d'informations d'ordre spatial et de contexte (pour revue : Kesner, 2013).

2.5 Rappel des souvenirs : la Madeleine de Proust

Si le processus de séparation de représentations permet la formation de représentation distinctes, non ambiguës d'événements très proches, le rappel de ces représentation peut être également source d'ambiguïté et donc d'erreurs. Le rappel permettant de restituer les souvenirs, peut nécessiter un processus de « recomposition des représentations » (pattern completion), (O'Reilly and McClelland, 1994; pour revue : Treves et al., 2008).

Ce processus permet de reconstituer la représentation complète d'une situation quand des éléments de cette représentation sont manquants. Pour reprendre mon exemple précédent vous retournez dans une pièce qui vous est familière mais des objets dans cette pièce ont disparu. S'agit-il de la même pièce ou d'une pièce différente ? Si vous prenez la décision qu'il s'agit de la même pièce, vous ré-activez la représentation spécifique de cette pièce et si vous prenez la décision qu'il s'agit d'une autre pièce vous formez une nouvelle représentation.

Au niveau cellulaire, le processus de recomposition des représentations aboutirait à la réactivation de l'ensemble des neurones qui ont été actifs durant l'exploration de la pièce si la décision qu'il s'agit de la même pièce est prise. L'équipe du professeur Tonegawa au MIT a réussi à induire de faux souvenirs à une souris en induisant artificiellement une recomposition de représentations qui n'avait jamais été créée (Ramirez et al., 2013).

Cette fonction de restitution de souvenirs serait supportée par les récurrences de CA3, c'est-à-dire les afférences que produisent les neurones pyramidaux de CA3 sur eux-mêmes. De plus, les indices qui déclenchent ce rappel de souvenirs seraient fournis par

le cortex entorhinal via les afférences directes sur les cellules principales de CA3 (Treves and Rolls, 1994; Rolls, 1996; Hopfield, 1982; pour revue : Yassa, 2011).

Pour résumer, la voie indirecte du cortex entorhinal par le gyrus denté aurait pour rôle de forcer la séparation des schémas à destination de CA3 par les fibres moussues réduisant ainsi les interférences et amenant un support robuste pour de nouveaux apprentissages. Alors que la voie directe entre le cortex entorhinal et CA3 serait en réalité une voie d'acheminement d'indices pour la restitution de souvenirs sous-tendue par les récurrences des cellules pyramidales de CA3 (Rolls, 2007). Cela a été appuyé par deux études qui montrent que l'inactivation des fibres moussues (Lassalle et al., 2000) ou la lésion du gyrus denté (Lee and Kesner, 2004) affectaient le codage de nouveaux souvenirs sans affecter la restitution d'anciens souvenirs. Inversement, la lésion de la voie directe sur CA3 a un impact négatif sur le rappel de souvenirs mais pas sur le codage du gyrus denté produisant la séparation des schémas (Lee and Kesner, 2004).

C/ Une construction cytologique organisée et connectée

« L'esprit est un produit de l'organisation du cerveau tout comme la vie est un produit de l'organisation des molécules. »

*François Jacob – Le jeu des possibles
Prix Nobel de médecine 1965*

Après avoir d'abord donné une vue d'ensemble sur l'aspect structurel et connecté de l'hippocampe et du gyrus denté, nous allons nous focaliser sur les acteurs cellulaires de la structure d'intérêt : le gyrus denté. Nous allons décrire dans un premier temps les neurones glutamatergiques du gyrus denté : les cellules granulaires, les cellules granulaires semilunaires et les cellules moussues. Puis, dans un second temps nous allons passer en revue les principaux neurones GABAergiques qui résident dans cette structure.

1. Les cellules granulaires (CG)

1.1 Morphologie du soma et des dendrites

Les cellules granulaires (CG), appelées aussi « grains » ont un corps cellulaire (ou soma) assez petit et sphérique (8-12 μm de diamètre), massés dans la couche granulaire avec une très grande densité. On en dénombre ainsi près de 1,2 millions chez le rat (Claiborne 1990) et jusqu'à 15 millions dans le cerveau humain (West and Gundersen, 1990). Même si la très large majorité des cellules granulaires sont dans la couche du même nom, certains de ces neurones se retrouvent dans le hile et sont appelés « grains ectopiques » (Amaral, 1978; Scharfman, 2007).

Les dendrites de ces cellules, naissant au pôle apical du soma, s'étendent perpendiculairement à la couche granulaire et traversent la couche moléculaire en cône étroit jusqu'à la fissure hippocampique (Figure 12, Lübke et al., 1998). Ils sont significativement plus courts que ceux des neurones pyramidaux de CA1 et leur morphologie peut varier en fonction de leur localisation. En effet, les cellules granulaires dont le soma se retrouve dans la partie suprapyramidale ont généralement un plus grand nombre de segments dendritiques et une longueur totale plus importante que ceux qui se situent dans la lame infrapyramidale (Claiborne et al., 1990; Desmond and Levy, 1982, 1985).

A noter qu'il existe des dendrites partant du pôle basal du corps cellulaire des grains (dendrites basilaires) chez les primates dont l'homme (20-35%) et beaucoup plus rarement chez les rongeurs adultes (Seress and Mrzljak, 1987).

Les cellules granulaires avec les cellules pyramidales font partie des neurones les plus densément ponctués d'épines dendritiques. Leur nombre augmente d'autant plus que l'on s'éloigne du soma. On estime que ces neurones ont environs 2 à 4 épines par micron de dendrite et qu'elles sont sensiblement plus nombreuses sur les neurones de la lame suprapyramidale (près de 5600 épines) que sur les neurones de la lame infrapyramidale (3600 épines), (Desmond and Levy, 1982; Hama et al., 1989).

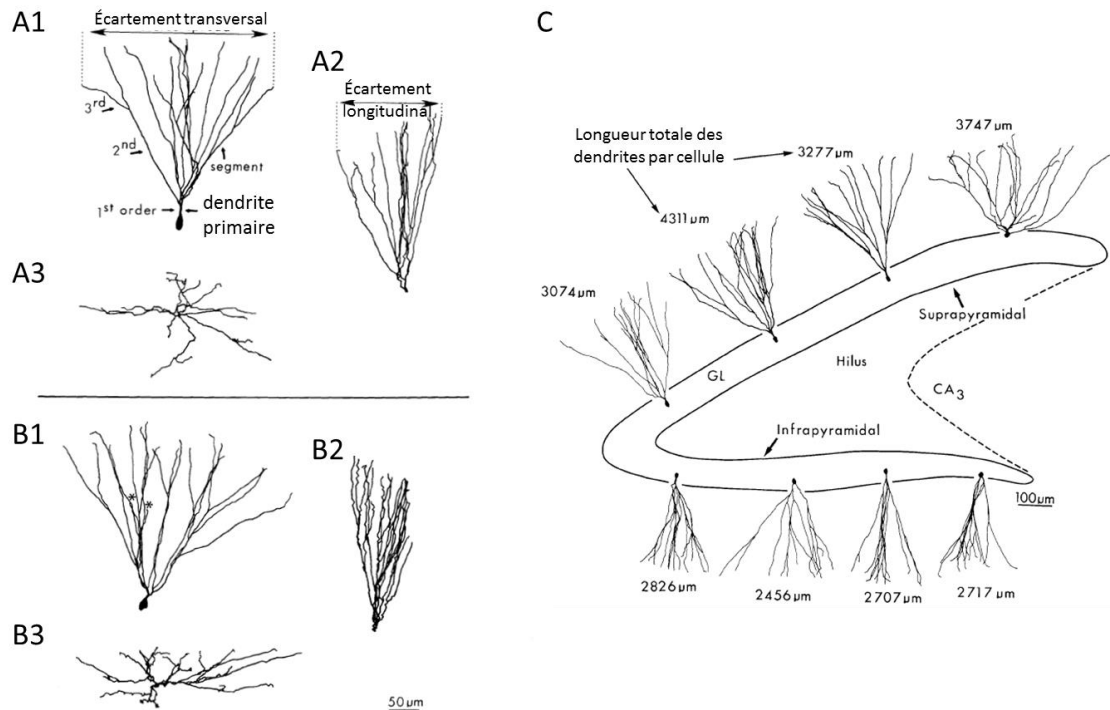


Figure 12 : La morphologie des cellules granulaires. A et B, Reconstruction de deux cellules granulaires de la lame suprapyramidale (soma et dendrites). C, Reconstruction de cellules granulaires réparties sur toute la longueur de la couche granulaire avec la longueur totale de leurs dendrites. (D'après Claiborne et al., 1990).

Les branchements dendritiques sont plutôt simples et relativement symétriques (Figure 12). Les dendrites émergeant des branchements parents sont de diamètres inférieurs et au final terminent tous à la même distance du soma, au niveau de la fissure hippocampique (Andersen et al., 2004).

1.2 Connexions afférentes

L'afférence excitatrice principale des cellules granulaires est la voie perforante, ce qui constitue le premier relai de la boucle tri-synaptique. Ces axones proviennent de la couche II du cortex entorhinal, des neurones étoilés principalement (Steward and Scoville, 1976), mais aussi en très faibles proportions, des couches profondes V et VI du cortex entorhinal (Köhler, 1985). Selon la provenance des fibres, il n'y aura pas la même innervation spatiale des cellules granulaires. Ainsi il a été montré que les neurones étoilés localisés dans le cortex entorhinal médian projetaient préférentiellement dans la partie médiane de la couche moléculaire formant la voie perforante médiane. Alors que

les cellules étoilées de la partie latérale du cortex entorhinal projetaient par la voie perforante latérale sur le tiers externe de la couche moléculaire (Hjorth-simonsen and Jeune, 1972). Les cellules granulaires reçoivent aussi des afférences glutamatergiques par la voie commissurale/associative provenant des cellules mossues qui seront décrites ultérieurement (Figure 13).

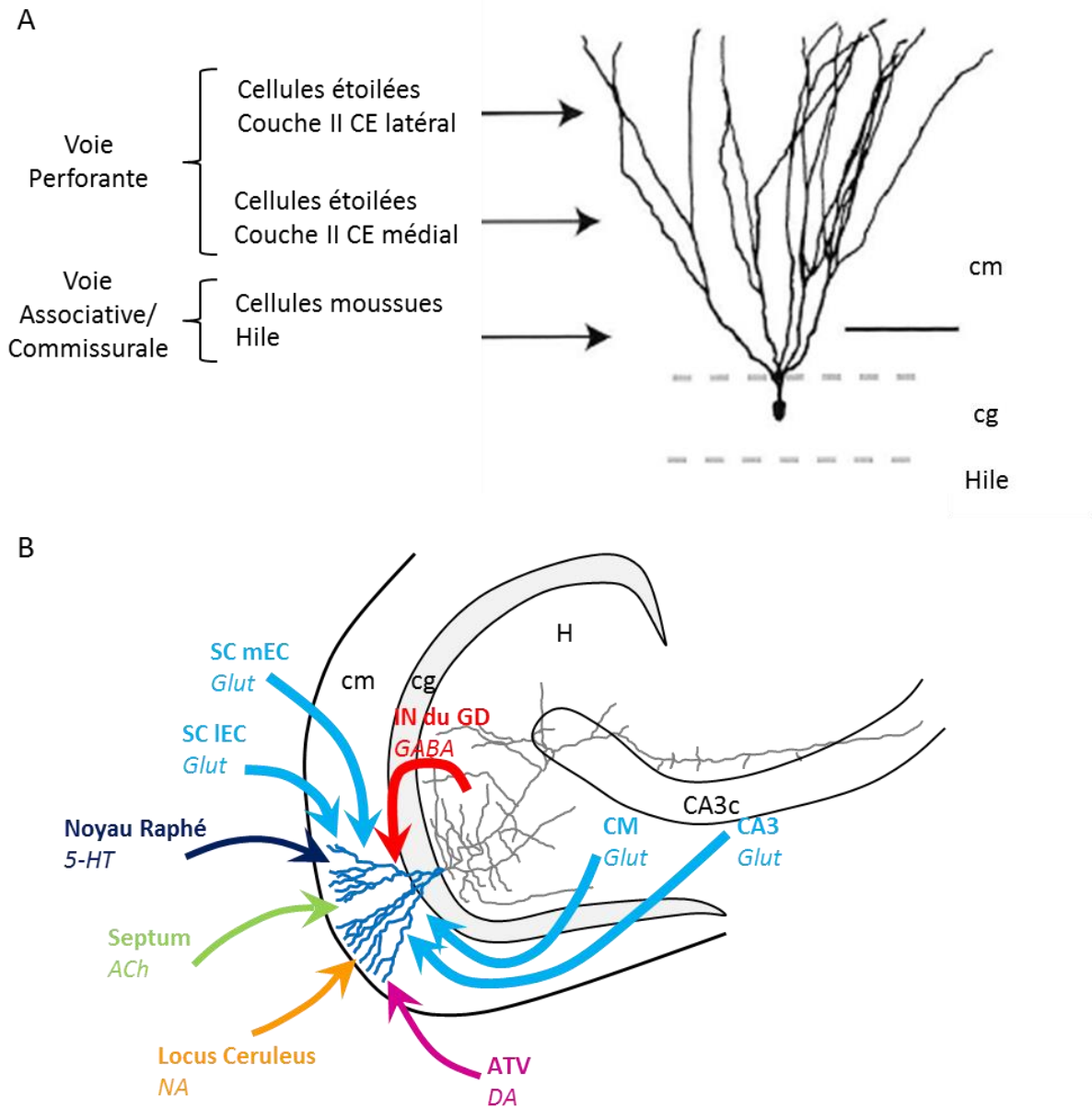


Figure 13: Les différentes afférences contactant les cellules granulaires. A, La voie associative/commissurale connectent les cellules granulaires au niveau de la partie proximale de leur dendrite dans la couche moléculaire interne. La voie perforante des cellules étoilées provenant de la partie médiale du CE connectent les cellules granulaires au niveau de la couche moléculaire médiale. La voie perforante des cellules étoilées provenant de la partie latérale du CE fait synapse sur la partie la plus distale des dendrites des cellules granulaires au niveau de la

couche moléculaire externe. (D'après Lübke, 1998). B, Résumé de toutes les afférences arrivant sur les cellules granulaires. Glut, glutamatergiques ; 5-HT, sérotonine ; ACh, Acétylcholine ; NA, Noradrénaline ; DA, dopamine ; SC, cellules étoilées ; mEC, entorhinal cortex médian ; lEC, entorhinal cortex latéral ; CM, cellules moussues ; IN, interneurons ; GD, gyrus denté ; ATV, Aire tegmentale ventrale.

De nombreux interneurons projettent également sur les cellules granulaires depuis le hile ou la couche granulaire (voir le *chapitre 4* page 64).

Parmi les afférences restantes, elles proviennent du noyau septal (afférences cholinergiques), du locus ceruleus (afférences noradrénergiques), de l'aire tegmentale ventrale (synapses dopaminergiques) ainsi que de la région supramammillaire de l'hypothalamus et du noyau du raphé (synapses sérotoninergiques), (Amaral and Witter, 1995). Sans oublier les projections en retour ou « backprojections » sur le GD (Myers and Scharfman, 2011).

1.3 Morphologie de l'axone et cibles post-synaptiques

Jusqu'ici nous avons décrit la morphologie du soma et de l'arborisation dendritique en y incluant les afférences que ces neurones pouvaient recevoir. Il nous reste encore à détailler la morphologie de leur axone ainsi que leurs cibles post-synaptiques. C'est un axone dépourvu de gaine de myéline qui prend naissance sur la partie basale du soma (pour revue : Henze et al., 2000). Il traverse la couche granulaire, s'arborise dans le hile puis s'étend le long de CA3c jusqu'à la limite CA2/CA1. Ramon y Cajal appelle alors ces axones les « fibres moussues » en raison de leur grande similitude avec les axones du cervelet.

Ces fibres moussues possèdent 3 types de contacts : les larges terminaisons moussues (4-10 μm), les filopodes issus de ces boutons moussus (0,5-2,0 μm) et les petites varicosités en passant (0,5-2,0 μm) (Acsády et al., 1998). Les cellules moussues sont les cibles principales des terminaisons moussues dans le hile, tandis que les cellules pyramidales de CA3 sont les cibles principales de ces terminaisons hors du gyrus denté (Figure 14 B ; Claiborne et al., 1986). Les connexions sur les neurones pyramidaux de CA3 se font principalement sur la partie proximale apicale des neurones pyramidaux et moins souvent au niveau basal (Figure 14, A et C ; Henze et al., 2000; Blaabjerg and

Zimmer, 2007). Ces larges synapses sont de type « détonatrices » pour leur capacité à fortement dépolariser les neurones pyramidaux de CA3 (Treves and Rolls, 1992, 1994; pour revue : Jaffe and Gutiérrez, 2007).

Les deux autres contacts qui existent se font en grande majorité avec les interneurones : depuis ces terminaisons moussues, localisées à la fois dans le hile et dans CA3, partent entre 2 et 3 filopodes qui contactent les interneurones en présence dans le hile et CA3 (Figure 15 D ; Acsády et al., 1998). De la même façon, les terminaisons *en passant* que sont les varicosités contactent également les interneurones.

J'ai alors remarqué que plusieurs revues et articles affirmaient que les interneurones étaient les cibles majoritaires des fibres moussues. Alors que bien souvent, on parle de ces fibres dans le contexte du circuit tri-synaptique mettant en jeu les neurones principaux glutamatergiques de la formation hippocampique.

Les auteurs font un calcul très simple : si pour chaque terminaison moussue vous avez 3 filopodes contactant 3 interneurones, les varicosités ou les synapses classiques qui contactent environ 1 interneurone par terminaison (Figure 14 B). Vous aurez alors pour chaque synapse sur un neurone glutamatergique au minimum 4 fois plus d'interneurones GABAergiques contactés (Acsády et al., 1998). Ce qui fait bien plus d'interneurones GABAergiques contactés que de neurones glutamatergiques, prouvant l'importance de ces connexions inhibitrices au sein du réseau du GD.

En poursuivant sur la quantification, une seule cellule granulaire peut contacter environ 15 neurones pyramidaux, avec une terminaison par neurone, et chaque neurone pyramidal reçoit autour de 50 contacts de cellules granulaires (Amaral et al., 1990; Claiborne et al., 1990).

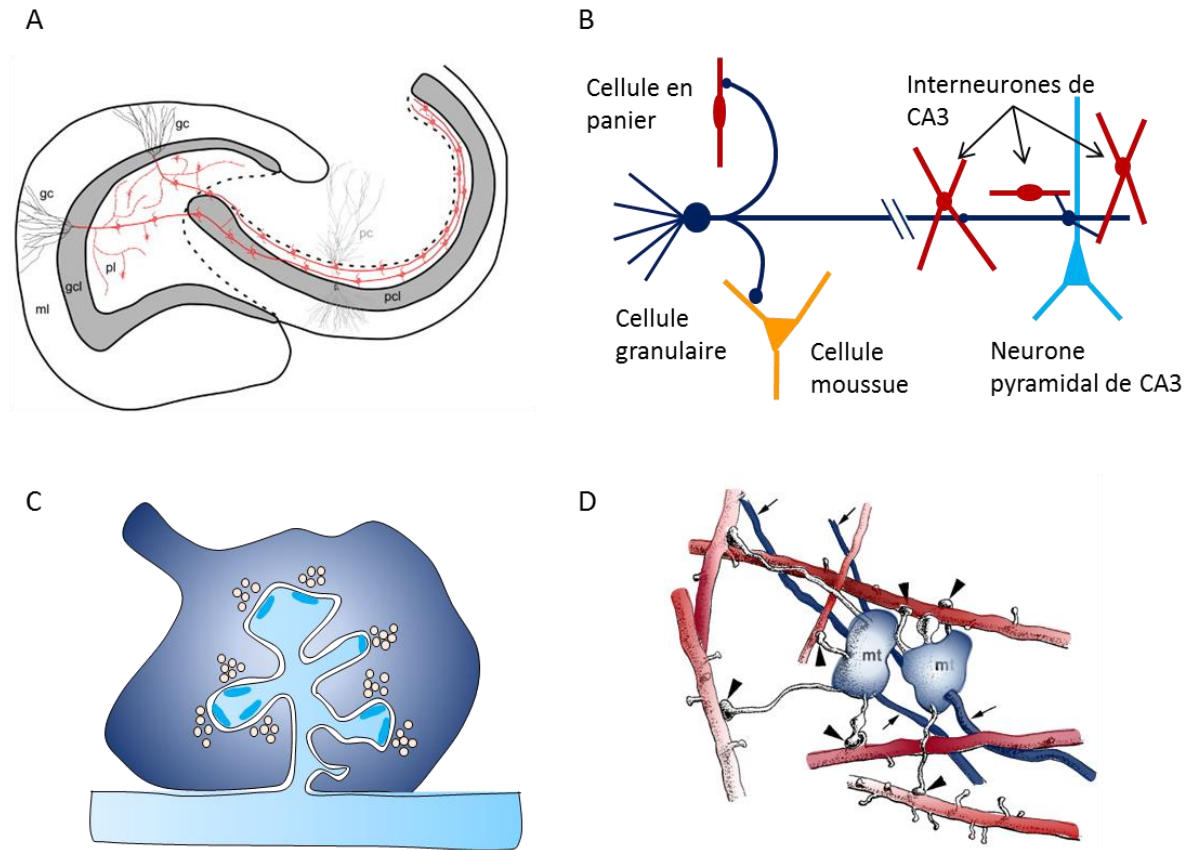


Figure 14 : Les fibres moussues et les types de synapses formées. A, schéma de deux cellules granulaires projetant leurs fibres moussues à travers le hile vers CA3 sur la partie proximale apicale de la couche pyramidale. B, Illustration des différents types de contacts que font les cellules granulaires avec les neurones glutamatergiques et GABAergiques du hile et de CA3. C, illustration d'une terminaison moussue (bleu foncé) sur les épines dendritiques d'une cellule pyramidale de CA3 (bleu clair). D, Illustration des filopodes connectant les interneurons (têtes de flèches noires), les dendrites des interneurons sont en rouge et les terminaisons moussues (mt) en bleu. (D'après Amaral et al., 2007; Jaffe and Gutiérrez, 2007).

1.4 Implications fonctionnelles et réaction en condition pathologique

La première particularité des CG c'est leur faible activité spontanée. Fortement hyperpolarisées, (-84 mV en moyenne in vivo ; Penttonen et al., 1997), ces cellules requièrent une plus grande dépolarisation que la majorité des neurones pour atteindre le seuil de déclenchement des potentiels d'action de -45 mV, similaire à celui des neurones pyramidaux de CA1 et CA3. Ce qui fait que les activités spontanées de ces neurones in vivo et in vitro sont très rares (Penttonen et al., 1997). Même pendant que l'animal effectue une tâche, cette population de neurones reste globalement très

silencieuse (Jung and McNaughton, 1993; Skaggs et al., 1996). Ce n'est pas pour rien qu'on appelle cette assemblée neuronale la « barrière inhibitrice » du gyrus denté. De plus, la quantité de neurones augmente d'un facteur 10 entre le CE (~112 000 neurones) et le GD (~1 200 000 neurones) (Schmidt et al., 2012). Il en résulte que ce n'est qu'une très faible proportion de neurones qui s'activent pour un contexte donné.

Ces propriétés particulières produisent ce qu'on appelle du « sparse coding » (codage clairsemé) à la base du processus de séparation des représentations (pattern separation) décrit précédemment. Le fait que peu de neurones soient activés à la fois permet ainsi la « désambiguïté » des messages afférents du cortex entorhinal.

In vivo, l'activité de ces neurones est modulée par la localisation de l'animal dans l'espace, en temps réel. Deux études récentes ont montré qu'au cours de l'exploration d'une arène par un rat, des CG s'activent spécifiquement lorsque le rongeur se situe à une position précise de l'environnement (Diamantaki et al., 2016; Goodsmith et al., 2017). On appelle cela un « champ de réponse » (ou place field). Il faut tout de même préciser que c'est seulement un très faible pourcentage de CG qui sont activées chez le rat en exploration. Pour résumer, ces cellules sont donc très peu actives pendant les phases d'exploration du rongeur et les quelques cellules actives n'ont qu'un seul champ de réponse par environnement.

La dernière particularité notable de ces neurones provient de leur remarquable résistance aux crises d'épilepsie. Contrairement aux cellules moussues décrites un peu plus loin, les CG ne meurent pas après les crises. En revanche, elles font ce qu'on appelle du « sprouting » ou de la ramification massive d'axones dans le hile qui remontent jusque dans une couche granulaire élargie en créant des synapses récurrentes. Cela contribue à accroître l'hyper-excitabilité de toute la population des grains (Maglóczy, 2010; Schmeiser et al., 2017; Epsztein, 2005; pour revue : Buckmaster, 2012).

2. Les cellules granulaires semilunaires (CGS)

Le premier à avoir décrit ces cellules est le père de la neuroanatomie, Ramon y Cajal. Il les avait alors appelé « grains déplacés de forme semi-lunaire » (Ramon y Cajal, 1909).

« Elles ressemblent tout à fait à celles qui forment le stratum granulosum situé au-dessous, sauf qu'elles sont triangulaires ou semilunaires. On les trouve dans toute l'épaisseur de la couche moléculaire » Ramon y Cajal, 1909.

Or, suite à cette première observation, ces neurones sont complètement retombés dans l'oubli car les techniques de l'époque ne permettaient pas l'étude d'une population neuronale aussi rare.

Il faut attendre presque un siècle pour trouver le premier article scientifique qui se penche sur la question. Et comme depuis il n'y a eu que deux articles de plus sur les cellules granulaires semilunaires, pour les décrire au mieux il me faut passer en revue les observations de ces trois articles.

Résultat n°1 : Les CGS représentent une population neuronale à part entière du GD.

Ce n'est donc qu'en 2007 que la première étude remettant ces cellules glutamatergiques au centre de l'attention est publiée par une équipe américaine (Williams et al., 2007). Cette étude faite chez le rat montre alors que les CGS, contrairement aux cellules granulaires, ont des collatérales axonales qui remontent dans le tiers interne de la couche moléculaire. De plus, les auteurs montrent que leur arborisation dendritique est plus importante et leur soma plus triangulaire que les cellules granulaires (Figure 15, A, B et C).

D'un point de vue électrophysiologique, ces neurones se distinguent également par une adaptation de la fréquence de décharge moins importante lors d'injection de créneaux de courant dépolarisant (Figure 15 D).

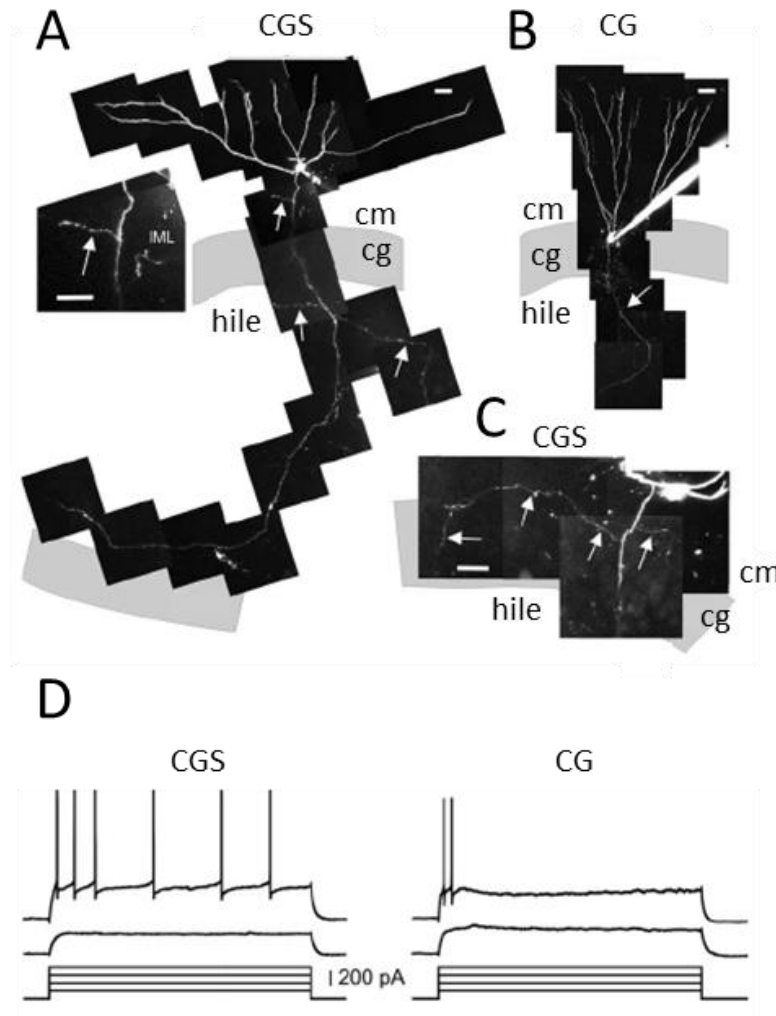


Figure 15: Propriétés morpho-physiologiques des CGS et des CG. De A à C ce sont des images mosaïques de cellules granulaires semilunaires (CGS en A et C) et de cellules granulaires (CG en B). D, caractéristiques électrophysiologiques des CGS et CG. (D'après Williams et al., 2007).

Enfin avec des enregistrements de paires de neurones, ils montrent que les CGS exciteraient à la fois les interneurons du hile et les cellules moussues du hile de façon monosynaptique ce qui nous permet de savoir que ces neurones font partie intégrante du circuit du gyrus denté.

Résultat n°2 : Les CGS seraient à l'origine du barrage synaptique du gyrus denté.

Trois ans après avoir décrit les propriétés morpho-physiologiques des CGS, la même équipe publie un article beaucoup plus axé sur l'aspect fonctionnel de ces cellules chez les rats (Larimer and Strowbridge, 2010).

Ils font alors 3 observations. La première est que lorsqu'ils stimulent la voie perforante, tandis que les cellules granulaires sont silencieuses, les CGS présentent un patron de décharge persistant (Figure 16 A). La deuxième c'est que ces neurones activent à leur tour une assemblée neuronale en aval dans le hile qui, selon eux, encoderait les informations entrant dans le gyrus denté (Figure 16 B). Ce n'est pas tout, cette décharge persistante active le réseau GABAergique inhibiteur via les cellules moussues (CM) du hile.

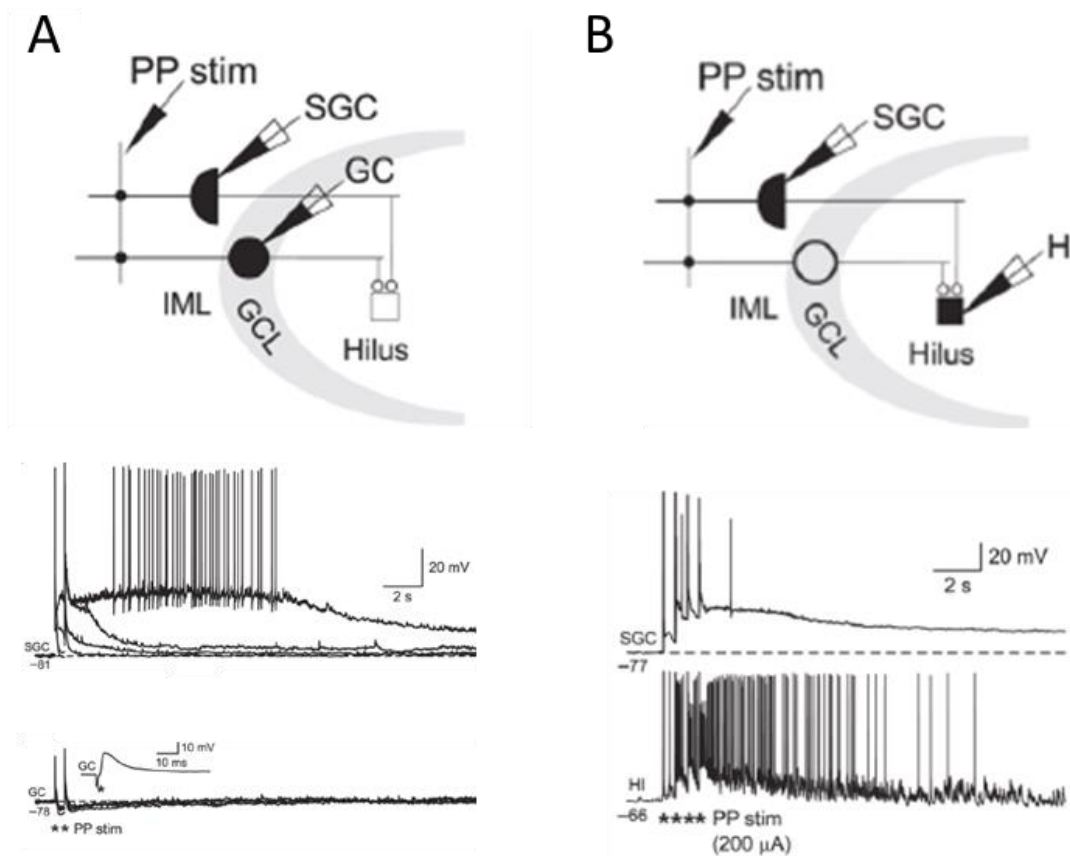


Figure 16: Réponse soutenue des CGS par stimulation de la voie perforante. A, Réponse différente entre CG et CGS lors de la stimulation de la voie perforante. B, Réponse similaire entre CGS et les interneurones hilaires (HI) lors de la stimulation de la voie perforante. (D'après Larimer and Strowbridge, 2010).

S'appuyant sur ces informations expérimentales, ils pensent alors que les CGS se trouvent bien en amont de tout processus d'intégration de la voie perforante par le gyrus denté. Recevant initialement les afférences du cortex entorhinal et activant les cellules moussues et les interneurones du hile de façon soutenue, les CGS

provoqueraient ainsi l'inhibition de la population des cellules granulaires rendant leur activation très clairsemée.

Résultat n°3 : Le contrôle inhibiteur est différent pour les CGS et le CG.

En 2012, paraît le troisième article sur les CGS qui s'attache à les étudier dans un contexte pathologique (Gupta et al., 2012). Les auteurs se basent sur les deux études précédentes concernant le rôle des CGS, ils ont tenté de caractériser les afférences GABAergiques de ces cellules en regard des CG.

Ils montrent qu'après une commotion cérébrale induite par percussion localisée sur un hémisphère (Alder et al., 2011) ils constatent que l'inhibition tonique des CGS est fortement réduite, contrairement aux CG, conduisant par conséquent à une augmentation de l'excitabilité des CGS (Figure 17).

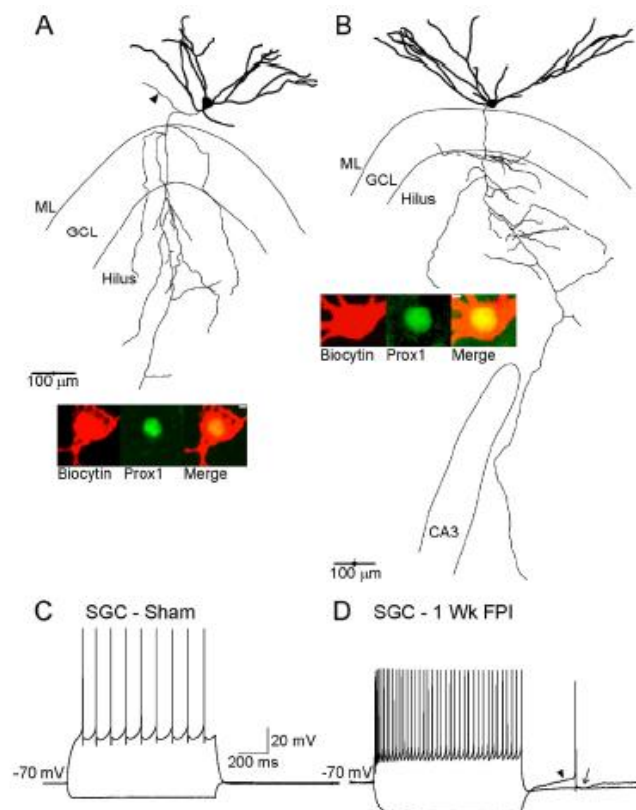


Figure 17 : Propriétés électrophysiologiques des CGS après une commotion cérébrale. A, Une CGS reconstruite chez un rat sham. B, Une CGS reconstruite chez un rat après commotion cérébrale. C, Comportement électrophysiologique suite à l'injection de courant positif en crêneaux des CGS contrôles. D, Comportement électrophysiologiques des CGS après commotion cérébrale. (D'après Gupta et al., 2012).

Ils font alors l'hypothèse qu'en condition physiologique, les CGS reçoivent beaucoup plus d'afférences depuis les interneurones du hile qui sont vulnérables aux lésions, alors que les CG seraient connectés par des interneurones résistants aux lésions (voir *chapitre 4* page 66). Il y aurait donc un contrôle inhibiteur différent sur les CGS et les CG (voir *Discussion* page 157). Ils concluent ensuite que l'augmentation d'excitabilité des CGS en condition lésionnelle pourrait être la cause d'un dysfonctionnement du système.

3. Les cellules moussues (CM)

3.1 Morphologie du soma et des dendrites

Ramon y Cajal les appelait les cellules étoilées ou triangulaires. Ce sont les neurones principaux du hile. Ils sont glutamatergiques et expriment pour la plupart la calrétinine avec un gradient dorso-ventral (Fujise et al., 1998). Pour avoir une idée sur la proportion que représente cette population au sein du hile : la moitié des neurones du hile sont des cellules moussues, l'autre moitié est composée d'interneurones GABAergiques (Buckmaster and Jongen-Rêlo, 1999) de différents types. Les cellules moussues sont 25 à 30 fois moins nombreuses que les cellules granulaires (Amaral et al., 1990).

Dotés d'un corps cellulaire massif comparé aux autres cellules (25-35 μm) (Ribak et al., 1985), ces neurones sont pourvus au niveau des dendrites proximaux d'excroissances épineuses (thorny excrescences) (Figure 18). Cet aspect particulier leur a valu leur nom de cellules moussues par Amaral en 1978 (Amaral, 1978; Fujise et al. 1998). C'est à cet endroit qu'il y a contact entre les axones des cellules granulaires et les cellules moussues, via les fibres moussues, comme décrit précédemment. Leurs dendrites, entre 3 et 4 au départ du soma, sont assez courtes, ramifiées et sortent très rarement du hile (Buckmaster, 2012; Scharfman, 1991). La morphologie des dendrites est sensiblement différente selon un gradient dorso-ventral. En effet leur arborisation est beaucoup plus compacte et bipolaire en dorsal, alors qu'en ventral elle est beaucoup plus étendue (Fujise et al., 1998).

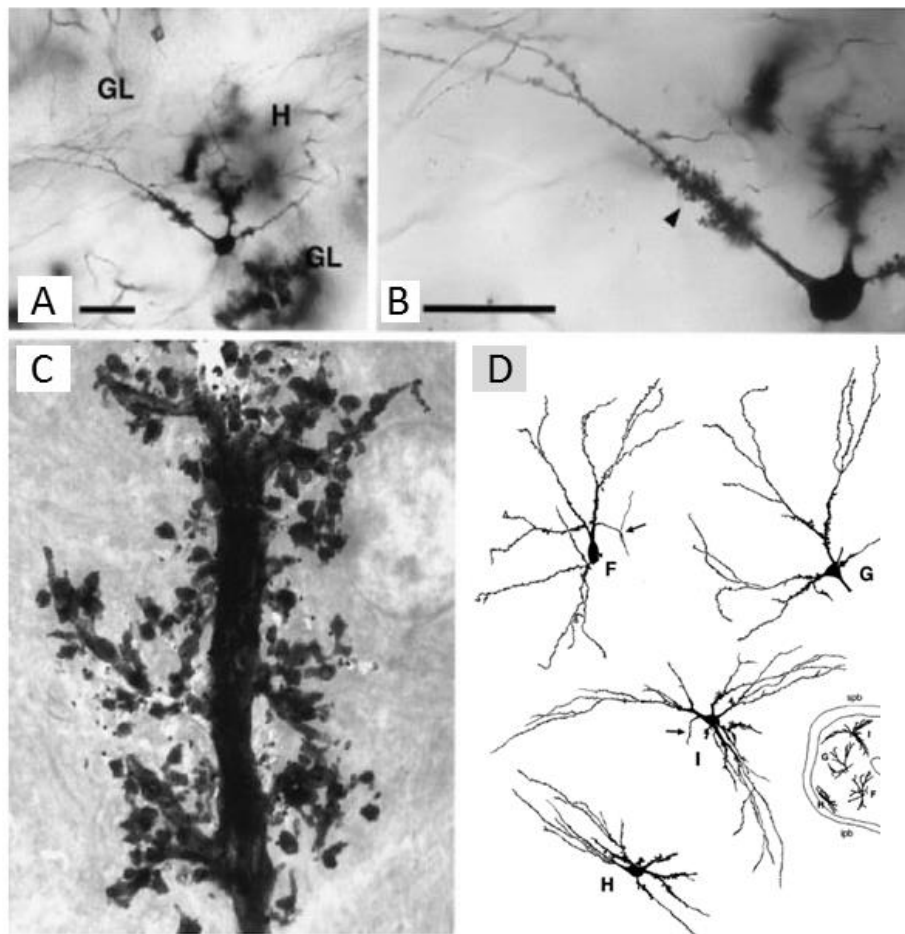


Figure 18 : Exemples de cellules moussues. A-B, Photomicrographie de cellules moussues marquées par la méthode de Golgi, à un niveau intermédiaire du hile. C, Microscopie électronique à transmission montrant les excroissances épineuses des cellules moussues. D, Schémas de cellules moussues localisées en partie ventrale, à partir d'image de cellules marquées par la méthode de Golgi. A noter que les dendrites des cellules sont beaucoup plus étendues en zone dorsale et beaucoup plus compactes en zone ventrale. GL, couche granulaire ; H, hile. (D'après Fujise et al., 1998).

3.2 Connexions afférentes

Ces cellules reçoivent, en plus des afférences des cellules granulaires, une inhibition périsonatique de la part de deux types morphologiques d'interneurones : les cellules en panier et les cellules axo-axoniques (Acsády et al., 2000; Freund and Buzsáki, 1996). Sur ces mêmes zones périsonatiques et dendritiques proximales on retrouve une connexion cholinergique septale (Deller et al., 1999). Enfin, parmi le reste des afférences ayant des terminaisons synaptiques sur des parties plus distales des dendrites des

cellules moussues, nous retrouvons des projections provenant de cellules pyramidales de CA3 ainsi que provenant d'autres cellules moussues (pour revue : Henze and Buzsáki, 2007; Scharfman, 2007).

3.3 Cibles post-synaptiques

Les cellules moussues possèdent trois types de cibles post-synaptiques à la fois excitatrices et inhibitrices au sein même du gyrus denté. La première connexion se fait sur les dendrites des cellules granulaires au niveau de la couche moléculaire interne, produisant un effet « *feedback* » puisque les CG se projettent de nouveau sur les cellules moussues. Cela permet une excitation directe des grains. Le deuxième type de synapse se fait sur les interneurones hilaires (Figure 19). C'est la composante locale du circuit impliquant les CM. Il en résulte une inhibition indirecte des cellules granulaires en excitant les interneurones, participant ainsi à la barrière inhibitrice du gyrus denté.

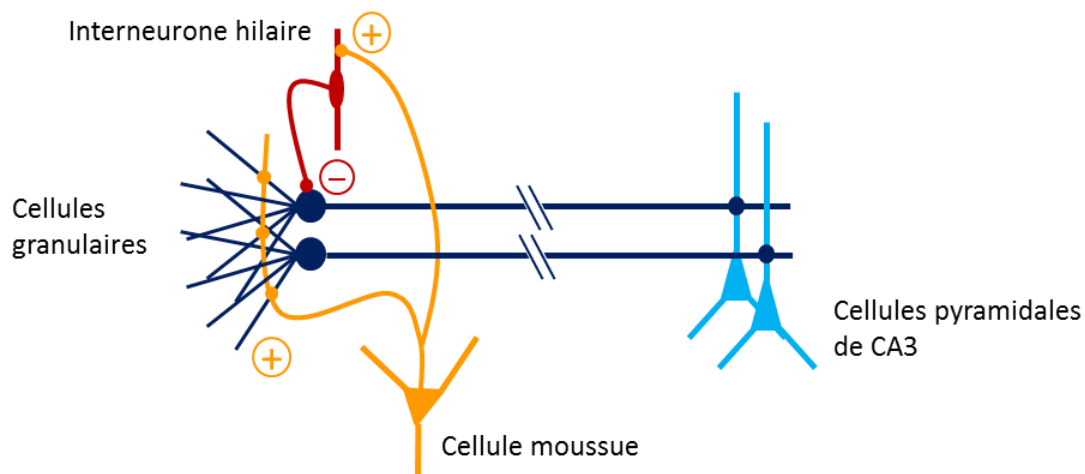


Figure 19 : Cibles post-synaptiques locales des cellules moussues. Projection axonale des cellules moussues vers le premier tiers interne de la couche moléculaire faisant synapse sur la partie proximale des dendrites des cellules granulaires. Contact synaptique des cellules moussues sur les interneurones hilaires.

Enfin, le dernier type de contact se fait sur des CG contra-latérales (pour revue : Scharfman, 2016) en transitant par la commissure, appelée voie commissurale/associative. Ce sont les seules cellules au sein du GD à projeter du côté contra-latéral. Au niveau de l'hippocampe, les cellules pyramidales de CA3, que nous décrivons dans les lignes qui suivent, possèdent également cette propriété.

3.4 Implications fonctionnelles et vulnérabilité

Il nous faut alors souligner que leur rôle reste relativement peu connu. Il a été cependant émis que ces neurones feraient partie de la boucle inhibitrice du GD (Larimer and Strowbridge, 2010). Ils sont contactés par les cellules granulaires excitatrices et viennent à leur tour exciter les interneurons qui inhibent massivement les CG en retour, créant ainsi le barrage inhibiteur du GD.

Tout comme les cellules granulaires et les cellules pyramidales de CA1 et CA3, les cellules moussues font également partie des neurones dont l'activité est modulée par la position spatiale du rongeur. Deux études récentes montrant pour la première fois l'enregistrement de ces cellules in vivo chez des rats en comportement, ont permis de découvrir que cette population neuronale était beaucoup plus active que les grains et les cellules pyramidales. Les chercheurs ont ainsi noté que chaque cellule possédait entre 2 et 4 champs de lieu par environnement (Danielson et al., 2017; Senzai and Buzsaki, 2017). On pourrait alors supposer que ces cellules jouent un rôle dans la séparation des représentations (Nakazawa, 2017).

Le dernier fait notoire est leur remarquable fragilité face à toutes sortes de traumatismes (hypoxie/ischémie : Hsu and Buzsáki, 1993; lésion cérébrale traumatique : Lowenstein et al., 1992) comparée aux CG (pour revue : Scharfman 2016; Scharfman and Myers, 2013; Buckmaster and Jongen-Rêlo, 1999). Cette vulnérabilité est partagée avec les interneurons du hile possédant une très forte densité d'épines dendritiques. Cela suggère que cette vulnérabilité peut être attribuée à une innervation très dense par les fibres moussues provenant des CG et produisant une surexcitabilité toxique pour ces neurones (Hsu and Buzsáki, 1993).

4. Les interneurons

Lorsque l'on prend en considération l'importance qu'occupent les interneurons GABAergiques au sein des circuits locaux de l'hippocampe on ne peut faire l'économie de leur description. Je souhaitais donc réaliser un résumé synthétique des différents types d'interneurons et de leurs propriétés respectives, mais dès lors que vous commencez à vous y intéresser vous appréhendez l'ampleur et la difficulté de cet exercice.

La principale difficulté de l'étude de ces neurones au sein du gyrus denté consiste à déterminer les critères de classification. Parle-t-on alors de la morphologie ? De la localisation du soma ? De marqueurs biochimiques ? De propriétés électrophysiologiques ? De l'origine développementale ?

Un premier critère concerne la localisation du contact synaptique entre l'interneurone en question et ses neurones cibles. Il permet de séparer quatre grandes classes d'interneurones. Un second critère concerne l'expression de différents marqueurs moléculaires comme la parvalbumine, cholécystokinine, somatostatine, calrétinine.

4.1 Les Cellules en panier ou « Basket Cell »

Nous avons en premier lieu les interneurones faisant synapses au niveau du soma des neurones cibles que l'on appelle « basket cells » ou cellules en panier (Ribak et al., 1990; pour revue : Houser, 2007). Ces neurones peuvent être répartis en deux sous-classes entre ceux qui expriment la parvalbumine (PV+) et ceux qui sont positifs à la cholécystokinine (CCK+) (Klausberger et al., 2005). Leur soma, de forme pyramidale, est néanmoins localisé en grande majorité à cheval entre la zone sous-granulaire (ZSG) et la partie profonde de la couche granulaire. Leurs dendrites s'étendent vers le hile et vers la couche moléculaire de façon polarisée (Amaral et al., 2007). Ils tirent leur spécificité de leur axone, restreint à la couche granulaire, qui innerve massivement le soma des cellules granulaires (Figure 20). Leur axone est bien plus long et plus dense que celui des autres interneurones (Hosp et al., 2014).

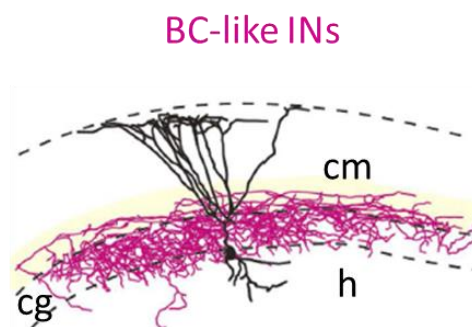


Figure 20 : Reconstruction d'une cellule en panier. Le soma et les dendrites en noir ; l'axone en rose. On note que ce dernier est compacté dans la couche granulaire adjacente. Cm, couche moléculaire ; cg, couche granulaire ; h, hile. (D'après Lee et al., 2016)

4.2 Les Cellules Chandelier ou « axo-axoniques »

La deuxième catégorie d'interneurones regroupe ceux qui contactent les neurones cibles au niveau des segments initiaux de leur axone (Somogyi et al., 1983; pour revue : Houser, 2007). Ils sont appelés les « neurones axo-axoniques » ou encore « cellules chandelier » (Figure 21). Leur soma est localisé dans la couche granulaire et ces neurones contactent les CG à proximité en s'enroulant autour de leur axone formant des sortes de colonnes dans la couche granulaire, perpendiculaires à celle-ci (Soriani et al., 1990; Han et al., 1993; pour revue : Amaral et al., 2007).

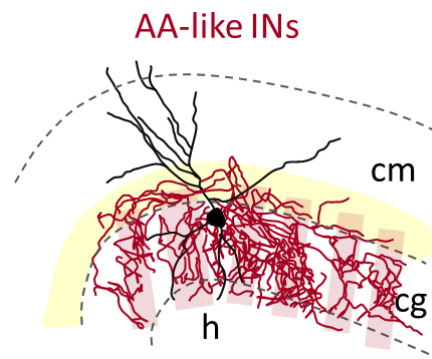


Figure 21 : Reconstruction d'une cellule chandelier. Le soma et les dendrites sont en noir ; l'axone en rouge. On note que le soma se situe dans la couche granulaire et que l'axone forme des colonnes repérées par des rectangles roses. (D'après Soriano and Frotscher, 1989).

Les neurones chandelier représentent 10-15% des interneurones innervant exclusivement dans la couche granulaire (Baude et al., 2007). Ces interneurones expriment la parvalbumine comme les cellules en panier et ont le point commun d'être résistants aux crises d'épilepsies (DeFelipe, 1999; Mitchell et al., 1997).

4.3 Les Cellules HIPP/HICAP/MOPP

Dans cette catégorie on y regroupe les neurones innervant les segments dendritiques de leurs neurones cibles. Ces neurones expriment bien souvent la somatostatine (SOM+) et sont vulnérables aux différents traumatismes dont l'épilepsie du lobe temporel (pour revue : Houser, 2007; Mitchell et al., 1997), de la même façon que les cellules moussues précédemment décrites.

Les HIPPs (hilus perforant path associated cells) sont spontanément actives à 18 Hz. Leur soma se situe majoritairement dans le hile à la bordure avec la zone sous-granulaire (Figure 22, neurone de gauche). Une partie des dendrites, possédant une faible densité d'épines, se situe dans le hile et l'autre se ramifie dans la couche moléculaire. L'axone prend naissance depuis un dendrite primaire et traverse la couche granulaire pour massivement se ramifier dans les 2/3 externe de la couche moléculaire (Han et al., 1993). Certains de ces prolongements peuvent traverser la fissure hippocampique pour atteindre la stratum lacunosum moleculare de CA1.

Les HICAPs (hilar commissural-associational pathway-associated cells) n'adaptent pas leur fréquence de décharge lorsqu'on les dépolarise mais ont une forte accommodation (Hosp et al., 2014). Le soma se situe dans la zone sous-granulaire (Figure 22, neurone du milieu). La plupart des dendrites est dépourvue d'épines et ne sont pas restreints dans une couche particulière. L'axone quant à lui se ramifie très densément au niveau du tiers interne de la couche moléculaire, couvrant quasiment la longueur entière de la crête (Han et al., 1993).

Les MOPPs (molecular layer perforant pathway cells) ne sont pas actives spontanément et ont un profil de décharge irrégulier lorsqu'on les dépolarise (Hosp et al., 2014). Les dendrites primaires émergent d'un soma bien rond localisé dans la couche moléculaire et ont tendance à s'orienter vers la fissure hippocampique (Figure 22, neurone de droite). Tout comme les HIPPs, les dendrites des MOPPs ne possèdent que très peu d'épines dendritiques. A peine sorti du soma, l'axone se ramifie massivement à proximité du soma et dans toute la zone correspondante aux 2/3 externes de la couche moléculaire sans jamais franchir la fissure et évitant la partie interne de la couche moléculaire (Han et al., 1993).

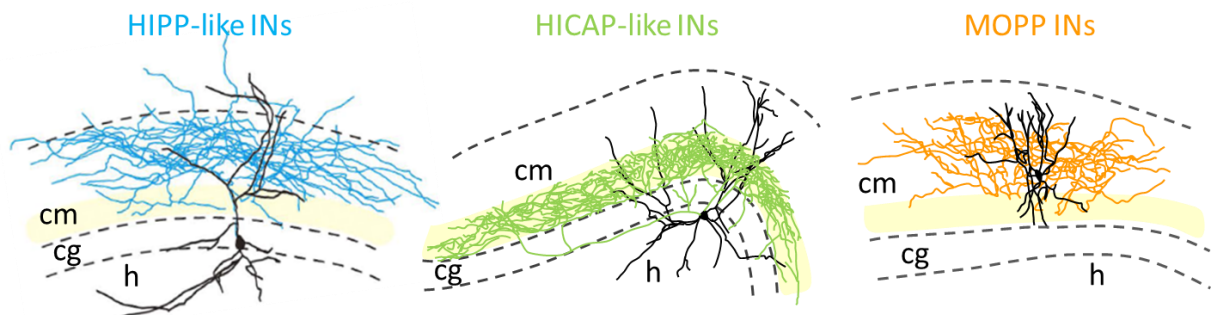


Figure 22 : Reconstruction des interneurones faisant synapse au niveau des dendrites. Le soma et les dendrites en noir ; l'axone en couleur. Pour l'exemple d'interneurones HIPP-like, on

note que son axone (bleu) s'étend dans la partie externe et médiane de la couche moléculaire (cm). Concernant l'interneurone HICAP-like représenté on notera que son axone (en vert) s'étend et se ramifie dans la partie interne de la couche moléculaire tandis que son soma se situe dans le hile (h). Enfin pour l'interneurone MOPP, son arborisation axonique (orange) parcourt toute la largeur de la couche moléculaire. (D'après Lee et al., 2016; Hsu et al., 2016).

4.4 Les Cellules Calréinine

Ces cellules initialement découverte dans la partie CA1 de l'hippocampe constituent le seul groupe d'interneurones qui ciblent quasi-exclusivement des interneurones. Ces neurones sont vulnérables aux crises d'épilepsies du lobe temporal (Tóth and Maglóczy, 2014). Dans cette catégorie on y regroupe deux types de neurones. Le premier type est constitué de neurones dont les dendrites sont couverts d'épines et restreints au hile et dont l'axone est myélinisé.

L'autre type est dépourvu d'épines dendritiques et les dendrites peuvent traverser plusieurs couches. Ils réalisent des contacts dendro-dendritiques et axo-dendritiques avec les interneurones SOM-positifs, Calbindine-positifs, VIP/CCK-positifs, ce qui correspond aux HIPPP, HICAP et MOPS. Mais ils évitent clairement les cellules en panier et les cellules chandelier qui expriment la parvalbumine (Gulyás et al., 1996). Ce système provoque une désinhibition du réseau en inhibant des neurones qui inhibaient les cellules principales excitatrices de la structure.

4.5 Les interneurones du gyrus denté dans un contexte connecté

Cette partie a pour but de réunir tous les interneurones décrits précédemment dans un même schéma afin de visualiser la connectivité GABAergique dans son ensemble au sein de notre structure d'intérêt (Figure 23).

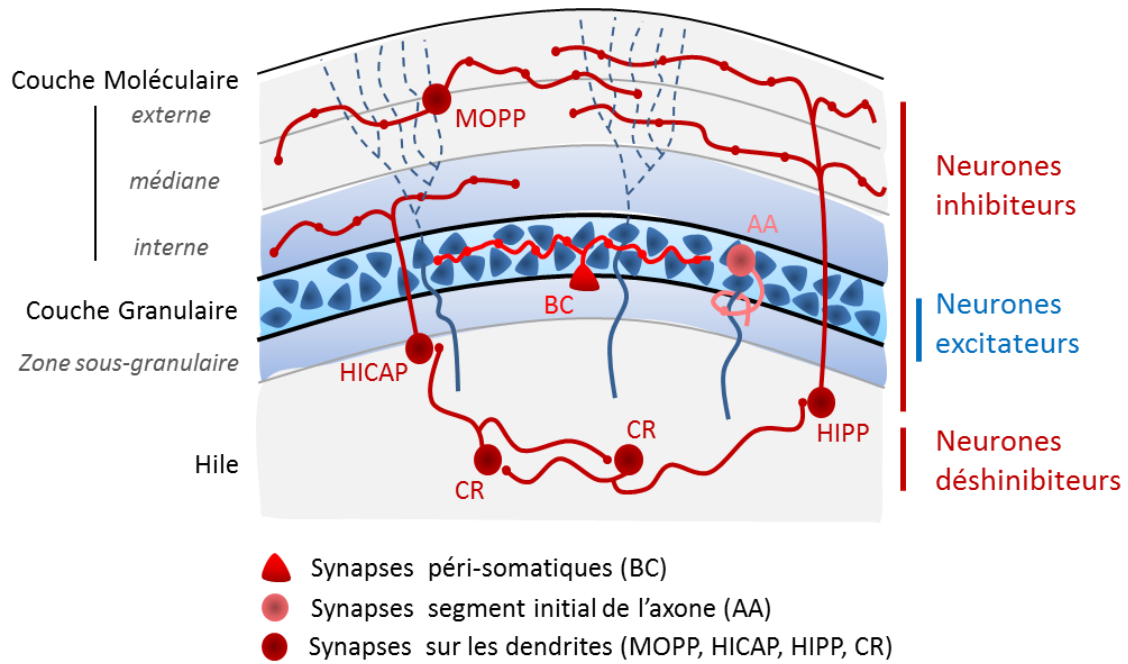


Figure 23 : Hétérogénéité des interneurones GABAergiques du GD. J'ai représenté la position du soma dans le GD en fonction du type cellulaire, les axones par des traits rouges, les cellules granulaires en bleu et un exemple de leur arborisation dendritique en pointillés. Les cellules en panier (BC) et les cellules chandelier (AA) expriment la parvalbumine et sont résistantes aux lésions et traumatismes. Les HIPP/HICAP/MOPP expriment la somatostatine et sont vulnérables aux lésions et traumatismes. (D'après Myers and Scharfman, 2009; Scharfman, 2016).

II. Neurogénèse Développementale et Neurogénèse Adulte du gyrus denté

Comme nous l'avons dit précédemment, en étudiant les neurones selon leur date de naissance embryonnaire, nous ne pouvions nous rendre dans le vif du sujet sans réaliser une description claire de la mise en place développementale du gyrus denté. De la même façon que si vous voulez étudier les pierres fondatrices d'un bâtiment une fois terminé, il faut évidemment connaître le déroulement de sa construction en détails.

De plus, le GD est le siège d'un phénomène fondamental, la neurogénèse adulte. Nous allons rapidement constater que lors de la neurogénèse adulte, nous retrouvons quasiment les mêmes séquences de production et de maturation que lors de

l'embryogénèse, aboutissant à des neurones matures au sein d'un réseau déjà élaboré. C'est un peu comme il existait un plan spécifique pour ajouter à notre bâtisse achevée de nouvelles pierres pour la consolider ou l'améliorer.

A/ Neurogénèse embryonnaire

« Malheureuse condition des hommes ! A peine l'esprit est-il parvenu au point de sa maturité, le corps commence à s'affaiblir. »

Montesquieu – Mes pensées 1816

Après fécondation de l'ovocyte, les cellules en division commencent à construire les différentes structures de l'embryon. Le système nerveux se forme également par étapes avec la genèse de neurones inhibiteurs et excitateurs. Dans le cas de notre structure d'intérêt, le gyrus denté, les premières cellules glutamatergiques principales (cellules granulaires) proviennent de la même zone que les cellules principales de la Corne d'Amon, à savoir la Zone Sous-Ventriculaire (ZSV), (Figure 24).

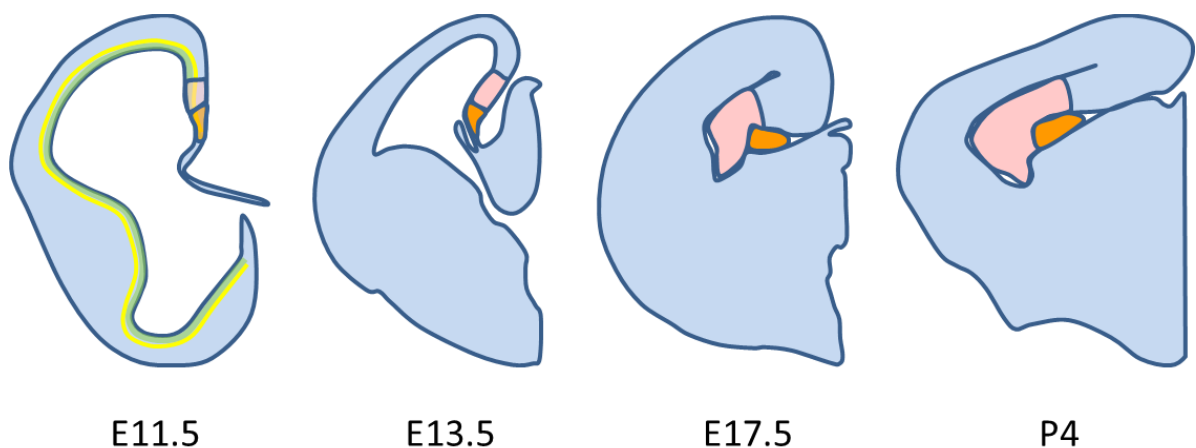


Figure 24 : Localisation du futur gyrus denté en formation au cours du développement. La zone en orange correspond aux cellules granulaires du gyrus denté qui apparaissent entre E11.5 et E13.5 puis qui forment le gyrus denté entre E17.5 et P4. En rose, c'est l'équivalent pour les cellules glutamatergiques du reste de l'hippocampe (CA1 et CA3). En vert est représentée la zone ventriculaire (ZV) et en jaune, la zone sous-ventriculaire (ZSV). (D'après Li and Pleasure, 2007).

On peut alors résumer la formation de la couche granulaire du gyrus denté par 6 étapes successives (pour revue : Frotscher et al., 2007; Figure 25).

1. Détermination des progéniteurs neuronaux de la zone sous-ventriculaire (ZSV)
2. Mise en place d'un guide gliale pour la migration
3. Migration des neurones nouvellement formés ainsi que de progéniteurs
4. Formation de la deuxième zone de genèse
5. Formation de la structure particulière de la couche granulaire
6. Différenciation et maturation

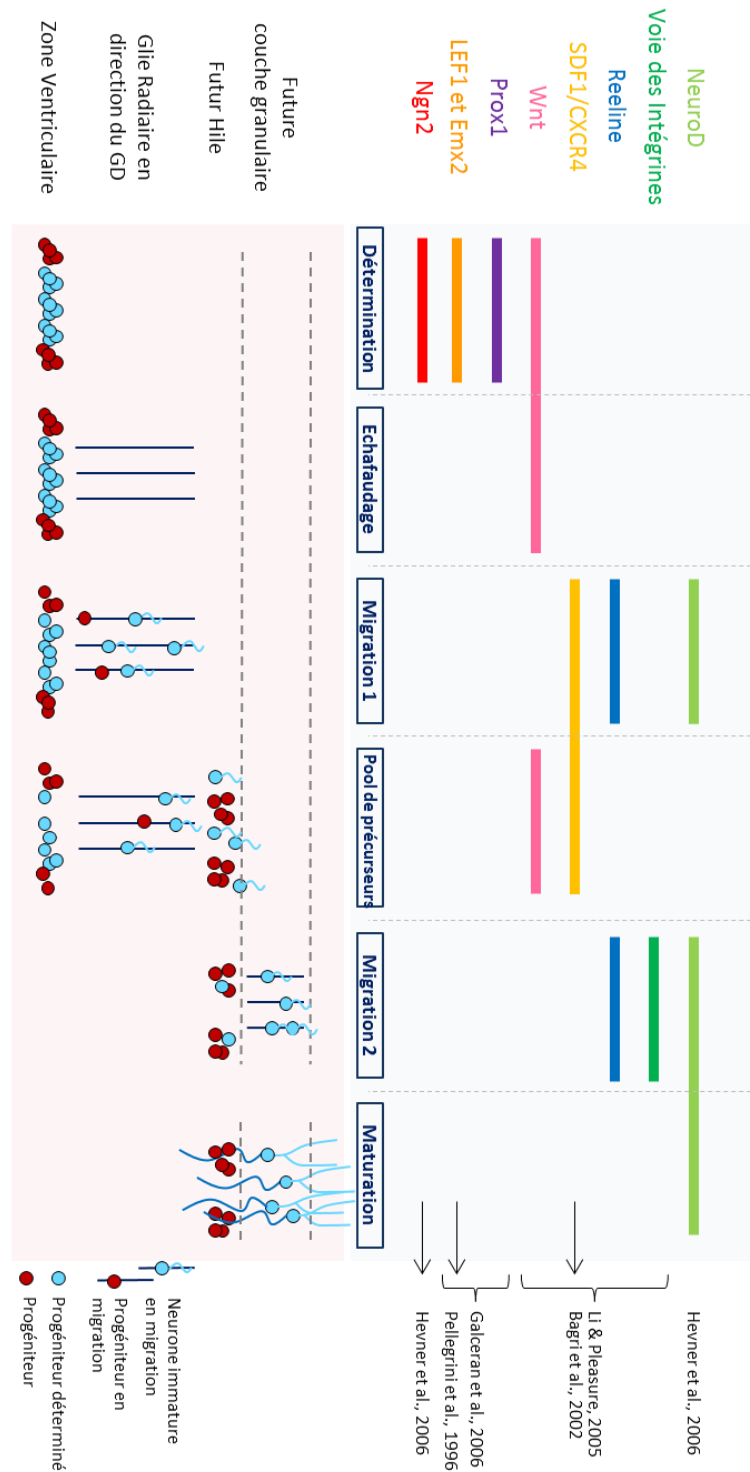


Figure 25 : Expression des molécules architectes de la couche granulaire en regard des différentes étapes conduisant à sa formation. La partie supérieure du schéma représente l'expression séquentielle des différents facteurs trophiques indispensables au bon déroulement du développement du GD tout au long des 6 étapes décrites par la suite. La partie inférieure illustre ces 6 étapes de façon simplifiée. (D'après Hevner, 2016; Li and Pleasure, 2005; Bagri et al., 2002; Galceran et al., 2000; Pellegrini et al., 1996).

En reprenant l'image de la construction du bâtiment, les pierres en granit utilisées pour les fondations ne sont pas fabriquées sur place car la carrière de granit est plus loin. De la même façon les premiers progéniteurs déterminés se trouvent dans la ZSV, loin de leur futur emplacement. Une fois ces pierres en granit construites, il faut les transporter jusqu'au chantier. C'est l'étape de migration neuronale avec élaboration de route de transit grâce à la glie radiaire. Or dans notre parallèle « travaux public » les ouvriers ont profité de ce transport pour charger les camions de bétonneuses et de béton afin de construire le reste du bâtiment sur place. Ici, il s'agit de la migration de cellules souches qui accompagnent les premiers neurones créés jusqu'au gyrus denté où elles vont produire le reste des cellules granulaires.

Passant par toutes ces étapes de création et maturation, les cellules s'organisent de façon séquentielle pour former la morphologie en 3 dimensions particulière du GD. Très bien étudiée chez le rat, il a été montré que la lame dorsale apparaît bien avant la ventrale, de la même façon la partie caudale se met en place avant la partie plus rostrale. Enfin les neurones les plus superficiels (proches de la couche moléculaire) sont formés plus tôt que les neurones plus profonds (Schlessinger et al., 1975).

1. Genèse des progéniteurs et migration

1.1 Détermination des progéniteurs neuronaux

Plaçons-nous dans la ZSV où se côtoient des milliers de progéniteurs neuronaux (Figures 24 et 25). Parmi ceux-là, certains vont devenir de futurs neurones glutamatergiques de CA3, d'autres de CA1 et d'autres encore du gyrus denté. Cette étape où certains progéniteurs acquièrent un devenir particulier est ce qu'on appelle la détermination des progéniteurs neuronaux. La détermination se fait par l'expression de différents facteurs de transcription et à la sécrétion d'autres facteurs de croissance, qui est peu à peu mis au jour par de nouvelles études scientifiques.

Ainsi, il y aurait une forte sécrétion de Wnt dans la zone de détermination du GD, et une forte expression de LEF1 (Galceran et al., 2000), de Emx2 (Pellegrini et al., 1996) et un gradient de Prox1, activant des cascades de signalisation au sein des cellules permettant l'entrée du progéniteur dans la voie de détermination des cellules granulaires (pour

revue : Li and Pleasure, 2007). Par exemple, chez des souris KO pour *Emx2*, les chercheurs ont constaté que la zone correspondant au site d'origine du GD dans la ZSV est drastiquement réduite (Pellegrini et al., 1996) traduisant que les progéniteurs n'ont pas pu être déterminés dans la voie du futur GD.

1.2 Mise en place d'un guide glial pour la migration

Une fois que les précurseurs sont déterminés, la seconde étape consiste à mettre en place le moyen de transport de ces nouveaux neurones jusqu'à la zone de développement du GD. Cette mise en place est encore peu décrite mais de ce que nous savons déjà, il y aurait le développement d'une glie radiaire pour guider ces cellules immatures jusqu'au lieu du futur GD. L'expression de Wnt serait également nécessaire pour cette étape (Zhou et al., 2004; pour revue : Li and Pleasure, 2007, 2005).

1.3 Migration de neurones nouvellement formés et de progéniteurs

Les neurones sont déterminés, la glie radiaire est établie, il faut encore que ces neurones quittent la ZSV, parviennent jusqu'à l'emplacement de la future couche granulaire en migrant le long de la glie radiaire. En cherchant le moteur de cette migration on a découvert qu'il y avait production d'une molécule chimio-attractante appelée SDF1 qui attire les cellules granulaires vers la zone finale. Cette molécule est reconnue par un récepteur localisé sur les neurones en migration (CXCR4) et est suffisante à elle seule pour les orienter dans la bonne direction. En effet, la diffusion ectopique de SDF1 conduit à elle seule la redirection des cellules granulaires vers le lieu de diffusion (Bagri et al., 2002). Lors de ce premier événement de genèse, c'est la partie la plus externe de la zone suprapyramidale de la couche granulaire qui se forme au cours de l'embryogenèse.

1.4 Formation de la deuxième zone de neurogénèse

Parallèlement à la migration des neuroblastes, des progéniteurs quittent également la ZSV et migrent jusqu'au futur hile où la deuxième zone de neurogénèse va se mettre en place. Ces neurones se regroupent en petites niches et produisent le reste des cellules granulaires. Cette migration serait sous le contrôle des mêmes mécanismes

que la migration des neurones déjà formés, c'est-à-dire par l'expression de Wnt et l'interaction chimio-attractante SDF1/CXCR4 (Li and Pleasure, 2005, 2007).

1.5 Formation de la couche granulaire

Depuis la deuxième zone de genèse, les neurones formés doivent migrer sur une courte distance pour former la couche granulaire très compacte spécifique au gyrus denté. Ce deuxième événement de neurogenèse se déroule en majorité après la naissance et représente 80% des CG générées (Altman and Bayer, 1990). Une nouvelle glie radiale se formerait pour guider les neurones immatures jusqu'à leur emplacement final au sein de la couche. Cette transition serait régulée par l'expression de la Reeline et l'activation de la voie de signalisation des intégrines qui sont des molécules d'adhésion cellulaire. A terme, ces mêmes niches de cellules progénitrices restent actives tout au long de la vie de l'animal produisant de nouveaux neurones tous les jours comme nous le verrons par la suite.

2. Intégration et maturation morpho-physiologique

Une fois le destin de ces neurones scellé, leur différenciation morphologique est enclenchée par l'expression de gènes de différenciation tels que NeuroD (Liu et al., 2000). La suppression de l'expression de ce gène n'entraîne cependant pas une absence complète de neurones différenciés témoignant que d'autres gènes doivent être impliqués dans ce processus (pour revue : Li and Pleasure, 2007).

Au cours de cette différenciation, ces neurones vont devoir également maturer d'un point de vue électrophysiologique. C'est-à-dire passer d'un état peu ramifié non-connecté à un état ramifié et intégré à un réseau (Figure 26). Les cellules immatures passent alors par une séquence de maturation commune aux neurones de l'hippocampe (Gozlan and Ben-ari, 2003; Espósito et al., 2005; Dieni et al., 2013). Les cellules immatures sont activées dans un premier temps par des courants toniques GABAergiques (Lübbers and Frotscher, 1988). Or à ces stades immatures la concentration en ions chlore de ces cellules est plus élevée rendant les courants GABAergiques dépolarisants (Ben-Ari, 2014; Cherubini et al., 1990; Tyzio et al., 2008). Ce courant tonique est produit par l'activation des récepteurs GABAergiques

extrasynaptiques des neurones ciblés par les axones de cellules GABAergiques. Cela produit un signal trophique qui initie une activité de réseau essentielle à la survie et la croissance des cellules granulaires en devenir. Par la suite les connexions glutamatergiques se développent et connectent les cellules en maturation. Cette étape se fait juste avant le passage du GABA dépolarisant au GABA hyperpolarisant par modification des concentrations intracellulaires en ion chlore. A l'issue de cette nouvelle étape, les cellules granulaires reçoivent alors des signaux excitateurs de la part des afférences glutamatergiques et des signaux inhibiteurs de la part des afférences GABAergiques. Enfin, il se produit un renforcement synaptique inhibiteur réduisant l'excitabilité des CG, effet qui est à la base de leur activation clairsemée (Dieni et al., 2013).

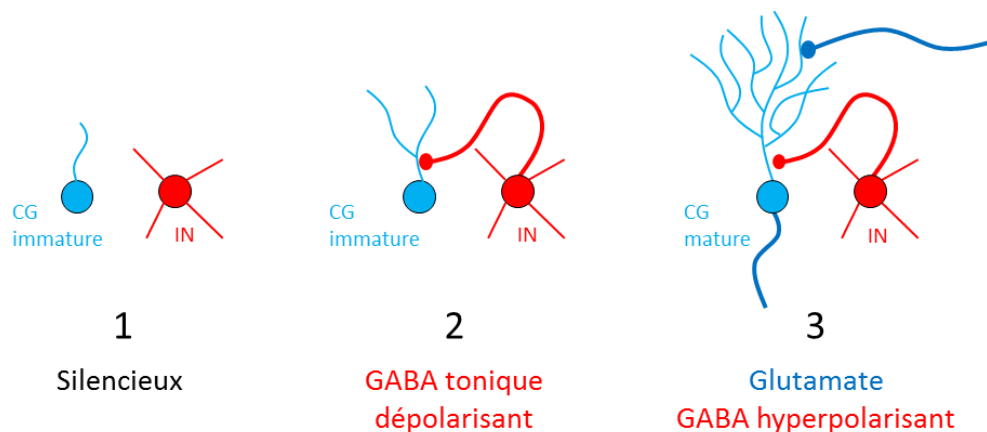


Figure 26 : Séquence d'activation électrophysiologique des cellules granulaires. Les nouveaux neurones formés passent d'une forme silencieuse et peu ramifiée (à gauche n°1) à une forme connectée et ramifiée (à droite n°3) en passant par une activation tonique par du GABA dépolarisant.

Une fois cette séquence d'activation neuronale terminée les différentes afférences connectant les CG apparaissent également séquentiellement. Les premières afférences se connectant sont celles en provenance du septum contactant les CG sur la partie proximale (Leranth and Hajszan, 2007). Puis nous avons les afférences provenant du cortex entorhinal, d'abord de la partie latérale connectant la partie la plus distale des dendrites des CG puis la partie de médiane du cortex entorhinal atteignant les CG au niveau de la partie médiane de la couche moléculaire. En dernier viennent les afférences de la voie commissurale/associative provenant des cellules moussues (Bayer, 1980).

B/ Neurogénèse adulte

« L'âge adulte est l'âge propre de l'adaptation. Mûrir, c'est trouver sa place dans le monde. »

Emmanuel Mounier – Traité du caractère 1946

La neurogénèse adulte est un événement très particulier puisqu'il est quasiment unique au sein de l'encéphale. Seuls le bulbe olfactif et le gyrus denté sont capables de produire de nouveaux neurones tout au long de la vie de l'individu. Cela permet de mettre en perspective un nouveau type de plasticité cérébrale. Car avec l'arrivée de nouveaux neurones, il y a mise en place de connexions tout à fait inédites au sein d'une même structure et avec d'autres structures. Les nouvelles CG formées projettent sur les cellules pyramidales de CA3 qui reçoivent alors une connexion totalement nouvelle.

Même si le GD se développe sans interruption depuis la création du système nerveux jusqu'à la mort de l'individu, on peut cependant distinguer trois périodes aux propriétés différentes : 1. Le développement embryonnaire. 2. Le stade juvénile. 3. L'âge adulte.

Nous venons d'étudier ce qui se passait au cours du développement embryonnaire. Mais avant de passer à la neurogénèse adulte, je tenais à souligner le fait qu'il existait probablement une période particulière au cours de l'adolescence. Cette idée est étayée par le fait que le GD, déjà bien formé à ce moment, ne posséderait pas encore toutes les caractéristiques du GD adulte. Beaucoup de neurones matures coexistent avec une grande quantité de neurones immatures. De plus, les propriétés de génèse ne sont pas encore celle d'un animal adulte. En produisant chez le rat 100 à 300% de plus de nouvelles CG pendant cette période juvénile par rapport à l'âge adulte, cette période se distingue de l'embryogénèse et de l'âge adulte (Cameron and Mckay, 2001; He and Crews, 2007).

L'intérêt de cette production massive de nouveaux neurones peut venir du fait que l'animal juvénile quittant la protection de la mère se retrouve confronté au monde extérieur avec tous ces stimuli. Ainsi par l'apprentissage et l'expérience, un plus grand nombre de neurones survit et s'intègre au réseau existant. Par cette étape intermédiaire spéciale entre le développement et l'âge adulte, le GD procéderait à une préparation au

monde adulte rempli de « challenges », « d'opportunités à saisir » ainsi que de « dangers à éviter » (Curlik et al., 2014).

1. Particularité et régulation

La première question est de savoir quand s'opère réellement la transition de la neurogénèse développemental à la neurogénèse adulte. Un article donne les premiers éléments de réponse à ce vaste sujet d'étude récent (Nicola et al., 2015). En étudiant toute une batterie de marqueurs de la neurogénèse adulte (Nestine, Sox2, BLBP, GFAP, Trb2, Doublecortine, NeuroD1 et Prox1), ils ont établi que ce basculement s'effectuerait chez la souris entre P7 et P14. Ils ont notamment observé que la Doublecortine, exprimée de façon diffuse avant P7, voyait son expression s'intensifier et dessiner précisément la zone périnucléaire des cellules après P7. De plus, si le marquage GFAP, spécifique des cellules astrocytaires, s'accumule entre P0 et P7 dans le hile et la zone sous-granulaire il ne montre une orientation radiale qu'après P7, attestant que la migration de nouveaux neurones peut s'effectuer. Ajoutant les résultats obtenus avec tous les autres marqueurs, les auteurs concluent que la niche neurogénique et les moyens de migration sont en place bien avant que la souris n'ait atteint le stade adulte, à partir de P7.

1.1 Maturation et intégration au réseau

Les nouveaux neurones formés chez l'adulte (nbGC pour new born granule cell) suivraient une séquence de maturation similaire à celle des neurones formés au cours du développement embryonnaire (Espósito et al., 2005; Laplagne et al., 2007). Cette maturation se découperait en 4 étapes de production et 1 étape de maturation électrophysiologique (Figure 27) :

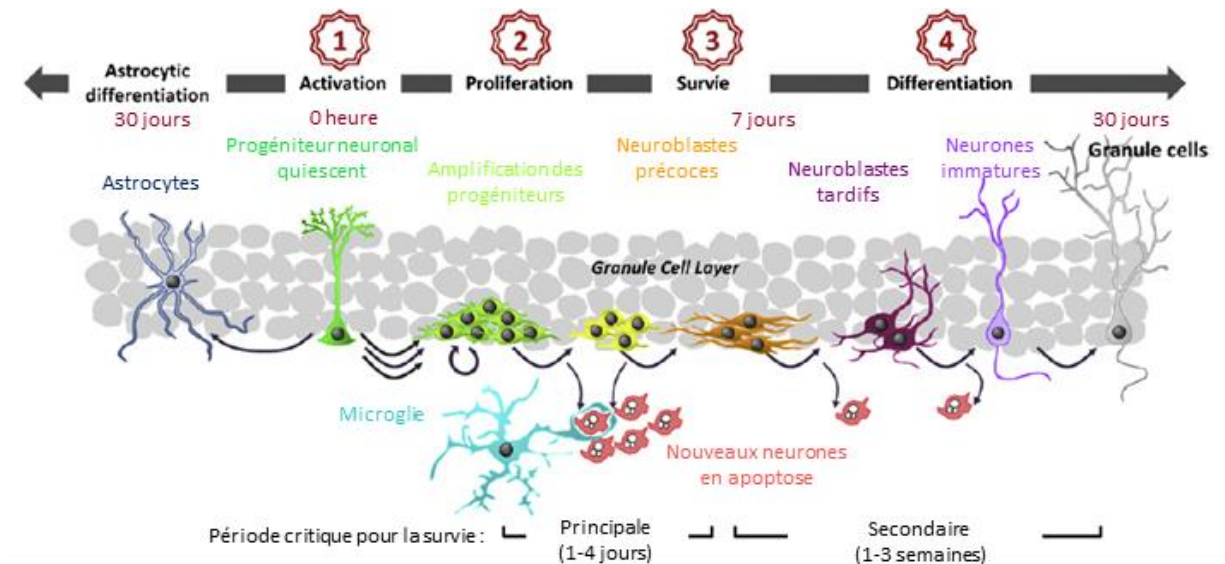


Figure 27 : Modèle de la neurogénèse adulte. Illustration des 4 étapes de la création de nouveaux neurones dans le GD adulte (1 : activation, 2 : prolifération, 3 : survie et 4 : différenciation) avec les moments critiques pour la survie neuronale. (D'après Encinas and Sierra, 2012).

1. L'engagement des progéniteurs : pour engager les progéniteurs dans la voie de différenciation et pour que les nbGC puissent maturer, ces cellules expriment de façon successive plusieurs marqueurs de maturité comme DCX, PSA-NCAM, Prox1 et Calrétinine d'une part, puis Calbindine et NeuN d'autre part (Brandt et al., 2003).

2. La prolifération des précurseurs : ces progéniteurs vont être massivement amplifiés par l'expression de facteurs de croissance.

3. La sélection des nouveaux neurones : une nouvelle sélection s'opère sur ces neuroblastes afin de choisir ceux qui vont arriver à maturation et s'intégrer au réseau préexistant et ceux qui vont être éliminés par apoptose. Cette sélection nécessiterait l'expression de Zif268 (gène d'expression précoce) dans les neurones destinés à survivre (Veyrac et al., 2013). Chez la souris, environ 30% des nbGC survivent après 4 semaines (Dayer et al., 2003; Kempermann et al., 2003).

4. La migration des nouveaux neurones et leur maturation morphologique : les précurseurs doivent migrer jusqu'à leur position finale. Or, comme la couche granulaire est très dense cette migration est très courte car elle s'arrête dans la partie interne de la couche granulaire du GD (Espósito et al., 2005; Kempermann et al., 2003). Peu de temps

après leur migration, les nbGC qui survivent produisent des axones qui parviennent jusqu'à CA3 et commencent à développer leur arborisation dendritique vers la couche moléculaire ainsi que les épines (Toni and Sultan, 2011; Zhao et al., 2006). C'est le début de la différenciation qui est poursuivie par l'arrivée des connexions afférentes et efférentes.

5. La maturation électrophysiologique : la dernière étape concerne la maturation électrophysiologique de ces nbGC ainsi que leur intégration fonctionnelle au réseau du GD. Dans un premier temps, les nbGC sont activées de façon tonique par du GABA ambiant avant d'être séquentiellement innervés par des afférences GABA puis glutamatergiques (Figure 28). De la même façon que pour les CG au cours de l'embryogenèse, ces nbGC maintiennent initialement une concentration en ion chlore élevée rendant l'effet du GABA dépolarisant (Espósito et al., 2005; Ge et al., 2006). A terme, la concentration intracellulaire en ion chlore diminue rendant le GABA hyperpolarisant. Enfin, la densité des épines dendritiques croît en quelques jours (Zhao et al., 2006).

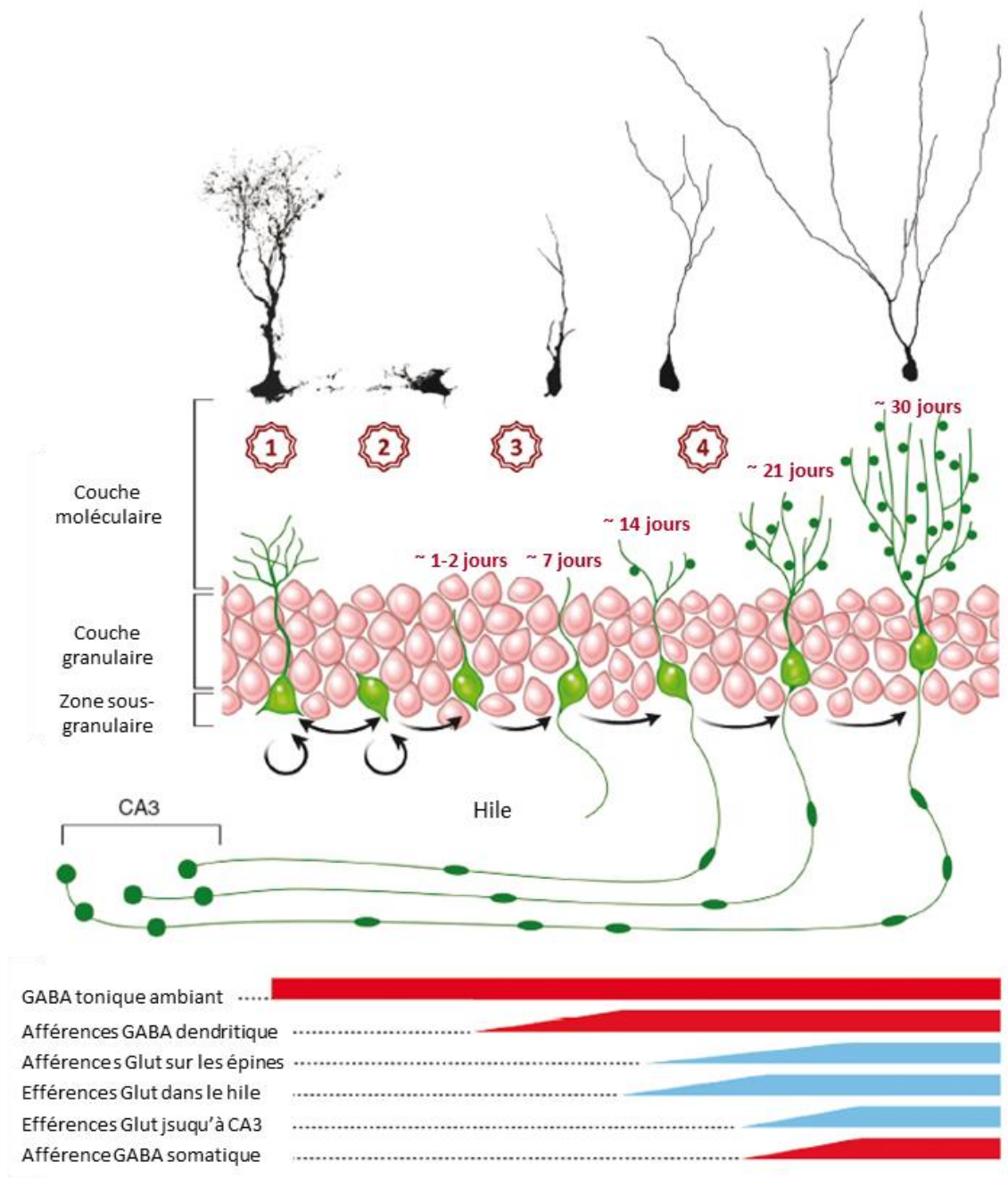


Figure 28 : Neurogénèse adulte et intégration au réseau. Suivi chronologique d'un neurone en maturation dans un GD adulte, photographié (en haut) ou schématisé (au milieu) avec la séquence d'apparition des afférences et efférences GABAergiques (GABA) et glutamatergiques (Glut), (en bas). (D'après Toni and Schinder, 2016).

A un mois, on ne peut plus distinguer morphologiquement les nbGC et les CG matures nés au cours du développement (Zhao et al., 2006) à moins de se placer à très fort grossissement au niveau des microstructures des épines qui continuent toujours à évoluer. Une fois totalement matures, ces CG montrent exactement les mêmes

propriétés électrophysiologiques que les CG nées pendant le stade embryonnaire (Jessberger and Kempermann, 2003; Laplagne et al., 2007; Toni and Schinder, 2016).

1.2 Propriétés électrophysiologiques particulières durant la période critique

On estime que chez le rat, les nouveaux neurones formés chaque mois représentent seulement 3 à 6% de la quantité totale de CG (Cameron and McKay, 2001; Tashiro et al., 2007). Malgré leur relative faible quantité, ce qui pourrait réellement faire la différence ce sont les propriétés particulières des neurones nouvellement formés pendant cette période critique d'immaturité. Des études récentes ont pu dénombrer 5 caractéristiques propres à ces neurones encore immatures qui pourraient expliquer leur rôle prépondérant lors de l'apprentissage (pour revue : Gros et al., 2016).

1. Déclenchement plus aisé de trains de potentiels d'action (PA) suite à une stimulation (Mongiat et al., 2009; Schmidt-Hieber et al., 2004).
2. Pendant 3 semaines après la création des nouveaux neurones, il y a des courants GABAergiques postsynaptiques dépolarisants ce qui favorise ainsi leur dépolarisation même lors d'une faible activité (Overstreet-Wadiche et al., 2005; Tozuka et al., 2005).
3. La présence de dendrites basaux transitoires qui s'étendent dans le hile contactant plus d'afférences excitatrices et qui disparaissent une fois le neurone mature (Ribak et al., 2004).
4. Une facilitation de la plasticité synaptique grâce à un seuil d'induction de la PLT (Potentialisation à long-terme) plus bas et une amplitude de PLT plus importante (Schmidt-Hieber et al., 2004; Wang et al., 2000).
5. Une plasticité également accrue par la forte modification du nombre et de la forme des épines dendritiques de ces neurones immatures (pour revue : Toni and Sultan, 2011).

En conclusion, on peut dire que les neurones immatures nouvellement formés sont plus excitables et moins spécifiques que les neurones matures (moins excitable mais plus spécifiques). Les neurones immatures permettraient donc de transmettre de façon fiable

les nouvelles stimulations entrantes alors que les GC matures seraient les garants des activités éparses (Pardi et al., 2015).

Mais, si ce sont les nouveaux neurones encore immatures qui jouent un rôle dans l'encodage de nouvelles informations, on peut se demander à quoi ils serviraient une fois arrivés à maturité. N'ayant pas encore de réponse à cette question, je peux me permettre de suggérer cependant que du fait de leur survie sur le long terme au sein du réseau du GD, ces neurones une fois matures auraient toujours un rôle fondamental.

2. Régulation multi-factorielle de cette neurogénèse

Comme pour toute neurogénèse, la production de nouveaux neurones se fait en surabondance et seule une petite proportion va survivre et s'intégrer au réseau existant. Sur cette constatation, il existerait donc deux façons d'impacter positivement ou négativement cette neurogénèse, soit en modifiant la quantité de neurones qui survit soit en jouant sur la quantité de neurones produits. Mais le phénomène majoritaire responsable de la variabilité de neurones intégrés au réseau serait surtout la modification de la quantité de neurones qui survit (Kempermann et al. 2006; Kempermann, Song, and Gage 2015). Cela serait expliqué par le fait que la prolifération neuronale serait non-spécifique tandis que la survie dépendrait des informations afférentes fonctionnelles reçues par l'hippocampe.

Parmi les régulations négatives, on a les stress prénataux (Lemaire et al., 2006) et l'âge (Encinas and Sierra, 2012; Lee et al., 2012). Ce qui régule positivement la neurogénèse adulte c'est par exemple l'exercice physique volontaire (Holmes et al., 2004; Koehl et al., 2008), les milieux enrichis (Brown et al., 2003; Monteiro et al., 2014), et l'apprentissage (Gould et al., 1999).

3. A quoi servent les neurones formés à l'âge adulte ?

Bien que leur population soit relativement peu importante, plusieurs études ont montré que leur contribution à l'apprentissage et à la mémorisation était loin d'être négligeable même si leur participation précise n'a pas encore été élucidée.

3.1 Corrélation entre neurogénèse adulte et performance mnésique

Il existe un lien de corrélation entre le niveau de neurogénèse et les performances mnésiques. En effet, certaines lignées de souris produisent naturellement plus de neurones à l'âge adulte que d'autres et cela est accompagné par de meilleures performances dans des apprentissages spatiaux (Kempermann and Gage, 2002b, 2002a). Par ailleurs, lorsque la neurogénèse est accrue par des facteurs extérieurs comme un milieu enrichi ou le libre accès à une roue d'entraînement, on observe également une nette amélioration des performances mnésiques (Monteiro et al., 2014).

A l'opposé, tous les facteurs réduisant la neurogénèse adulte (stress, inflammation centrale, âge, restrictions de sommeil, isolement social, etc...) conduisent à de moins bons résultats aux tests mnésiques dépendant de l'hippocampe (Drapeau et al., 2003; pour revue : Gros et al., 2015).

De la même façon, chez l'homme il a été montré que les individus ayant une faible capacité proliférative et de différenciation de leurs cellules progénitrices présentaient des dysfonctionnement dans la mémorisation (Coras et al., 2010).

3.2 Mais un rôle très compliqué à élucider

Malgré toutes ces corrélations, le mode de fonctionnement exact de ces nouveaux neurones reste encore très obscur. De plus, il nous faut impérativement distinguer les nouveaux neurones encore immatures de ceux qui sont arrivés à maturité car leurs propriétés électrophysiologiques respectives sont très différentes suggérant que ces deux populations doivent être impliquées à des niveaux différents dans les processus cognitifs.

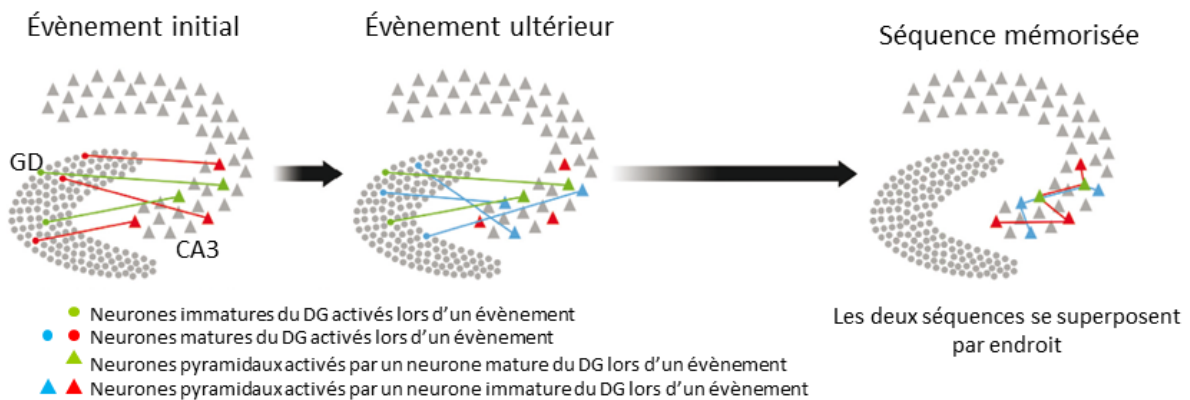
Plusieurs études ont montré qu'après irradiation focale des neurones générés chez l'adulte ou injection de lentivirus ciblant la prolifération neuronale, les rongeurs étaient moins performants dans la discrimination de contextes très similaires (Clelland et al., 2009; Dupret et al., 2008; Tronel et al., 2012). De la même façon, lorsque la neurogénèse adulte était supprimée par une construction génétique ou encore chimiquement détruite, on constate que les rongeurs perdaient leur capacité à discriminer des environnements similaires, ce qui se traduisait dans le réseau par une augmentation

drastique de la coactivation de cellules pyramidales de CA3 pour les deux contextes (Niibori et al., 2012).

Donc sans pouvoir expliquer le mode de fonctionnement exact de ces nouveaux neurones, on sait qu'ils seraient impliqués dans la séparation des représentations. De plus, on ne sait toujours pas différencier le rôle des neurones immatures de celui des neurones matures nés chez l'adulte.

Les premiers indices sur l'implication des CG immatures sont rapportées dans deux revues (pour revue : Aimone et al., 2006; Aimone et al., 2011).

1. Codage clairsemé de deux événements temporellement proches



2. Codage clairsemé de deux événements temporellement éloignés

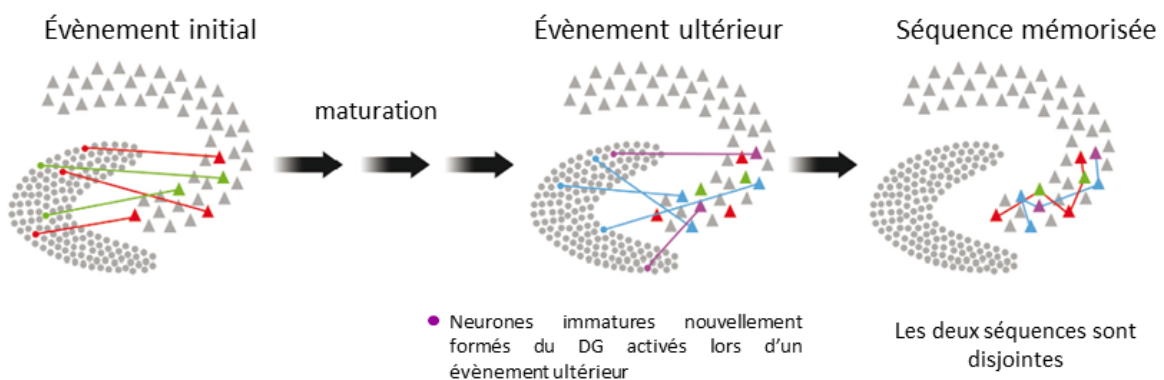


Figure 29: Modèle de l'encodage des informations temporelles par les nouveaux neurones formés immatures. En haut, deux événements proches dans le temps vont activer les mêmes neurones nouvellement formés immatures car ils sont plus excitables et moins spécifiques. Ce qui en résulte est une coactivation d'une partie des neurones pyramidaux de CA3. En bas, deux événements plus éloignés dans le temps ne vont pas activer les mêmes neurones immatures. En effet, les neurones immatures activés lors de l'évènement initial deviennent

matures et hautement spécifiques avant l'évènement ultérieur, donc ils ne vont pas s'activer pour l'évènement ultérieur. (D'après Aimone et al., 2006).

Dans ces revues, les auteurs suggèrent que par leur plus grande excitabilité, les neurones immatures peuvent être activés par deux événements proches dans le temps ce qui en résulterait par une superposition partielle des assemblées neuronales activées dans CA3. Ce résultat jouerait en défaveur du processus de séparation des représentations. Mais ils ajoutent que cet effet ne serait que transitoire, puisque au bout du compte les neurones immatures finissent par murer ou disparaître, ce qui produirait en une activation distincte de deux populations de neurones au sein de CA3 pour deux événements distants dans le temps (Figure 29).

L'importance de la maturation des CG nouvellement créées est aussi abordée dans une expérience de discrimination d'objets (Aimone et al., 2011) où les neurones immatures coderaient pour tous les objets sans préférence ce qui augmenterait la valeur des informations codées, puis avec le temps ces neurones immatures deviennent des neurones spécifiques et complèteraient les codages manquants.

En définitive, nous ne connaissons toujours pas le rôle exact des CG créées au cours de l'âge adulte qu'elles soient encore immatures et très excitables, ou qu'elles aient atteint la maturité et perdu leurs propriétés particulières. Pour cela il faudrait pouvoir suivre l'activité des neurones nouvellement formés au cours d'une tâche comportementale depuis un stade immature jusqu'à leur maturation complète afin de tenter d'élucider leurs rôles respectifs.

III. Les neurones pionniers de l'hippocampe

« Celui qui brise les règles pour créer quelque chose de positif et constructif devient pionnier et sortira forcément du lot. »

Anonyme

La notion de neurone pionnier est née avec trois travaux de l'équipe. Il s'agit de poser l'hypothèse que les premiers neurones formés au cours du développement, ceux

que l'on nomme « neurones pionniers », joueraient un rôle clé à la fois au cours de la mise en place des réseaux ainsi qu'à l'âge adulte. De la même façon que dans les fondations du bâtiment que j'ai décrit dans l'avant-propos, les premières pierres fabriquées seraient en granit indestructible afin de supporter l'ensemble de la structure.

A/ Les neurones hubs GABAergiques (Bonifazi et al., 2009)

Les PDGs (potentiels dépolarisant géants) constituent une séquence de synchronisation massive des neurones dans des circuits en développement qui survient pendant la première semaine de vie chez la souris (Ben-Ari et al., 1989). C'est un peu comme si vous établissiez le réseau électrique du bâtiment étage par étage et que vous deviez contrôler à un moment précis que tout est bien connecté en envoyant un courant pulsé et synchronisé dans toutes les installations et que vous vérifiez grâce à un témoin lumineux que tout est bien câblé. Sans ce test, le réseau électrique du bâtiment ne fonctionnera pas correctement.

Dans le réseau neuronal cette activité synchrone, indispensable au bon déroulement du développement, est principalement portée par la transmission synaptique GABAergique. Cette première étude a testé l'hypothèse de l'existence d'une population particulière de neurones qui aurait un rôle clé dans la genèse des PDGs. Grâce à la combinaison d'imagerie calcique biphotonique et d'enregistrements électrophysiologiques, il a été démontré pour la première fois l'existence des neurones hubs hyperconnectés ainsi que leur importance dans l'organisation des activités de réseau en particulier au cours du développement.

En revenant à notre câblage électrique, c'est comme si un tableau électrique connectait toutes les pièces d'un même étage et avait la capacité de modifier l'ensemble du courant pulsé et synchronisé (test fonctionnel) des installations électriques de leur étage par une simple stimulation du tableau. L'hyperconnection du tableau électrique traduit la notion de neurone hub hyperconnecté.

B/ Les neurones GABAergiques pionniers de CA3 (Picardo et al., 2011)

A l'issue de ces premiers résultats, les auteurs se sont ensuite demandé si ces neurones au rôle crucial pendant la première semaine de vie étaient des neurones pionniers, toujours présents dans le cerveau adulte. Comme l'étude précédente n'avait pas permis de mettre en évidence des marqueurs spécifiques de ces neurones, il fallait trouver un moyen de les repérer une fois la souris devenue adulte. Ils sont alors partis de l'observation expérimentale que ces neurones hub montraient une morphologie plus développée que d'autres neurones au même stade et que donc ils seraient plus vieux (Bonifazi et al., 2009), et de la règle théorique énonçant qu'un réseau sans échelle se construit en suivant la règle de l'attachement préférentiel (Barabasi and Albert, 1999), pour émettre l'hypothèse que les neurones hubs étaient des neurones générés tôt au cours du développement.

Dans notre parallèle électrique, c'est l'idée que ces tableaux électriques auraient été posés à chaque étage, avant l'arrivée des installations électriques de chaque pièce. Puis à chaque fois qu'il faut ajouter de nouveaux appareils électriques, ils sont d'abord raccordés au tableau principal correspondant à son étage, avant que leur installation dans la pièce ne soit finalisée. La question serait de découvrir si ces tableaux électriques sont conservés une fois le bâtiment achevé et s'ils ont encore une utilité particulière au cours de la durée de vie du bâtiment.

Pour tester cette hypothèse et répondre à leur question, ils ont dû trouver un moyen de retrouver les neurones hubs une fois l'animal devenu adulte et de les corréliser avec la date de naissance. Ils ont alors employé une lignée de souris transgéniques, mise au point par le laboratoire de Gordon Fishel permettant de marquer les neurones GABAergiques selon leur date de naissance. Marquant ainsi les neurones pionniers, ils ont pu démontrer que 70% de neurones pionniers sont hubs et que non seulement ils persistent une fois l'animal adulte, mais qu'ils font partie des neurones GABAergiques de projection extra-hippocampique.

C'est-à-dire que les tableaux électriques hyperconnectés sont bien installés avant le reste du réseau électrique, qu'ils sont toujours présents une fois le bâtiment achevé et qu'ils se distinguent toujours des installations électriques classiques de chaque pièce.

C/ Les neurones glutamatergiques pionniers de CA3 (Marissal et al., 2012)

Cette troisième étude est née dans le contexte des premières preuves d'existence des neurones GABAergiques hubs capables d'impacter l'occurrence des PDGs. Le projet consistait alors à déterminer si on pouvait retrouver un rôle similaire aux hubs GABAergiques au sein de la population glutamatergique.

En se plaçant à P7, ils ont observé que le réseau générait des activités épileptiformes en absence de transmission GABAergique rapide par blocage pharmacologique. Ils ont également constaté qu'ils pouvaient classer ces neurones dans deux catégories différentes entre ceux qui déchargent pendant la période d'initiation en amont de ces activités épileptiformes (EFN, early firing neurons) et ceux qui déchargent pendant le pic (LFN, late firing neurons). Par reconstruction et analyse morphométrique des EFN et LFN, ils ont découvert que les EFNs montraient alors une morphologie bien plus développée que les LFN, ils en ont déduit que ces EFNs se trouvaient à un stade de maturation plus avancé.

En cohérence avec ces premières observations et les travaux précédents, la question suivant était de savoir si les EFNs étaient des neurones pionniers. Grâce à une lignée de souris transgénique basée sur le même principe que précédemment de marquage des neurones en fonction de leur date de naissance, ils ont réussi à démontrer que les neurones glutamatergiques de CA3 générés tôt (EGN) forment une population d'EFN aux alentours de P7.

L'idée par la suite était de tester si ces EGNs/EFNs étaient pourvus d'un rôle fonctionnel particulier au cours de la genèse des activités épileptiformes. Se plaçant ainsi à un stade plus tardif (P15) où les réseaux sont plus matures, ils ont montré que seuls les EGNs avaient une plus forte probabilité d'induire des activités de réseau lorsqu'ils étaient stimulés. De plus, les EGNs possèdent à ces stades des propriétés morpho-physiologiques distinctes de celles des neurones générés plus tardivement (LGN), comme par exemple la propension à générer des potentiels d'action en bouffées.

A l'issue de ce dernier travail, il a été encore une fois démontré que la date de naissance d'un neurone n'a rien d'anodin comme en particulier pour les neurones pionniers

glutamatergiques de CA3 qui se voient investis de propriétés et d'un rôle très particulier à différents moments de la vie de l'animal.

La dernière question que l'on peut se poser et qui illustre dans quel état d'esprit nous étions lorsque nous avons débuté mon projet, était de savoir si cette particularité des neurones pionniers pourrait être étendue à d'autres structures du cerveau.

Conclusion :

Au cours de cette partie, nous sommes entrés progressivement dans le contexte de mon projet de thèse. Ainsi, en commençant par son organisation structurale et cytologique, nous avons vu que le gyrus denté de l'hippocampe travaille en étroite collaboration avec d'autres structures hippocampiques (CA3) et parahippocampiques (cortex entorhinal). Par la suite, des études plus fonctionnelles de l'échelle du réseau jusqu'à l'échelle du comportement ont permis de montrer que le gyrus denté exerce une forte inhibition sur les entrées de la voie perforante mettant en lumière la réalisation d'un codage clairsemé à l'origine du processus de « séparation des représentations » qui permet de réaliser une discrimination des événements.

Partant de ces premières constatations, il était ensuite important de retracer la mise en place développementale du gyrus denté tout en sachant que cette structure est soumise à une évolution permanente grâce à l'ajout de cellules tout au long de la vie de l'animal. Grâce au parallèle avec la construction du bâtiment il nous est plus aisé de comprendre en quoi certaines étapes sont critiques pour conserver l'intégrité fonctionnelle de la structure du gyrus denté. Ce que nous avons pu également noter c'est que les mêmes étapes sont mises en jeu lors de la création de nouveaux neurones à l'âge adulte.

Enfin, nous avons introduit la notion du rôle majeur des neurones générés tôt sur laquelle repose mon travail de thèse. En nous appuyant sur la mise en place du réseau électrique d'un bâtiment, nous avons eu un aperçu du rôle crucial des premiers neurones pionniers étudiés, dans la mise en place des réseaux neuronaux. Le travail qui suit est dans la continuité de l'idée que les neurones générés tôt se distinguent de par leurs propriétés électrophysiologiques et morphologiques au sein du GD au cours du développement et à l'âge adulte. L'ensemble de ces travaux fait l'objet d'une publication soumise à *Nature Communication*.

PARTIE 2

Matériel et méthodes



Partie 2

Matériel et méthodes

« On ne peut se passer d'une méthode pour se mettre en quête de la vérité des choses »

René Descartes – Discours de la méthode

Ce matériel et méthodes a pour but d'apporter des compléments d'explication à celui se trouvant dans l'article. Ainsi, tout en évitant les redondances, vous y trouverez des explications plus approfondies du modèle de souris transgénique ainsi que des illustrations permettant une meilleure compréhension du « genetic fate mapping » et des enregistrements électrophysiologiques.

I. Souris transgéniques et « fate mapping »

A/ Modèle animal

1. De la théorie

En filant la métaphore de l'avant-propos, nous avons dit que toutes les pierres composant cet édifice ne sont pas faites dans la même matière et qu'elles n'ont pas le même rôle. Vous avez en premier les parpaings classiques composant la vaste majorité du bâtiment. Mais au sein des fondations, vous avez des pierres plus rares taillées dans du granit et qui auraient pour rôle de supporter le poids de l'édifice entier. Ces pierres en granit ressemblent fortement aux parpaings classiques utilisés pour le reste de la construction.

Or, si nous cherchons à étudier la réaction de ces pierres fondatrices en granit une fois le bâtiment achevé il est nécessaire de trouver un moyen de les marquer pendant leur fabrication, en leur apposant une croix par exemple. Ainsi elles pourront être repérées une fois le bâtiment achevé pour effectuer des mesures par exemple.

Cette image permet d'introduire le modèle de souris transgénique que nous avons utilisé, puisque, pour faire très court, ces souris permettent de « marquer » les neurones excitateurs selon leur date de « fabrication » pour pouvoir les étudier une fois que l'individu a achevé son développement.

Pour comprendre ce mécanisme ingénieux, nous devons nous plonger dans la génétique, discipline à mes yeux aussi puissante que complexe. Ce modèle repose sur le principe d'un gène rapporteur et d'un gène activateur. Le gène activateur est composé de la séquence codante d'une recombinase, la Cre (cyclic recombinase). On pourrait comparer cette protéine à une clef qui va venir déverrouiller un cadenas, activant ainsi l'expression du gène rapporteur codant pour la protéine fluorescente td-tomato (placé sous le contrôle d'un promoteur ubiquitaire, Rosa). Le cadenas, composé par deux sites LoxP entourant un codon stop, est placé en amont du gène codant pour la protéine fluorescente pour empêcher sa transcription. Une fois que le codon est excisé par la Cre-recombinase, la transcription de la protéine fluorescente rouge est enclenchée.

En utilisant ce premier principe, il est possible de verrouiller l'expression de la protéine dans l'espace et le temps. Pour limiter l'expression de la td-tomato à un certain type de neurone, l'expression du gène activateur est placée sous le contrôle du promoteur d'un gène exprimé uniquement dans le type de neurone ciblé. Ici, ce sont les neurones glutamatergiques qui nous intéressaient, et le promoteur du gène exprimant la Neurogénine 2 (Ngn2) a été utilisé. Cette protéine est un facteur de transcription de type bHLH (pour *basic helix-loop-helix*) connu pour s'exprimer dans les progéniteurs neuronaux de la zone sous-ventriculaire (Ozen et al., 2007). C'est dans cette zone que sont générés les neurones glutamatergiques corticaux dont ceux du gyrus denté (voir *Contexte Scientifique* page 70). Ngn2 apparaît transitoirement dans les progéniteurs en début de différenciation neuronale. C'est un gène crucial pour l'engagement des cellules dans leur voie de différenciation (Galichet et al., 2008).

Enfin, afin de limiter l'expression de la td-tomato dans le temps, nous utilisons un système d'activation temporaire de la recombinase. Dans notre construction génétique la Cre exprimée est reliée à un récepteur à œstrogène (Eostrogen Receptor, ER) qui la rend inactive en l'absence de ligand. Pour être actif, le complexe Cre-ER nécessite la liaison du tamoxifène (Txf) au site ER. Ce produit est administré aux stades

embryonnaires et développementaux que nous désirons. Le tamoxifène a une durée de vie limitée à 24h suite à son administration, et l'expression de la td-tomato est déclenchée dans tous les neurones glutamatergiques qui sont en cours de création pendant les 24h suivantes. Une fois déclenchée dans les neurones ciblés, l'expression de la td-tomato se poursuivra tout au long de leur vie.

Pour résumer, la double construction génétique $Ngn2^{CreER+/-} \times Ai14:LoxP^{+/+}$ nous permet de faire exprimer une protéine fluorescente rouge dans les neurones que l'on souhaite selon leur date de genèse (Figure 30).

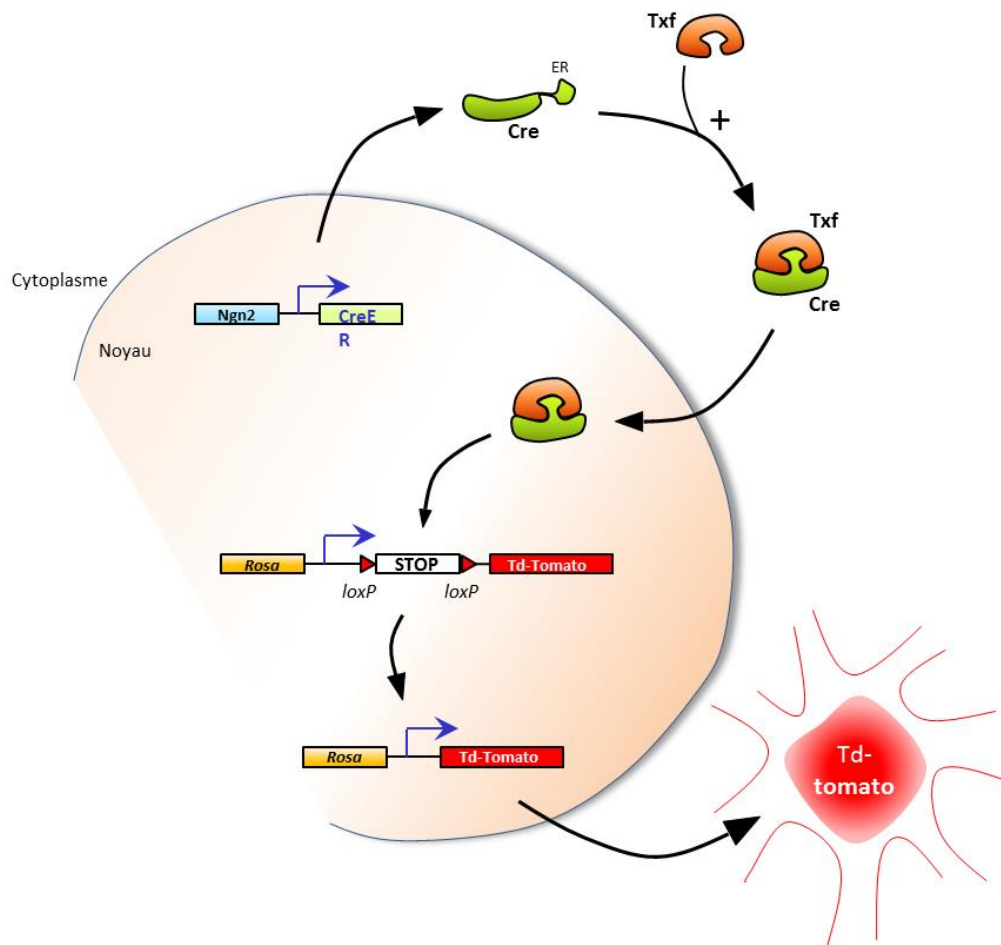


Figure 30 : Schéma du système d'induction du marquage des neurones glutamatergiques après administration de tamoxifène. La Cre-ER, exprimée sous la dépendance du promoteur de la Neurogénine 2 (*Ngn2*), sort du noyau où elle est couplée à la molécule de tamoxifène qui va contraindre la Cre à s'activer. Le couple Cre-Txf pénètre le noyau et excise le codon stop placé en amont du gène de la td-tomato. Il y a donc expression de la protéine fluorescente.

2. A la pratique

Pour générer les mâles reproducteurs possédant cette fameuse double construction, nous avons croisé des mâles *Ngn2*^{CreER} fournis par le laboratoire de David Anderson avec des femelles *Ai14:LoxP*^{+/+} (Figure 31) ce qui nous donne une descendance *Ngn2*^{CreER+/-}/*Ai14:LoxP*^{+/+}, homozygote pour la td-tomato (Ai14). Cette homozygotie, nous donne l'avantage d'avoir toute la descendance hétérozygote pour Ai14.



Figure 31 : Croisement initial pour la génération des mâles reproducteurs ayant le gène activateur et rapporteur. A l'issue de ce croisement, nous obtenons une descendance *Ngn2*^{CreER+/-}/*Ai14:LoxP*^{+/+} rassemblant les gènes activateurs et rapporteurs dont nous ne gardons que les mâles.

De ce premier croisement nous ne gardons que les mâles que nous croisons à leur tour à des femelles Swiss sauvages (C.E Janvier, France) pour obtenir une descendance *Ngn2*^{CreER+/-}/*Ai14:LoxP*^{+/+} pour les expériences d'électrophysiologie et d'anatomie (Figure 32). La date du bouchon vaginal compte pour le stade embryonnaire 0.5 (E 0.5). La solution de tamoxifène (2 mg pour 30 g de poids de souris, solution mère à 10mg/mL dans de l'huile de maïs) est ensuite administrée aux femelles Swiss gestantes par gavage.

La date de gavage est déterminante selon le type d'expérience qu'il y avait à réaliser. Ainsi, pour suivre la fenêtre de neurogénèse des cellules glutamatergiques du GD, nous avons procédé à des administrations de tamoxifène à différents stades avant (gavage de la mère) et après la naissance (injection intrapéritonéale).

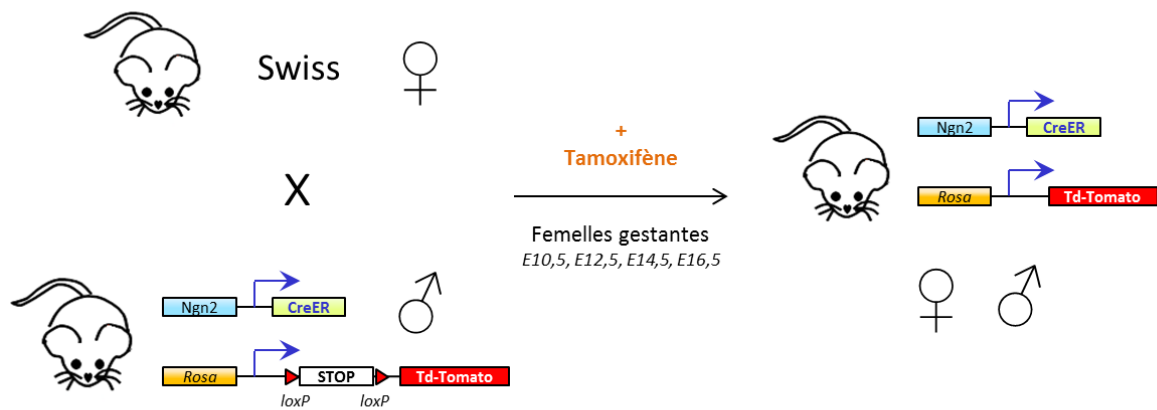


Figure 32 : Croisement de souris permettant le marquage des neurones glutamatergiques selon leur date de naissance.

Quant à l'électrophysiologie, comme nous voulions étudier les tous premiers neurones glutamatergiques formés il fallait trouver la date à laquelle nous devons administrer le tamoxifène pour les marquer. Aux vues des précédentes études menées par Altman et Bayer (Altman and Bayer, 1990) et des résultats préliminaires du comptage, nous avons choisi le stade embryonnaire 12.5 (E12.5) pour le gavage car cela correspond au stade le plus précoce de la formation du gyrus denté.

Le petit plus : pour plus de commodité, nous appellerons les souris utilisées lors de nos expériences : *Ngn2^{CreER+/-}/Ai14:LoxP^{+/-}* au lieu de *Ngn2^{CreER+/-}/Ai14:LoxP^{+/-}*.

B/ Comptage de neurones pour le fate mapping

Ce que j'entends par « comptage de neurones » ce n'est rien moins que le comptage tranche par tranche des différents types de neurones glutamatergiques nés à différents stades du développement de la souris. Le but étant de déterminer la fenêtre de genèse la plus précise possible de ces différents neurones. C'est ce qu'on appelle le « fate mapping » en anglais.

C'est un peu comme si nous fabriquons une vingtaine de bâtiments identiques dont la durée de construction est de 20 jours pour un bâtiment. Puis, pendant chacune des

constructions, nous marquons toutes les pierres fabriquées pendant une journée précise pour chaque bâtiment sachant que la fabrication n'est pas uniforme au cours du temps.

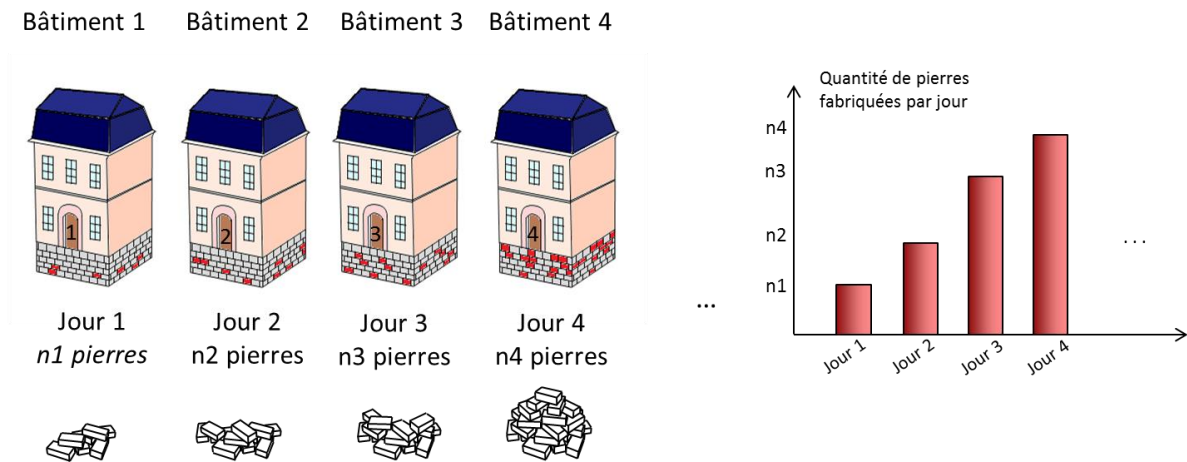


Figure 33 : Marquage des pierres en fonction de leur jour de fabrication dans les 4 premiers bâtiments. Toutes les pierres fabriquées le premier jour sont marquées dans le bâtiment 1, toutes les pierres fabriquées le deuxième jour sont marquées dans le bâtiment 2, 3^{ème} jour dans le bâtiment 3, 4^{ème} jour dans le bâtiment 4, etc... A droite, on obtient alors la quantité de pierres qu'il faut produire par jour pour construire un bâtiment entier.

Une fois tous les bâtiments achevés, on peut compter le nombre de pierres marquées dans chaque bâtiment, ce qui nous donne en croisant toutes les données la quantité de pierres que l'on doit fabriquer chaque jour pour construire ce bâtiment en entier (Figure 33).

Les gavages réalisés au cours des périodes embryonnaires ont été faits à E10.5, E12.5, E14.5 ou E16.5. Les injections en intrapéritonéales (IP) de la même solution de tamoxifène ont été réalisées à P0 (immédiatement après la naissance), P1 (1 jour post-natal), P3 ou P7 (Figure 34).

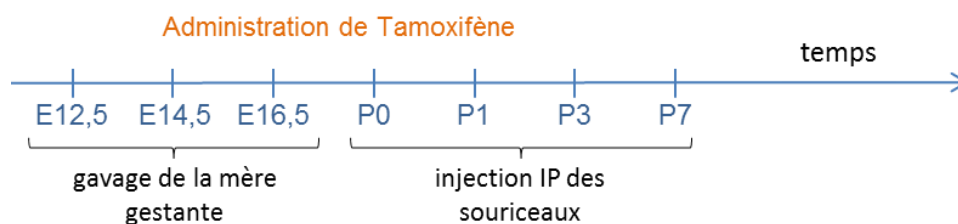


Figure 34 : Synthèse des différentes dates et du mode d'administration du tamoxifène. Administration par gavage des femelles gestantes ou par injection IP des souriceaux.

Une fois adultes, le cerveau de ces souris est prélevé et découpé soit en coupes horizontales soit en coupes coronales à une épaisseur de 70 μm (E10.5, n=2 cerveaux ; E12.5, n=5 cerveaux ; E14.5, n=5 cerveaux ; E16.5, n=4 cerveaux ; P0, n=4 cerveaux ; P1, n=5 cerveaux ; P3, n=5 cerveaux ; P7, n=4 cerveaux). Ces coupes de cerveaux sont montées dans une solution contenant du Dapi (intercalant de l'ADN rendant tous les noyaux de cellules visibles en UV), ce qui facilite le repérage des différentes couches du gyrus denté.

Nous comptons alors le nombre total par cerveau de CG, de CGS et de CM pour lesquelles nous avons établi une moyenne sur le nombre total de cerveaux observés.

En combinant tous les âges, nous obtenons ainsi la fenêtre de genèse de ces différents types cellulaires du gyrus denté.

Le petit plus : pour chaque date de gavage, nous avons fait en sorte de choisir des cerveaux provenant de souris de portée différente et de père différent.

II. Enregistrements électrophysiologiques

Toutes les souris employées au cours de ces expériences sont des *Ngn2CreAi14* dont la mère a été gavée au tamoxifène à E12.5. La grande majorité des enregistrements a été réalisée sur des souris adultes (P50). Cela dit, pour des besoins de comparaison de résultats, j'ai également enregistré des neurones chez les même souris *Ngn2CreAi14* mais âgées de 15 jours post-natal (P15), ainsi qu'à P11 et P12 au moment de la coupe du cerveau. On dit alors que ces souris sont à un stade juvénile.

A/ Préparation des tranches maintenues en survie

La caractérisation des propriétés électrophysiologiques des cellules marquées provenant des souris *Ngn2CreAi14* nécessite de respecter deux critères. Le premier est de maintenir les tranches de cerveau en survie pour avoir une activité neuronale. Le

deuxième est d'avoir une orientation et une épaisseur appropriée de la découpe afin de conserver les afférences de ces neurones.

Une première étape, concernant les souris adultes uniquement, permet à la fois d'augmenter la survie ainsi que la qualité des tranches par la perfusion intracardiaque de la souris (après anesthésie) avec une solution de Choline glacée et oxygénée. Cela permet d'évacuer le sang qui absorbe dans les longueurs d'ondes du rouge rendant la fluorescence émise par la td-tomato plus nette. De plus, cette perfusion permet d'augmenter la survie des cellules situées au centre du cerveau adulte pendant le temps de la coupe.

Le petit plus : la solution de Choline permet de remplacer les ions sodiques par de la choline, bloquant ainsi le déclenchement des potentiels d'action dépendant de ces ions. Cela a pour effet de réduire l'hyperexcitabilité des neurones et les réactions apoptotiques résultant de la coupe, et donc d'augmenter la survie des cellules.

Après extraction du cerveau, des coupes horizontales de 350 μm sont réalisées à l'aide d'un vibratome Leica. Les tranches sont ensuite placées au repos dans un bain de liquide cérébro-spinal artificiel (LCSa) oxygéné pendant au moins une heure.

Le petit plus : cela permet aux tissus de se stabiliser et aux activités neuronales de reprendre.

B/ Paramètres d'enregistrement et protocoles de stimulation

Un total de 137 cellules au sein du gyrus denté (n=46 cerveaux différents) provenant de souris juvéniles (CG, n=10 ; CGS, n=21) ou de souris adultes (CG, n=81 ; CGS, n=25) a été enregistré.

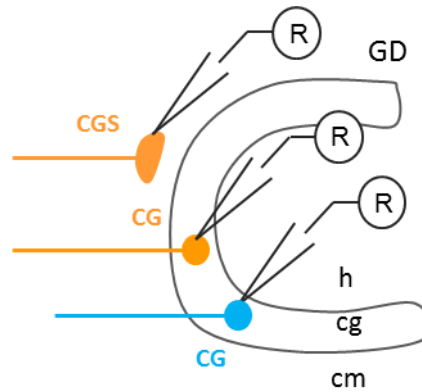


Figure 35 : Illustration des neurones enregistrés en patch-clamp. En orange ce sont les CG ou CGS pionnières E12,5. En bleu ce sont les CG random (enregistrés au hasard).

Ces neurones ont été enregistrés en configuration cellule entière et maintenus en courant imposé grâce à un amplificateur (Figure 35).

Le petit plus : dans la pipette d'enregistrement nous avons ajouté de la neurobiotine. Il s'agit d'un traceur neuronal qui permet de retrouver le neurone qui a été enregistré avec une révélation à la streptavidine (voir plus loin). L'osmolarité et le pH sont importants pour garder l'intégrité de la cellule et doivent être maintenus respectivement à 265-275 mOsm et pH 7.3.

En mode courant imposé, nous avons pu acquérir les différentes mesures dont nous avons besoin, dont le potentiel au repos de la membrane (V_{rest}), l'amplitude des potentiels d'action (PA, mV), le seuil de décharge des PAs (V_{seuil} , mV), la cinétique du PA (durée (ms) à $\frac{1}{2}$ de l'amplitude), et l'after-hyperpolarisation (AHP, mV). Nous avons également calculé la résistance membranaire (R_m) de la capacitance membranaire (C_m) en *offline* grâce au logiciel Clampfit suite à des injections de courants négatifs.

Des injections incrémentées de courant d'une durée de 4 secondes ont permis d'obtenir le profil de décharge juste après la rhéobase et à plus forte intensité de courant, le taux maximum de décharge (nombre de PAs en fonction de la durée du créneau de courant), le gain (la pente de la régression linéaire de la courbe représentant le nombre de PAs en fonction de l'injection de courant) et l'accommodation (différence d'amplitude entre le premier PA et le dernier PA d'un créneau de courant) (Figure 36).

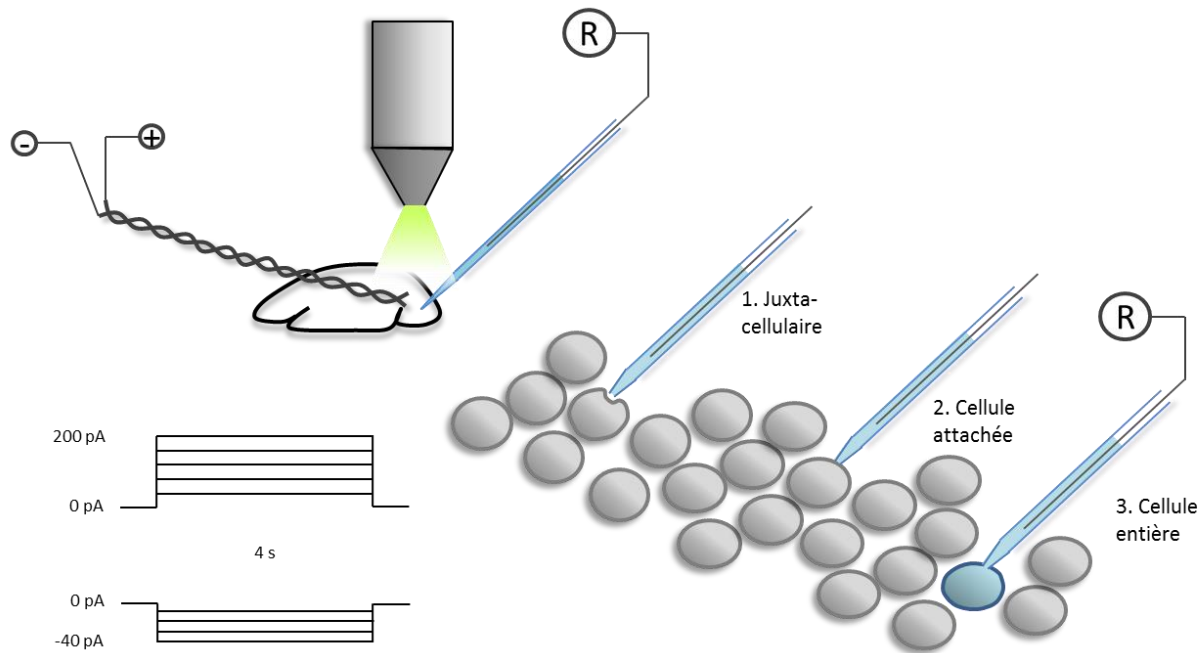


Figure 36 : Illustration de la méthode de patch-clamp et protocole de stimulation. En haut à gauche, schéma de l'organisation de la chambre de patch avec l'électrode de stimulation des fibres (à gauche), l'électrode d'enregistrement (à droite) et au-dessus l'objectif captant la fluorescence émise par les tranches. A droite, description des trois étapes d'approche d'un neurone pour se placer en configuration cellule entière. En bas à gauche, protocole de stimulation avec les crêtes dépolarisants et hyperpolarisants.

Au cours des expériences que nous avons pu faire pour compléter cette étude, nous avons également élaboré un protocole de stimulation de la voie perforante grâce à une électrode de stimulation placée dans la couche moléculaire externe du GD. Cette électrode est obtenue à partir de deux fils conducteurs (nickel-chrome) recouverts d'un isolant enroulés l'un autour de l'autre dont la partie terminale est dépourvu de cet isolant (brûlé par la flamme d'un briquet). Ces fils conduisent un courant positif et négatif créé par un boîtier de stimulation (Digitimer Ltd.) jusqu'à la partie terminale où une différence de potentiel se crée excitant ainsi les fibres placées entre les deux fils. La réponse à cette stimulation est enregistrée chez les CG et les CGS en patch-clamp en configuration cellule entière et mode courant imposé.

Nous avons également réalisé des expériences d'enregistrement de paires de cellules en nous plaçant dans les mêmes conditions que précédemment pour les solutions et la découpe des tranches (Figure 37).

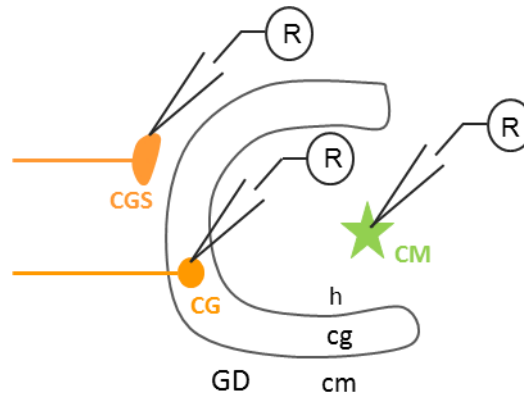


Figure 37 : Enregistrement en patch-clamp de paires de neurones pionniers. Les neurones sont maintenus en courant imposé, en configuration cellules entière. Des couples CG/CM et CGS/CM pionnières ont été ciblés. CG, cellules granulaires ; CGS, cellules granulaire semilunaires ; CM, cellules moussues.

III. Reconstruction morphologique des neurones enregistrés

A/ Traitement des tranches : fixation, congélation et révélation

Un total de 53 neurones remplis à la neurobiotine ont pu être utilisés pour les études morphologiques, à l'issue des enregistrements électrophysiologiques chez des souris adultes (14 pour les souris juvéniles)

Le petit plus : la quantité de neurones observables *posthoc* est très réduite comparée au nombre total de neurones enregistrés car il est très difficile de conserver l'intégrité des cellules après plus de 45 minutes d'expérience et après avoir retiré la micropipette sans détruire la membrane cellulaire.

A l'issue des enregistrements électrophysiologiques, les tranches subissent une révélation histochimique de la neurobiotine grâce à une solution de streptavidine. Cette protéine lie spécifiquement la neurobiotine et est couplée à un fluorophore (Alexa 488 nm). Les tranches sont alors montées entre lame et lamelle dans un liquide de montage contenant du Dapi. Les cellules révélées sont alors visibles avec un microscope à épifluorescence.

B/ Microscopie : prise des images, reconstruction et analyse morphométrique

Toutes les images prises à des fins de reconstruction ont été réalisées à l'aide d'un microscope confocal Leica (TCS SP5 X). Les cellules sont tout d'abord visualisées à faible grossissement (10x) pour avoir un aperçu global. Puis, afin de reconstruire dans leur totalité la morphologie des cellules enregistrées, des piles d'images de 1024/1024 pixels/pouces sont acquises avec un pas en Z de 0.4 μm à plus fort grossissement (40x ou 63x, objectif à immersion), en mode mosaïque.

Ces ensembles de sections optiques sont collectés à l'aide d'un logiciel de reconstruction appelé Neurolucida (MicroBrightfield). Nous créons ainsi une reconstruction digitale de la morphologie du neurone en 3D que nous analysons par la suite grâce au logiciel Neurolucida Explorer. Les variables morphométriques que nous avons prises en compte sont : la longueur totale de l'arborisation dendritique et axonique, le nombre total de nœuds dendritiques et axoniques, le nombre total de terminaisons dendritiques et axoniques, le périmètre du corps cellulaire, l'aire totale occupée par le neurone ainsi que l'écartement angulaire des dendrites.

IV. Statistiques et analyse en cluster

A/ Tests statistiques

Trois tests statistiques ont été réalisés sur l'ensemble des données avec le logiciel Prism 5.00 (GraphPad), le test de Mann et Whitney, le t-test et le test de Kruskal et Wallis. Le premier, testant l'hypothèse H_0 de l'égalité des moyennes, est un test non-paramétrique que nous avons utilisé lorsque nous devons comparer deux échantillons indépendants de petite taille. Le t-test est un test paramétrique faisant partie des tests statistiques les plus puissants. Nous l'avons utilisé pour comparer deux échantillons indépendants et de grande taille comportant des données ayant une répartition Gaussienne. Le troisième et dernier test nous a permis de comparer trois échantillons en même temps en testant l'hypothèse nulle de l'égalité des moyennes des trois.

B/ Analyse en cluster

Le terme d'« analyse en cluster » fait référence à un ensemble de méthodes statistiques exploratoires multivariées qui regroupent des objets (ou des cas) d'un ensemble de données en fonction de leur degré de similarité. Tous les cas sont d'abord tracés dans un espace multidimensionnel défini par toutes les variables de mesure ; dans cette étude nous avons inclus 11 variables physiologiques qui vont de la résistance membranaire au gain, en passant par la capacitance membranaire, le potentiel de la membrane au repos, le seuil de déclenchement des PAs, la durée des PAs, l'amplitude des PAs, l'AHP, l'accommodation, le pourcentage d'adaptation ainsi que le taux maximum de décharge. Une certaine mesure de proximité est choisie, appelée distance, et les groupes sont finalement formés par les cas qui répondent aux critères de la méthode de classification sélectionnée.

Dans notre cas, l'analyse en cluster est réalisée à partir de distances Euclidiennes employant la méthode de Ward (logiciel Statistica) à partir des CG et CGS (n=107) enregistrées chez des souris adultes où ces 11 paramètres ont pu être mesurés.

Selon la méthode de Ward, les cas sont assignés à des clusters pour faire en sorte que la variance (la somme des carrés des écarts à la moyenne) au sein de chaque groupe soit réduite au minimum.

V. Obtention des images des contacts entre les cellules moussues (CM) et les fibres moussues

Afin de révéler les contacts existant entre les fibres moussues et les dendrites des CM, nous avons réalisé des images en z-stack (séquence d'image dans l'épaisseur de la tranche) grâce à un microscope confocal Zeiss sur des tranches de cerveaux (en horizontal et en coronal) de souris *Ngn2CreAi14* dont l'administration de tamoxifène a été réalisée à E12,5.

Les axones des CG et CGS générées tôt sont identifiées par l'expression de la td-tomato dans les fibres comportant des varicosités, des terminaisons moussues et des filopodes

qui en sortent. Les CM générées tôt sont identifiées par l'expression de la td-tomato révélant leur localisation dans le hile et leurs excroissances épineuses dendritiques.

En observant image par image dans la profondeur de la tranche, nous avons relevé un grand nombre de contacts entre les fibres moussues des neurones générés tôt avec les dendrites des CM générées tôt (n=7 tranches de 5 cerveaux différents).

VI. Protocole de l'expérience c-fos

Nous avons pris deux groupes de souris *Ngn2CreAi14* (Figure 38). Pour le premier groupe (n=6) nous avons placé deux roues d'exercice libre par cage de 3 souris (groupe 1). Pour le deuxième groupe (n=3) nous avons placé 3 souris en conditions contrôle avec des cages standards (groupe 2). Les souris du premier groupe ont eu un accès libre aux roues pendant 4 jours sans interruption. Après perfusion, les cerveaux sont prélevés et découpés en coupe de 70 μ m d'épaisseur, sur lesquelles un marquage c-fos a été réalisé comme suit.

Les tranches sont incubées toute une nuit avec agitation dans une solution de PBS-Triton 0,3% (phosphate buffered saline) contenant l'anticorps primaire (rabbit anti-cfos) au dilué 1/600 et du NDS (normal donkey serum) dilué à 5%. Après 3 rinçage de 15 minutes avec du PBST, les tranches sont incubées pendant une heure dans une solution de PBST contenant l'anticorps secondaire (donkey anti-rabbit) dilué au 1/500. Après un rinçage avec du PBST, deux autres rinçages de 15 minutes avec du PBS sont réalisés avant que les tranches ne soient montées entre lames et lamelles dans un liquide de montage contenant du Dapi.

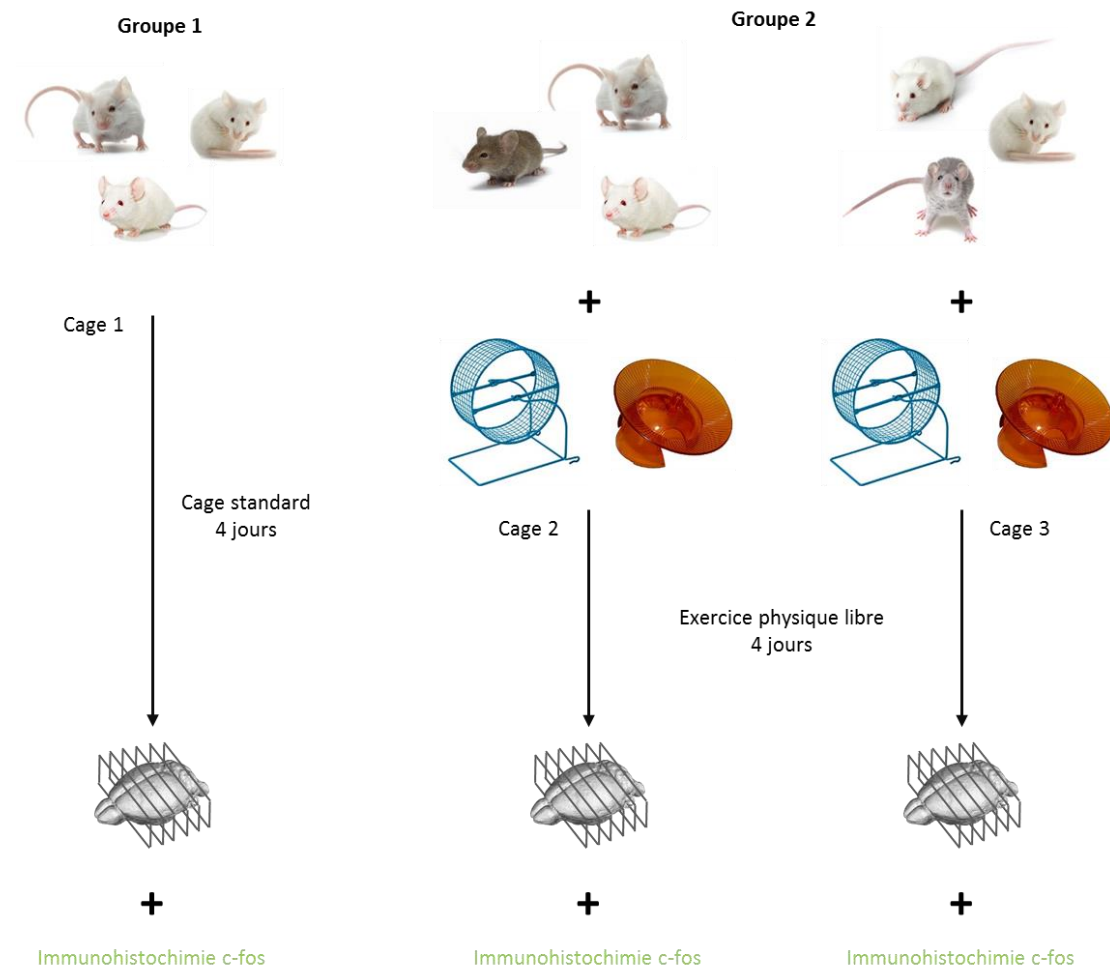
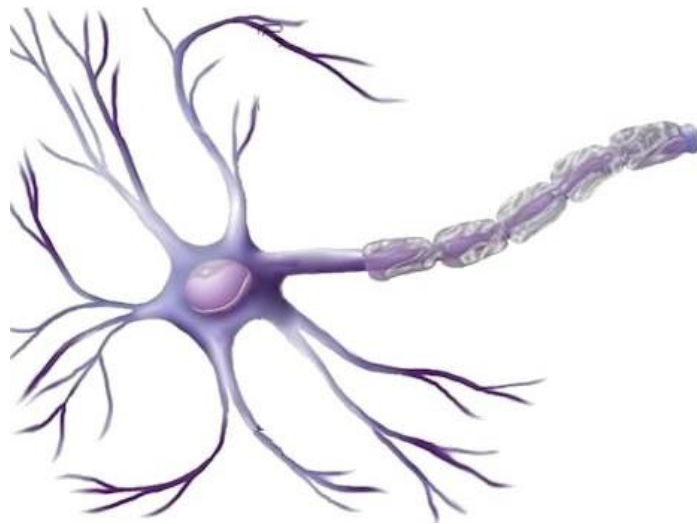


Figure 38 : Protocole expérimental de l'expérience c-fos. Groupe 1, trois souris dans des conditions standard. Groupe 2, six souris (trois par cage) en condition d'exercice physique libre pendant 4 jours.

A l'aide d'un microscope à épifluorescence Zeiss, nous avons regardé tranche par tranche l'existence de co-marquage c-fos/Td-tomato.

PARTIE 3

Résultats



Partie 3

Résultats

« La science, dans ses résultats, est plus magique que la magie : c'est une magie à preuves ! »

Jean-Marie Adiaffi – La Carte d'identité

I. Les résultats de l'article

A/ Des neurones pionniers

A l'issue des premiers travaux sur les neurones pionniers, la question que nous nous sommes posés est : peut-on « retourner » l'hypothèse des neurones générés tôt ? C'est-à-dire peut-on dire qu'un neurone possédant un rôle important au sein d'un réseau neuronal est un neurone pionnier ? C'est pour répondre à cette première problématique que nous nous sommes intéressés pour la première fois aux cellules granulaires semilunaires (CGS).

En 2010, Larimer et Strowbridge font l'hypothèse que les CGS seraient à l'origine du barrage inhibiteur à la stimulation de la voie perforante du GD (Larimer and Strowbridge, 2010). Ce rôle central au sein du réseau du GD ainsi que la rareté constatée de cette population neuronale, ont permis de faire l'hypothèse que les CGS étaient des neurones pionniers.

Nous avons utilisé pour tester cette hypothèse les souris transgéniques *Ngn2CreAi14* (voir *Matériel et Méthodes* page 93) qui permettent de marquer les neurones glutamatergiques en fonction de leur date de genèse. Grâce à différentes dates d'administration du tamoxifène, nous avons pu déterminer le profil de neurogenèse développementale pour les CG et les CGS.

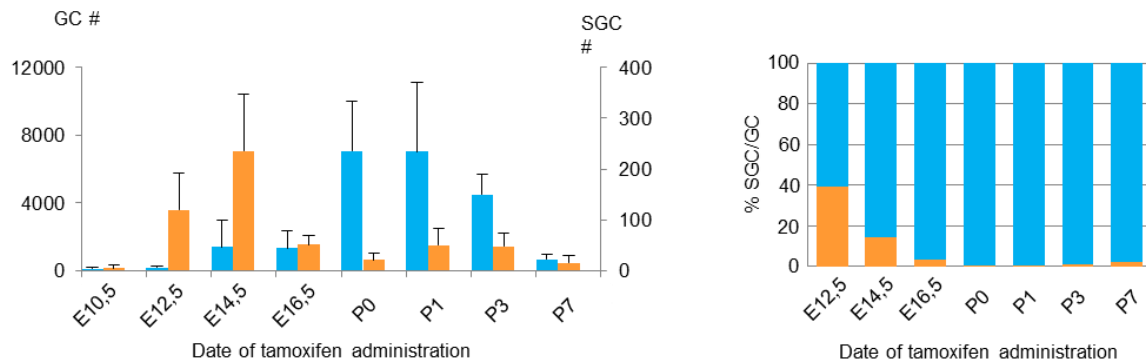


Figure 39 : Fenêtre de génèse des CG et des CGS. A gauche, comptage des CG (en bleu) et des CGS (en orange) en fonction de la date d'administration du tamoxifène. A droite, proportion de CG par rapport aux CGS par date d'administration du tamoxifène.

Nous avons alors montré que le pic de neurogénèse des CGS se situait entre E12,5 et E14,5 tandis que celui des CG se situait en période post-natale, entre P0 et P1. De plus, nous avons confirmé que les CGS étaient une population neuronale rare (population estimée à 3% de la totalité des cellules glutamatergiques du gyrus denté, hors hile), et que malgré cette faible proportion, elle représentait près de 40% des neurones glutamatergiques générés à E14,5.

B/ Caractéristiques morphologiques des CG et CGS du GD

A l'image des neurones GABAergiques pionniers qui se caractérisent par des propriétés morphométriques particulières (Picardo et al., 2011), nous nous sommes demandé si les CGS pionnières se distinguaient de par leur morphologie des CG non pionnières.

Nous avons montré qu'il y a des différences significatives entre les CGS (E12,5) et les CG random, comme plus de dendrites primaires pour les CGS (3 à 5 contre 1 à 2), un écartement dendritique plus important pour les CGS ($\sim 170^\circ$ contre $\sim 110^\circ$), et une distribution spatiale particulière du soma (les CGS dans la couche moléculaire, tandis que les CG dans la couche granulaire).

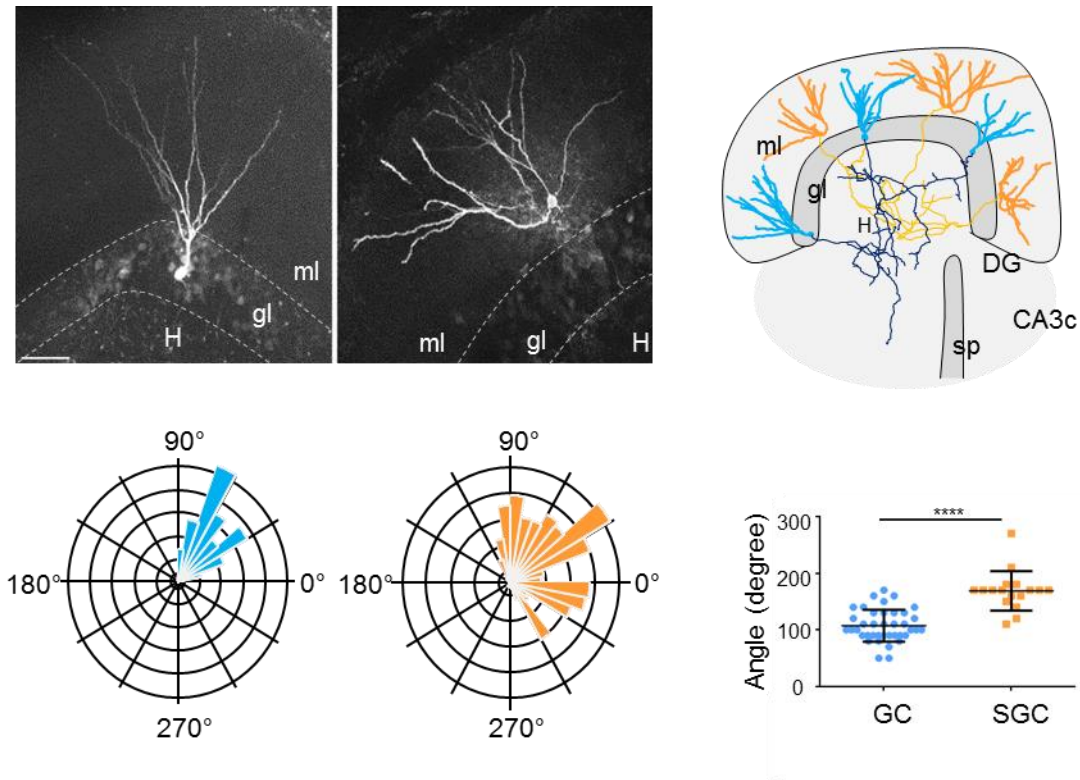


Figure 40 : Reconstruction de CG et de CGS. En haut à gauche, image prise au microscope d'une CG (à gauche) et d'une CGS (à droite). En haut à droite, reconstruction de trois CG (en bleu) et de 3 CGS (en orange), replacées dans le GD. En bas à gauche, exemple d'écartement angulaire de l'arborisation dendritique d'une CG (en bleu) et d'une CGS (en orange). En bas à droite, ensemble des écartements angulaires de toutes le CG (en bleu) et CGS (en orange) reconstruites. H, hile ; gl, couche granulaire ; ml, couche moléculaire ; GC, cellules granulaires ; SGC, cellules granulaires semilunaires ; DG, gyrus denté.

Cependant, ces deux types neuronaux partagent beaucoup de caractéristiques (comme la même longueur totale de dendrites, le même nombre de ramification dendritique, et un axone qui se ramifie dans le hile et qui se projette jusque dans CA3).

C/ Caractéristiques électrophysiologiques des neurones pionniers

Dans les articles de 2011 et 2012 (Marissal et al., 2012; Picardo et al., 2011), il avait également été montré que les neurones pionniers GABAergiques ou glutamatergiques de CA3 possédaient des propriétés électrophysiologiques propres, différentes de celles des neurones GABAergiques ou glutamatergiques générés plus

tardivement. Nous nous sommes alors demandé si les CG et CGS pionnières possédaient également des propriétés électrophysiologiques particulières.

Nous avons enregistré en patch-clamp en configuration cellule entière et en courant imposé trois groupes de neurones particuliers : des CGS générées tôt (E12,5), des CG générées tôt (E12,5) ainsi que des CG ciblées au hasard pour contrôle (CG random) chez des souris adultes. Pour compléter notre étude, nous avons également réalisé des enregistrements de CG random chez des souris juvéniles âgées de 15 jours postnataux.

La première constatation que nous avons faite avec ces résultats, c'est que la différence CGS (E12,5) et CG random n'est pas flagrante au regard des différents critères électrophysiologiques mesurés (nous en avons 11 au total, voir méthode).

Nous avons réalisé une analyse multiparamétrique en cluster des caractéristiques électrophysiologiques de tous les neurones précédemment enregistrés en s'affranchissant de leur identité morphologique. Nous avons obtenus 3 groupes de neurones ségrégués selon leurs propriétés électrophysiologiques : seuil des potentiels d'action (PA), le potentiel de repos de la membrane, amplitudes des PA, cinétique des PA, le taux maximum de décharge, résistance membranaire (R_m), capacitance membranaire (C_m), amplitude d'hyperpolarisation après le PA, accommodation et le pourcentage d'adaptation de la décharge.

Le premier groupe, composé à 78% de GC random ($n=17$, GC random), possède une résistance membranaire et une capacitance membranaire de cellules immatures ($R_m=442,1 \pm 29,01$; $C_m=47,5 \pm 5,78$) comparables à la résistance et la capacitance des CG random que nous avons enregistrées au stade juvénile à P15 ($R_m=670,1 \pm 107,9$; $C_m=41,8 \pm 6,7$). Le deuxième groupe contient à 60% des neurones pionniers générés à E12,5 ($n=27$, CG et CGS pionnières), qu'ils soient CGS ou CG. Cela signifie que malgré une morphologie différente, les CGS et les GC pionniers partagent les mêmes caractéristiques électrophysiologiques. Ce groupe est caractérisé par des résistances et capacités membranaires de neurones plus âgés (R_m plus basse $\sim 162,4$ Mohms ; C_m plus élevée $\sim 88,8$ pF), et par une excitabilité plus faible (gain de $2,8 \pm 0,43$ contre ~ 7 pour les clusters 1 et 3). Le dernier groupe rassemble à plus de 81% des GC random ($n=32$, GC random) formant la population des CG dont on ne connaît pas la date de genèse.

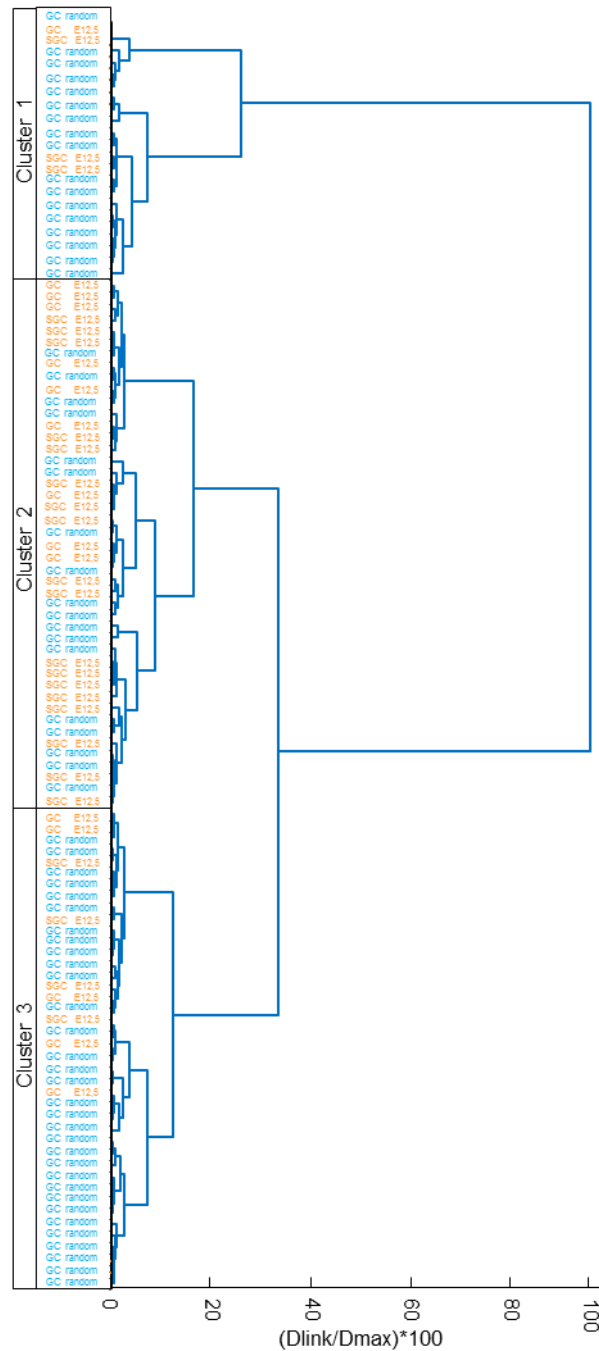


Figure 41 : Obtention de 3 groupes de neurones après l'analyse en cluster basée sur 11 paramètres électrophysiologiques. En bleu, ce sont les CG random. En orange, ce sont les CGS et CG générées à E12,5. Cluster 1 : 78% de CG random. Cluster 2 : 60% de CG et CGS pionnières. Cluster 3 : 80% de CG random.

Parmi les GC random, la probabilité d'avoir enregistré des neurones générés tôt est très faible compte tenu de leur rareté (population estimée à 3%). On peut donc suggérer avec confiance que dans les CG random sont en grande majorité des neurones générés plus tardivement que les CG et CGS pionnières. En nous appuyant sur ce raisonnement

probabiliste on peut conclure que les CG et CGS pionnières sont moins excitables que les neurones générés plus tardivement.

D/ Distribution spatiale particulière des neurones pionniers

Dans une étude, il a été montré que la date de naissance des neurones était déterminante pour leur distribution radiale spatiale au sein d'une structure. Nous avons donc quantifié la localisation du soma de CG en fonction de leur date de neurogénèse estimée par l'administration de tamoxifène.

Nous avons alors observé une gradation parfaite de la localisation du soma depuis les couches les plus externes de la couche granulaire pour les neurones les plus anciens à partir de E14,5, jusque dans la partie la plus interne, proche du hile du GD, pour les neurones les plus récents (P7 et P3). Étonnement, les CG E12,5 ne respectent pas du tout cette organisation car ils ne présentent pas de préférence significative. En effet, on les retrouve dans toutes les strates de la couche granulaire.

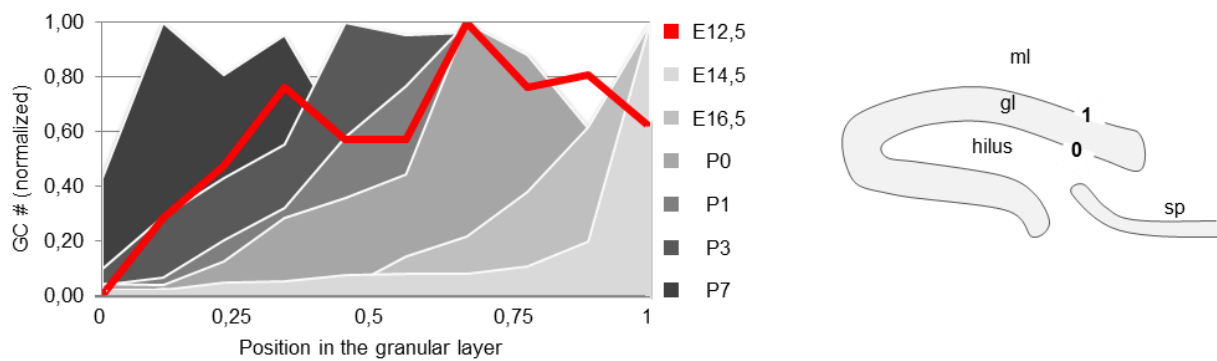


Figure 42 : Distribution radiale des CG en fonction de leur date de genèse. A gauche, en dégradé de gris il y a la localisation du soma des CG depuis E14,5 (gris très clair) jusqu'à P7 (gris très foncé). La courbe rouge correspond à la localisation des soma des CG pionnières, nées à E12,5. A droite, représentation schématique d'un GD montrant que la valeur « zéro » est la position la plus proche du hile, la valeur « un » étant la position la plus proche de la couche moléculaire.

Tous ces résultats suggèrent que les CGS et CG pionnières partagent des caractéristiques électrophysiologiques qui pourraient être au service d'une fonction particulière lors de

la mise en place du réseau du gyrus denté. La morphologie particulière des CGS E12,5 et la localisation particulière du soma des CG E12,5 peut également jouer un rôle au cours de développement qui reste toutefois à être élucidé.

E/ Des neurones pionniers contactant d'autres neurones pionniers

Il a été précédemment montré que les cellules principales de l'hippocampe se contactaient selon une règle respectant leur origine temporelle (Deguchi et al., 2011). Nous avons voulu savoir s'il existait des connexions particulières des CG et CGS pionnières avec des neurones pionniers d'autres structures. Nous avons tout d'abord montré que les cellules moussues (CM) du hile étaient générées tôt avec un pic entre E12,5 et E14,5.

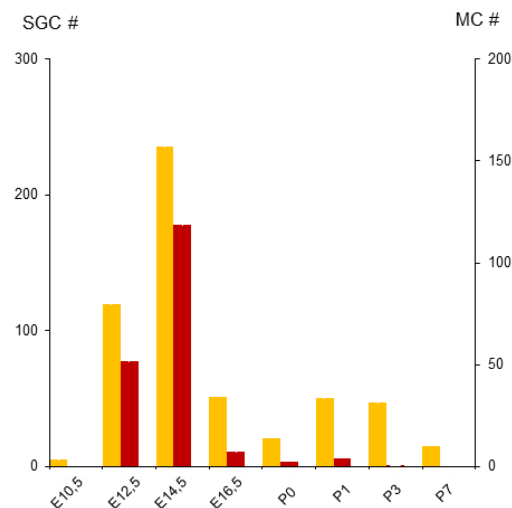


Figure 43 : Fenêtre de neurogénèse des CGS et des CM. En jaune, comptage des CGS et en rouge, comptage des CM.

Puis nous avons voulu savoir si les CG et CGS pionnières contactaient les CM pionnières. Ainsi, nous avons réalisé des expériences de double-patch de CG/CGS avec des CM générées tôt qui n'ont pas abouti à des résultats significatifs (voir *Discussion* page 157).

Cependant, grâce à l'observation d'images prises au microscope, nous avons pu montrer l'existence de contacts entre les fibres moussues issues des CG et des CGS générées tôt et

les dendrites des CM pionnières. Nous avons aussi constaté que ces contacts se faisaient par le biais de *terminaisons moussues* ainsi que des *varicosités*.

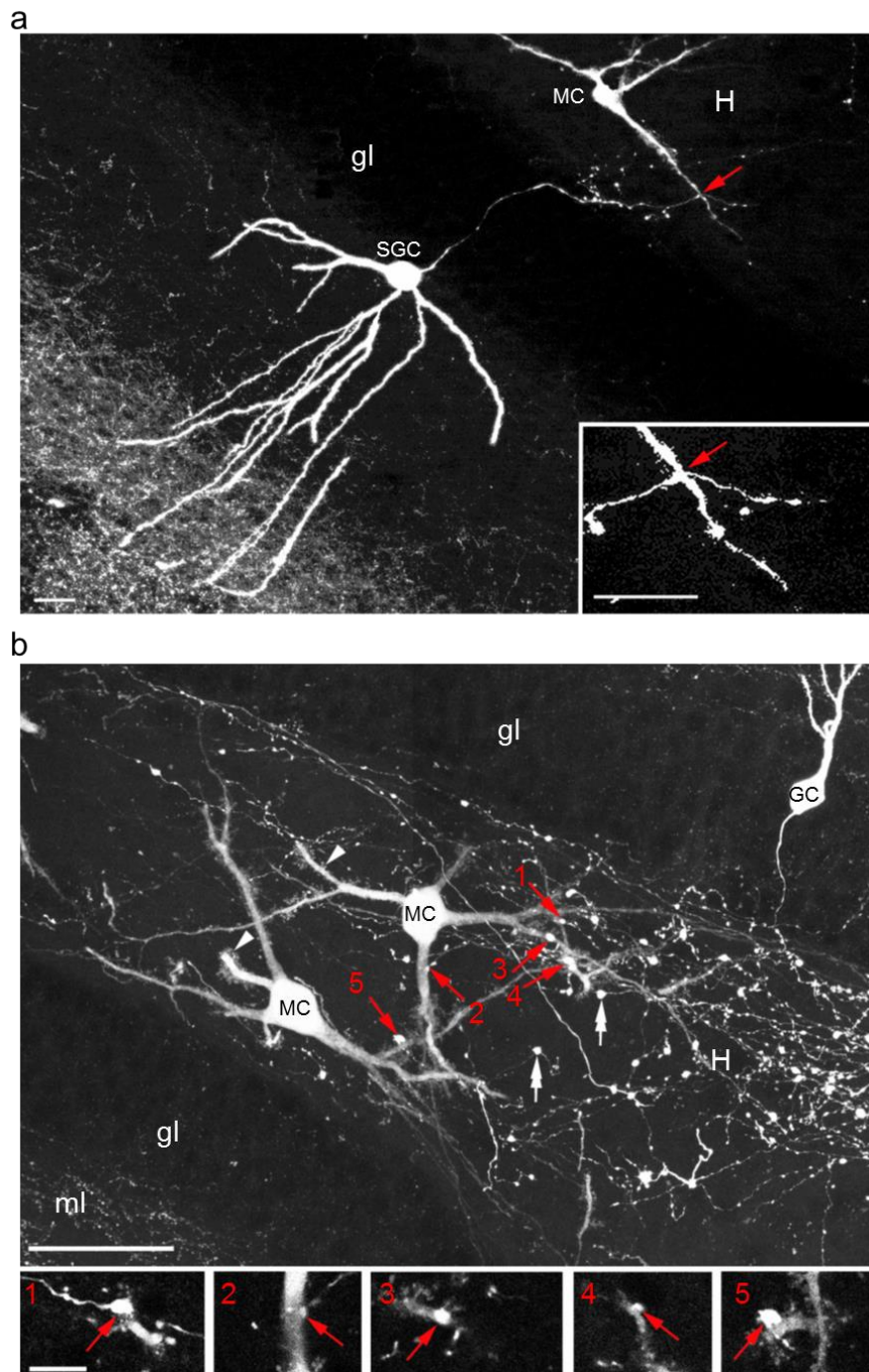


Figure 44 : Un réseau pionnier de CGS, CG et CM pionnières. Les contacts entre les fibres moussues et les dendrites des CM sont repérées à l'aide de flèches rouges. Doubles flèches, terminaisons moussues. Ml, couche moléculaire ; gl, couche granulaire ; H, hile ; MC, cellules moussues ; SGC, cellules granulaire semilunaire ; GC, cellule granulaire.

II. Résultats hors article

A/ Chronologie de l'apparition des voies glutamatergiques afférentes dans la couche moléculaire

Lors de l'étude des coupes de cerveaux de souris *Ngn2CreAi14* nous avons pu observer le marquage des afférences putatives du cortex entorhinal. Ainsi, à E12.5 nous avons constaté que les fibres exprimant la td-tomato dans le tiers externe de la couche moléculaire (n=3 cerveaux) tandis qu'à E14.5 toutes les fibres exprimant la td-tomato se situent dans le tiers médian (n=4 cerveaux), (Figure 39).

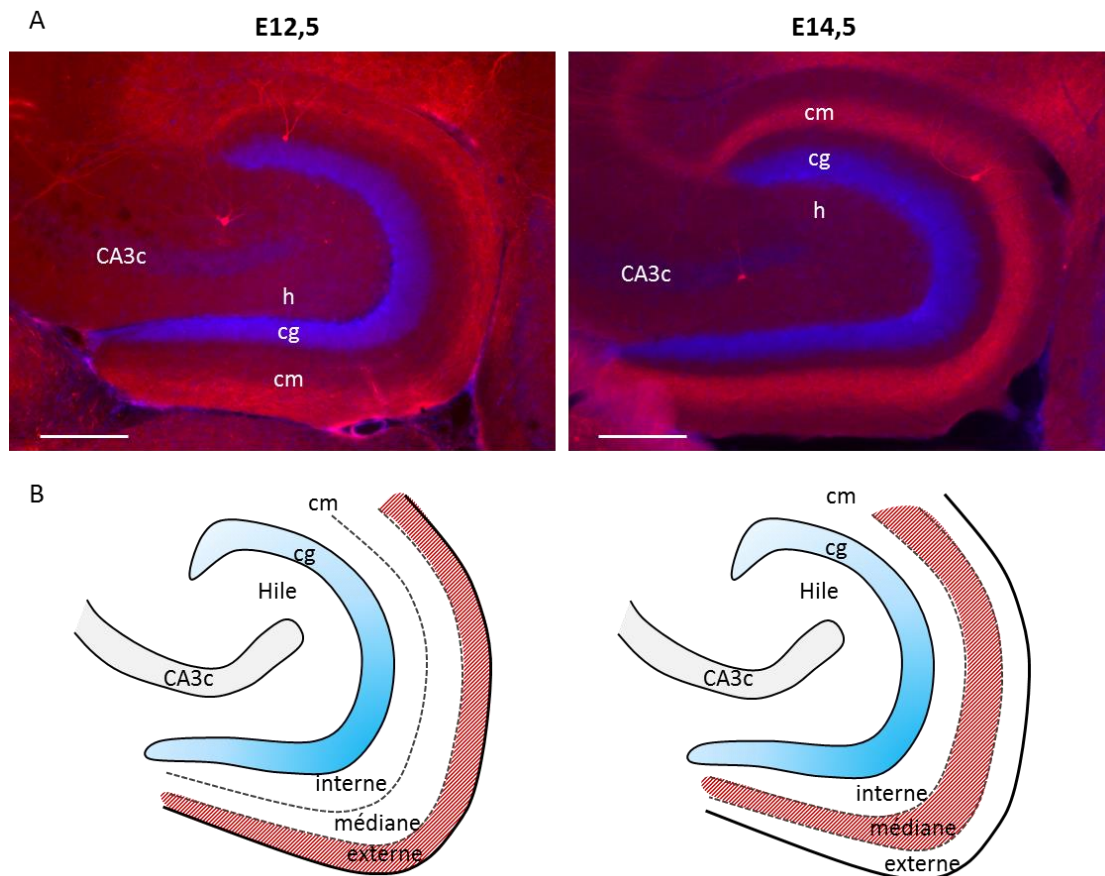


Figure 45 : Apparition temporelle et spatiale des voies afférentes glutamatergiques dans la couche moléculaire. A, les fibres glutamatergiques en rouge sont situées dans le tiers externe de la couche moléculaire à E12,5 et dans le tiers médian à E14,5. B, Schématisation de l'emplacement des afférences glutamatergiques dans la couche moléculaires. (Barre d'échelle 200 μ m).

Il y a donc une distribution radiale des afférences probablement issues du CE selon l'origine temporelle des neurones dont elles proviennent. Cette distribution reflète celle des régions du CE Médian et Latéral.

B/ Stimulation de la voie perforante

Dans les articles précédents sur l'étude des CGS (Gupta et al., 2012; Larimer and Strowbridge, 2010), les auteurs avaient montré que la stimulation de la voie perforante induisait un train de potentiels d'action qui durait plusieurs secondes que l'on retrouvait par la suite dans les cellules moussues du hile contactées par les CGS. Ces résultats leur ont permis de placer les CGS comme premier relai de la boucle inhibitrice du GD produisant le filtre inhibiteur des CG. Nous avons donc essayé de reproduire ces résultats en stimulant à notre tour la voie perforante (voir *Matériel et Méthodes* page 103) et en enregistrant les CGS et CG en patch clamp, configuration cellule entière et en courant imposé (Figure 40 A). En réalisant deux ou trois stimulations rapprochées (intervalle variable entre 5ms et 30ms), nous avons mesuré la réponse du neurone maintenu en configuration cellule entière à différentes valeurs de potentiel de membrane (-50, -70, -90 mV) dans n=32 cellules.

Nous avons alors trouvé que tous les types de neurones avaient deux réponses possibles. La première est composée d'un potentiel d'action par stimulation (donc trois PAs successifs) sans hyperpolarisation (Figure 40 B, Type II). La seconde est également composée d'un PA par stimulation mais est suivie d'une hyperpolarisation du potentiel lorsque les neurones sont dépolarisés aux alentours de -50 mV (Figure 40 B, Type I). Ce potentiel hyperpolarisant est bloqué par des bloqueurs pharmacologiques des récepteurs du GABA_B (CGP 54626).

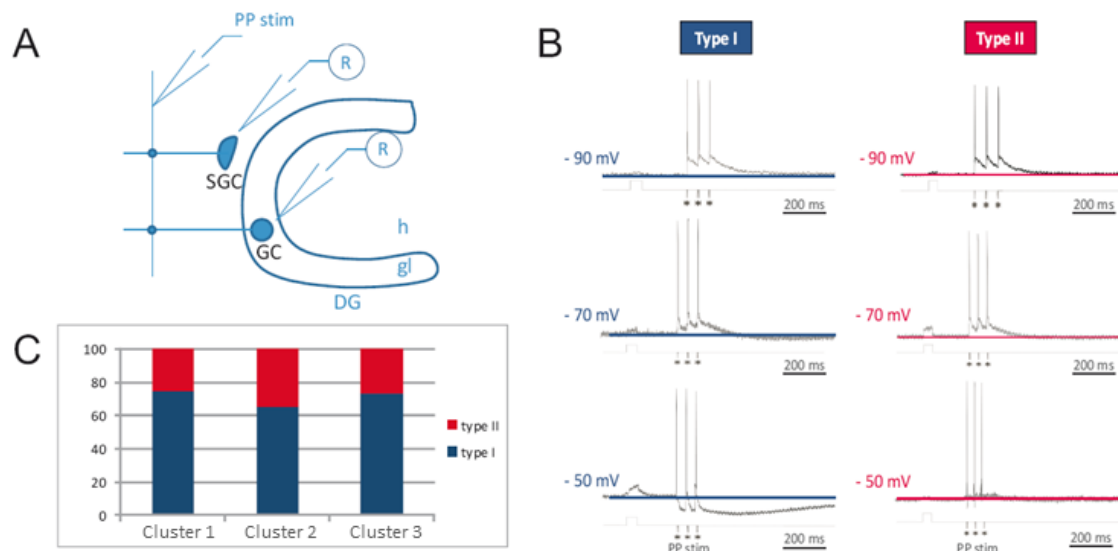


Figure 46 : Réponse à la stimulation de la voie perforante. A, Illustration du protocole de stimulation. B, Les deux types (I et II) de réponses obtenues dans les neurones enregistrés après stimulation. C, Proportions de ces réponses au sein des trois groupes obtenus à l'issue de l'analyse en cluster. Cluster 1 : 75% de type II (n=6 cellules) ; cluster 2 : 66% de type II (n=19 cellules) ; cluster 3 : 73% de type 2 (n=11 cellules).

Nous avons également noté que la proportion de ces deux types de réponse était identique entre les CG enregistrées au hasard et le groupe des pionniers (cluster 1, cluster 2 et cluster 3) avec environ 70% de réponse de type I et 30% de réponse de type II (Figure 40 C).

Comme nous n'avons pas trouvé les mêmes résultats que précédemment, nous développerons dans la discussion les éventuelles raisons pour lesquelles notre expérience n'a pas permis de confirmer ces premiers résultats.

C/ Recrutement des neurones du GD in vivo en condition physiologique

Lors de mon comité de mi-thèse, une expérience permettant de révéler le recrutement physiologique fonctionnel des neurones du GD nous avait été suggéré. Elle consistait à étudier l'implication des neurones pionniers du gyrus denté dans un exercice physique libre au travers du marquage c-fos (gène d'expression précoce). Il permet de marquer les neurones qui ont été activés. Chez des souris pratiquant un

exercice physique libre (roue d'exercice) nous savions que la quantité de neurones exprimant c-fos était augmentée d'environ 5% ce qui permettait d'accroître la probabilité de marquage c-fos dans les neurones pionniers (Clark et al., 2011).

Nous avons observé en premier lieu l'augmentation significative de la quantité de neurones marqués par c-fos chez les souris du groupe 2 par rapport aux souris du groupe 1 (voir *Matériel et Méthodes* page 107). Par contre, aucun des neurones pionniers n'exprimaient c-fos chez les souris du groupe 2. Seules les souris du groupe 1 avaient un co-marquage très rare de ces deux marqueurs (n=3 cellules sur 4 cerveaux), (Figure 41).

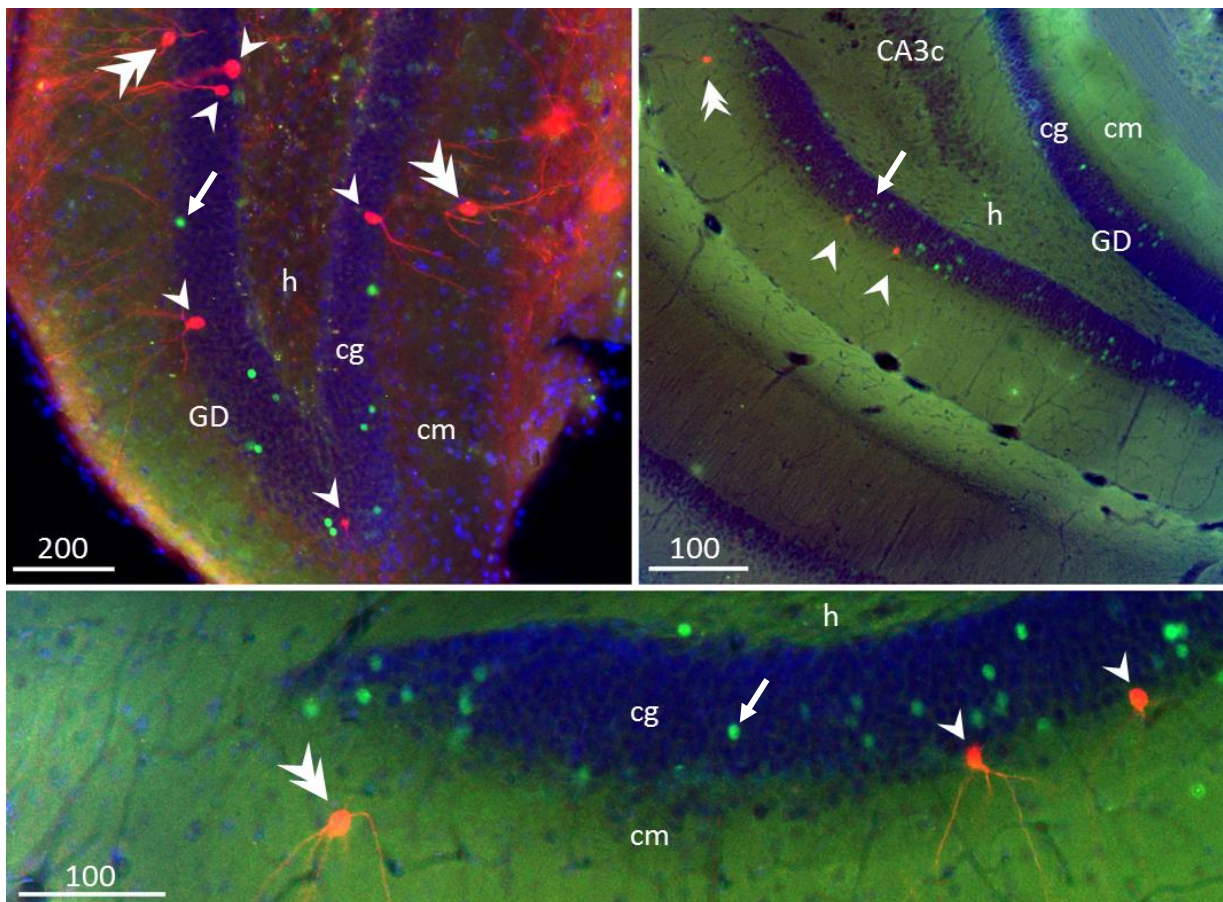


Figure 47 : Expression de c-fos en condition contrôle et lors d'un exercice physique libre.

L'image en haut à gauche provient du Groupe 1 (souris contrôles). L'image en haut à droite provient du Groupes 2 (souris ayant eu libre accès aux roues d'exercice). En vert, le marquage c-fos, en bleu le marquage nucléaire (Dapi) et en rouge les neurones pionniers (E12,5) exprimant le rapporteur td-tomato : tête de flèche pour, les CG ; les double têtes de flèche pour les CGS. Les flèche entière désigne les cellules c-fos+. L'image du bas est un agrandissement de l'image en haut à droite. Les échelles sont en nanomètre (nm) ; h, hile ; cg, couche granulaire ; cm, couche moléculaire.

Article

A specific circuit of pioneer neurons in the adult Dentate Gyrus

Laurène Save, Agnès Baude and Rosa Cossart

A specific circuit of pioneer neurons in the adult Dentate Gyrus

Laurène Save^{1,2,3}, Agnès Baude^{1,2,3}, Rosa Cossart*^{1,2,3}

¹ Inserm U901, Marseille 13009, France. ² Aix-Marseille University, UMR 901, Marseille 13009, France. ³ INMED, Marseille 13009, France.

Corresponding author : Rosa Cossart, INMED - INSERM U901- 163 avenue de Luminy-BP 13, 13273 Marseille cedex 9, France

Phone: 33 4 91 82 81 31

Fax: 33 4 91 82 81 01

e-mail: rosa.cossart@inserm.fr

Number of figures: 6

Number of tables: 2

Number of words for Abstract: 149

Number of words for Introduction: 543

Number of words for Results: 1725

Number of words for Discussion: 1466

Number of words for Methods: 1370

Abstract

Developmental origin determines the functional diversity of cortical neurons. In the CA3 hippocampal region, pioneer neurons develop into critical network hubs. The Dentate Gyrus, the entry gate to the hippocampus, is mostly studied through the prism of adult neurogenesis. It comprises three types of principal cells, the granule, the mossy and the semilunar granule cells. The latter represents a minority of neurons that gates information transfer to the hippocampus. Here we show that semilunar cells, like mossy cells, originate from the earliest stages of developmental neurogenesis and form age-matched circuits with each other. Besides morphology, adult semilunar cells display characteristic electrophysiological features contributing to a lower excitability and a low recruitment probability *in vivo*. Such electrophysiological traits differ from most neurons but are shared among early born granule cells. Therefore, an early birthdate specifies adult granule cell physiology and connectivity whereas additional factors may combine to produce morphological identity.

Introduction

Dentate granule cells are the principal components of the Dentate Gyrus (DG), which is the critical entry point to the hippocampus. Much attention has been given to adult neurogenesis in this region because it is one of only two brain areas where it occurs in mammals. This continuous addition of new granule cells makes the DG a highly heterogeneous structure composed of different generations of neurons. If developmental and adult-born neurons were shown to be similar regarding their intrinsic and synaptic properties (Laplagne et al., 2006, 2007), the age of adult born neurons is known to critically determine their function and excitability. Hence for example, young adult-born granule cells are more excitable (Schmidt-Hieber et al., 2004), support pattern separation (Nakashiba et al., 2012), but are less spatially tuned (Danielson et al., 2016) and more prone to reactive plasticity during epileptogenesis (Kron et al., 2010) compared to older ones.

Whether such age-dependent specialization of function also applies to developmental neurogenesis remains unknown. This is a particularly important issue since most granule cells originate from developmental neurogenesis (Altman and Bayer, 1990) and since neurons originating from the earliest stages of developmental neurogenesis were recently shown to be more prone to coordinate neuronal activity in the CA3 hippocampal region (Marissal et al., 2012; Picardo et al., 2011). Interestingly, it is known that granule cells are a heterogeneous cell population, both morphologically and functionally. Of particular interest are the semilunar granule cells (SGC), a name coined by Ramon y Cajal (Ramon y Cajal, 1909) alluding to their characteristic dendritic arborization. These cells are a rare subtype of granule cells with a soma in the inner molecular layer (IML), and a dendritic arbor shaped like a half-moon. Remarkably, these cells were recently shown to critically control the transfer of entorhinal inputs to the hippocampus through specific intrinsic properties and a differential connectivity pattern, including a distinctive integration into local GABAergic circuits (Gupta et al., 2012; Larimer and Strowbridge, 2010; Williams et al., 2007).

Given their prominent network function and their characteristic morphology, we therefore asked whether this subtype of granule cells could be specified through their developmental ontogenetic origin. Using inducible genetic fate mapping approaches to label glutamatergic neurons in the Dentate Gyrus according to their birthdate, we show that SGCs, like Mossy Cells (MCs) (Li et al., 2008), originate from the earliest stages of Dentate Gyrus developmental neurogenesis, with an ontogenesis peak about one week before that of granule cell developmental ontogenesis. Accordingly, these cells gain mature properties at early postnatal stages. In addition, multidimensional clustering of morphological and physiological variables sampled from early born and randomly targeted granule cells (GCs) in the adult and developing DG, segregated pioneer GCs into a physiologically distinct group that includes semilunar cells. This subclass of “pioneer” developmental GCs is anatomically heterogeneous but shares similar intrinsic properties all converging towards a lower excitability compared to most granule cells. This lower excitability is associated with a low recruitment probability *in vivo*. In addition, early born granule cells display putative axonal contacts onto hilar early born mossy cells, which in turn arborize onto SGCs, thus following a previously established “temporal matching-rule” (Deguchi et al., 2011). Therefore, a subclass of pioneer developmental granule cells that includes SGCs synapsing onto Mossy cells, is physiologically, but not anatomically, specified by an early developmental origin. Although the specific contribution of this pioneer circuit to DG function remains to be determined, this study further extends the developmental scheme by which early born neurons are poised to become key components of adult hippocampal networks.

Results

Early born granule cells comprise semilunar cells and evenly integrate the adult granular layer

Dentate gyrus glutamatergic cells were fate-mapped using the *Ngn2*^{CreERTM/wt}/*Ai14:LoxP*^{+/wt} transgenic mouse line (see *Methods*). Hence, by using the *Ngn2*^{CreERTM} driver and *Ai14* reporter lines and by providing tamoxifen at separate embryonic time points (E10.5, n=2 brains; E12.5, n=5; E14.5, n=5; E16.5, n=4; P0, n=4; P1, n=5; P3, n=5; P7, n=4), we label temporally distinct populations of glutamatergic DG cells (Figs. 1 and 2). The cells thus labelled displayed two characteristic types of somato-dendritic morphologies. The most common type displayed a typical GC morphology with a round soma located in the granular layer and from which emerged one or two primary branches that arborized perpendicular to the granular layer (Figure 1). The second type of labelled neuron was much less frequent and displayed the emblematic morphological features of previously described semilunar neurons (SGCs) (Larimer and Strowbridge, 2010; Ramon y Cajal, 1909; Williams et al., 2007). Their soma was strictly located in the molecular layer and exhibited a half-moon shape. Their primary apical dendrites, more numerous than for GCs, (typically from 2 to 5), emerged from the two extremities of the half-moon-shaped cell body and arborized throughout the molecular layer. These two morphological subtypes of cells (SGC and GC) were next filled with Neurobiotin through a patch pipette to reveal their axonal morphologies

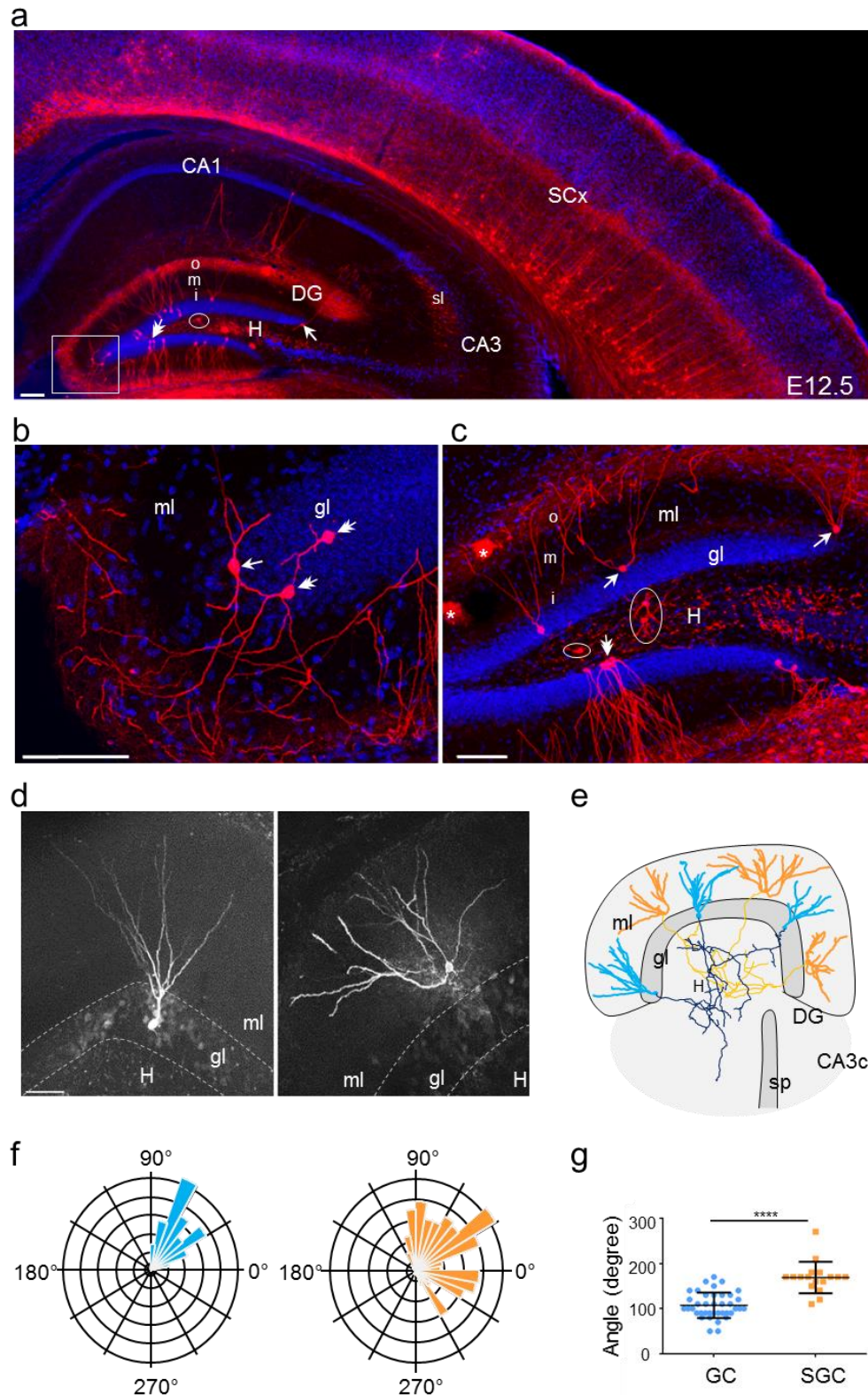


Figure 1 Distribution of E12.5 generated glutamatergic neurons in the adult Dentate Gyrus (DG). (a) Photomicrograph showing early born neurons expressing Tdtomato in the hippocampus and neocortex from adult *Ngn2CreERTM;Ai14:LoxP* mouse brain coronal slices. Counterstaining was performed with DAPI. (b and c) Within the dentate gyrus (DG), SGCs are found in the molecular layer (ml, single arrow) while GCs are scattered throughout the granular layer (gl, double arrow). Mossy cells can be found in the hilus (H, circled areas in c). Image in (b) is a magnification of the area framed

in (a). Glial cells can sometimes be labelled (stars in c). Scale bars = 100 μ m. SCx, somatosensory cortex; sl, stratum lucidum; so, stratum oriens; sp, stratum pyramidale; sr, stratum radiatum. Counterstaining was performed with DAPI (blue). **(d)** Photomicrographs of two neurobiotin filled neurons, a GC in the granular layer (gl, left) and a SGC with a soma from which emerges the remarkable half-moon shaped dendritic arborization in the molecular layer (ml, right). Scale bar = 50 μ m. **(e)** Neurolucida reconstructions of 3 GCs (blue) and 3 SGCs (orange), filled with neurobiotin, and placed on a schematic representation of the DG; the axons of reconstructed neurons (thinner lines) can be followed throughout the hilus (H) and until CA3c. **(f)** Polar plots of the dendritic arborization spreads of a GC (blue) and a SGC (orange) obtained from filled and reconstructed cells. **(g)** Plots indicating that the dendritic angle spread of SGCs (n=17, orange) is significantly larger than for GCs (n=29, blue; Mann and Whitney test, $p < 0.0001$).

and for quantitative morphometric analysis. Although, as expected, such analysis confirmed a wider angular spacing of the primary apical dendrites originating from SGCs than from GCs ($170 \pm 11^\circ$ vs. $107 \pm 6^\circ$ respectively, Figure 2), we could not find any quantitative difference between other morphometric parameters including total dendritic or axonal lengths (Table 1). As intracellular labelling was performed in adult mice, the axon was very often cut during slice processing. Axons from 25 cells out of 67 filled cells were partly recovered (Table 1). Eight recovered SGC axons arborized in the hilus and one of them reached the CA3c stratum radiatum. All GC axons (n=17), but one, arborized in the hilus and CA3c; one ran straight towards CA3 without arborizing in the hilus.

Therefore, we used somatic location and dendritic morphologies as criteria to differentiate between SGCs and GCs and thus quantitatively compare their developmental neurogenesis profiles. In this way, we could count GCs and SGCs in the DG of adult brain slices for different time points of tamoxifen gavage (see Material and Methods; Figs. 1 and 2). We observed that the number of labelled GCs and SGCs peaked at different time points since most GCs were issued from Ngn2 progenitors labelled around birth (P0-1) while the peak was one week earlier (E14.5) for SGCs (Figure 2b). By pooling experiments across all age groups we could estimate that SGCs represented less than 3% of all the fate-mapped glutamatergic

TABLE 1
Morpho-physiological properties of SGCs or GCs in juvenile and adult mice

	SGC E12.5 P15	SGC E12.5 Adult	GC E12.5 Adult	GC random P15	GC random Adult
Electrophysiological properties					
<i>number of cells</i>	21	25	15	10	66
Rm (Mohms)****	232,5 ± 25,7	208,5 ± 22,2	232,9 ± 31,2	670,1 ± 107,9	272,1 ± 15,3
Cm (pF)**	70,3 ± 7,2	73,9 ± 6,6	66,3 ± 5,3	41,8 ± 6,7	72,2 ± 5,1
Vthresh (mV)***	-35,1 ± 1,4	-33,7 ± 1,57	-31,7 ± 1,62	-35,8 ± 1,6	-35,6 ± 0,9
AP amplitude (mV)***	80,4 ± 3,7	78,0 ± 1,9	73,3 ± 2,2	67,8 ± 4,0	81,2 ± 1,4
AP duration (ms)*	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,5 ± 0,1
Vrest (mV) ^{ns}	-65,7 ± 2,0	-69,4 ± 1,7	-72,1 ± 1,9	-68,3 ± 2,9	-70,8 ± 1,2
fAHP (mV) ^{ns}	14,7 ± 1,6	15,3 ± 1,0	17,0 ± 1,1	17,8 ± 0,9	16,2 ± 0,8
Accommodation (mV) ^{ns}	14,0 ± 2,3	15,7 ± 1,7	17,3 ± 2,4	15,8 ± 2,7	14,9 ± 1,0
Gain**	6,3 ± 1,4	3,9 ± 0,6	2,3 ± 0,7	16,8 ± 5,6	6,4 ± 0,8
Maximum Firing Rate**	8,8 ± 1,6	7,5 ± 1,4	3,5 ± 1,1	14,1 ± 4,6	9,0 ± 0,8
% of adaptation**	29,5 ± 6,9	31,8 ± 5,9	57,7 ± 8,2	20,9 ± 8,9	30,6 ± 3,8
Firing pattern					
<i>number of cells</i>	17	21	14	10	65
<u>At the rheobase</u>					
% of delayed spiking	24	46	13	47	59
% of adapting	55	33	47	47	26
% of delayed and adapting	21	21	40	6	15
<u>At incremented depol steps</u>					
% of strongly adapting	29	29	58	43	32
% of adapting	65	49	37	43	41
% of regular spiking	6	22	5	14	27
Morphology					
<i>number of cells</i>	5	17	10	9	26
Cell body perimeter (μm)**	158,9 ± 9,6	137,6 ± 8,27	112,0 ± 3,9	148,0 ± 5,2	145,9 ± 5,1
Dendrites					
Number of nodes ^{ns}	11,2 ± 1,3	11,1 ± 0,8	12,4 ± 1,3	15,6 ± 1,8	12,9 ± 0,5
Number of endings ^{ns}	14,8 ± 1,2	14,5 ± 0,8	13,5 ± 1,3	16,6 ± 1,8	14,0 ± 0,6
Length (mm)**	5,8 ± 1,4	5,6 ± 0,4	5,2 ± 0,3	5,39 ± 0,7	7,38 ± 0,4
Angle spread (°)****	170,0 ± 11,4	168,8 ± 8,4	108,0 ± 5,6	108,8 ± 13,4	107,2 ± 5,7
# primary dendrites ****	3,4 ± 0,3	3,6 ± 0,4	1,1 ± 0,1	1,0 ± 0,0	1,1 ± 0,1
Axonal morphology (# cells)					
Number of nodes ^{ns}	3	5	4	2	11
Number of endings ^{ns}	1,7 ± 0,9	5,2 ± 1,6	6,5 ± 1,3	6,5 ± 0,5	5,8 ± 1,1
Number of endings ^{ns}	2,7 ± 0,9	6,2 ± 1,6	7,5 ± 1,3	7,5 ± 0,5	6,8 ± 1,1
Length (mm) ^{ns}	2,0 ± 0,4	5,7 ± 1,3	3,3 ± 0,7	2,9 ± 0,1	2,9 ± 0,4

****p < 0.0001 ; ***p < 0.0005 ; ** p < 0.01 ; * p < 0.05; ns , no statistical difference; p values as given by the Kruskal and Wallis test. All data are given as mean ± SEM. AP, Action Potential; Cm, membrane capacitance; Rm, membrane resistance; Vthresh, action potential threshold; Vrest, resting membrane potential; fAHP, fast afterhyperpolarization.

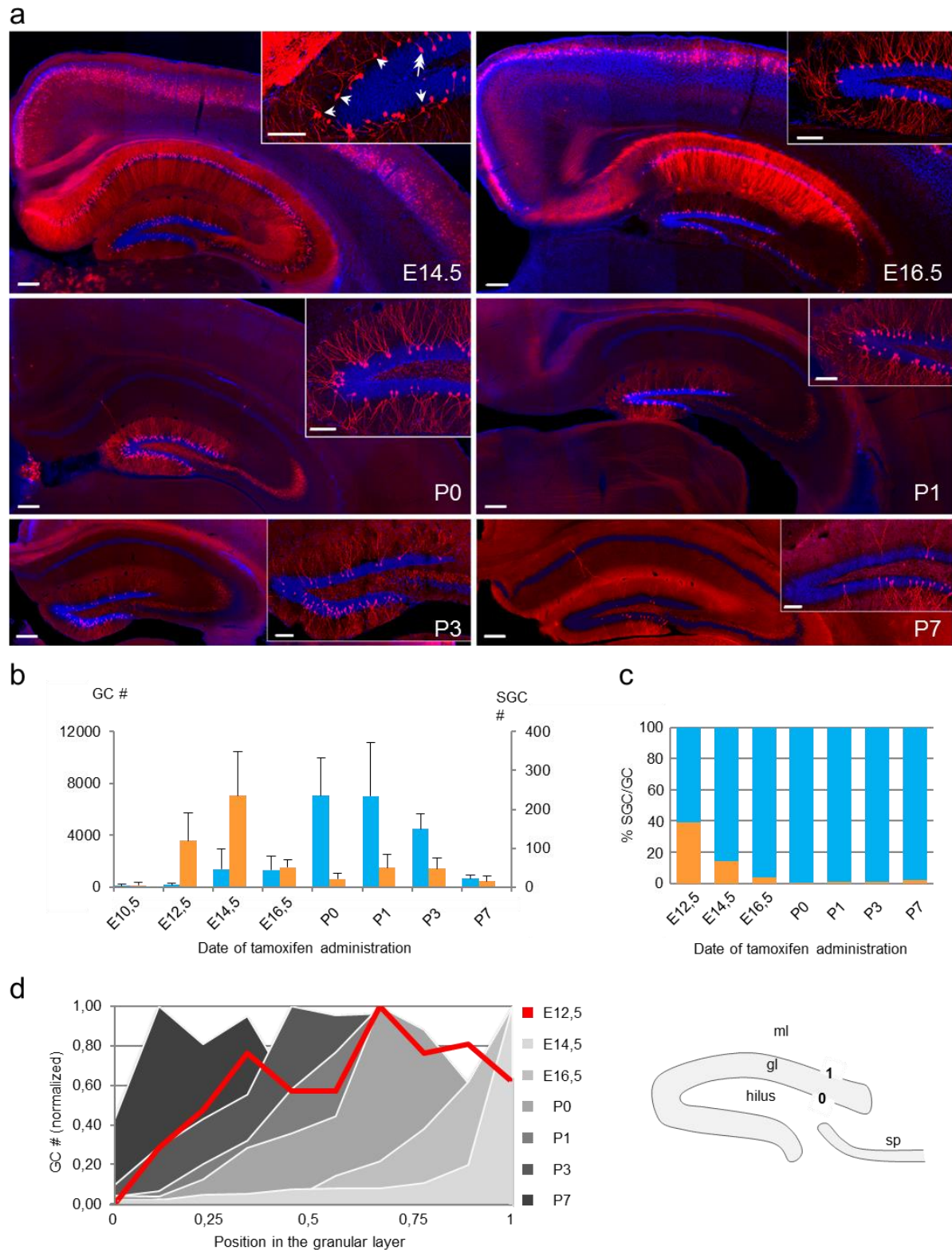


Figure 2 Fate mapping glutamatergic neurons in the Dentate Gyrus (DG). (a) Photomicrographs showing the distribution in the hippocampus and neocortex of fate-mapped neurons from adult *Ngn2CreERTM;Ai14:LoxP* (Td-Tomato) mouse coronal brain slices following tamoxifen administration at various pre- (E14.5, E16.5) and post-natal (P0-P7) time points. Within the DG, many SGCs (insert, arrows) are visible after E14.5 tamoxifen administration as well as numerous GCs (double arrows). SGCs could barely be seen at later time points of tamoxifen administration. Inserts are higher magnification displays of the DG. Scales bars = 200 μ m, and 100 μ m for inserts. Counterstaining was

performed with DAPI (blue). **(b-c)** Histograms plotting the absolute numbers of GCs and SGCs (b) and the fraction of SGCs (c) in adult animals (n=35) as a function of the time of tamoxifen administration. The peak of SGCs genesis occurs at E14,5 (b) earlier than that for GCs which occurs around birth. Note that despite a small absolute number of SGCs compared to GC (b), these cells represent around 40% of the fate-mapped neurons at E12.5 (c). **(d)** Diagram showing the position of the soma of GCs in the granular layer (gl) of the DG as a function of the date of tamoxifen administration. Cells located closer to the hilus are closer to the value 0, whereas cells that are closer to the molecular layer (ml) approach the value 1, as illustrated in the right scheme. sp, stratum pyramidale.

neurons in the adult DG. Nevertheless, when calculating the ratio of SGCs over the entire number of neurons labelled per slice, we found that SGCs represented almost half (40%) of the E12.5-labelled neurons in the DG (Figure 2c); this therefore represents a high proportion for such a rare subtype of cell. Thus, the probability for a neuronal progenitor to produce a SGC is higher at the earliest stages of DG embryogenesis. Later, more than 98% of them will produce typical GCs. Besides SGCs and GCs, we observed that hilar mossy cells were mostly observed for E12.5 tamoxifen administration (Figure 1 and Figure 6).

We next compared the somatic location of GCs in the granular layer according to their fate-mapped date of birth (Figure 2d). For that, we calculated for each neuron (n=14 brains, n=48 half hippocampal slices) the radial position of its soma relative to the hilus border divided by the full radial length of the granular layer. That number is therefore almost zero for cells close to the hilus while it is almost one for cells close to the IML (scheme on the right Figure 3d). We observed a progressive shift of that radial distribution from the IML to the hilus as the age of the cells went from E14.5 to P7. In other words, from E14.5 to P7, successive generations of GCs migrate past the existing earlier born neurons to occupy positions closer to the hilus thus creating layers in an “inside-out” fashion. Interestingly, this rule did not apply to earlier neurons labelled by E12.5 tamoxifen administration (GC E12.5) as they were found homogeneously distributed along the radial axis of the granule cell layer (Figure 3d). Altogether, these results strengthen the importance of developmental neurogenesis for DG glutamatergic cell diversity and indicate that E12.5-labelled neurons definitely stand apart.

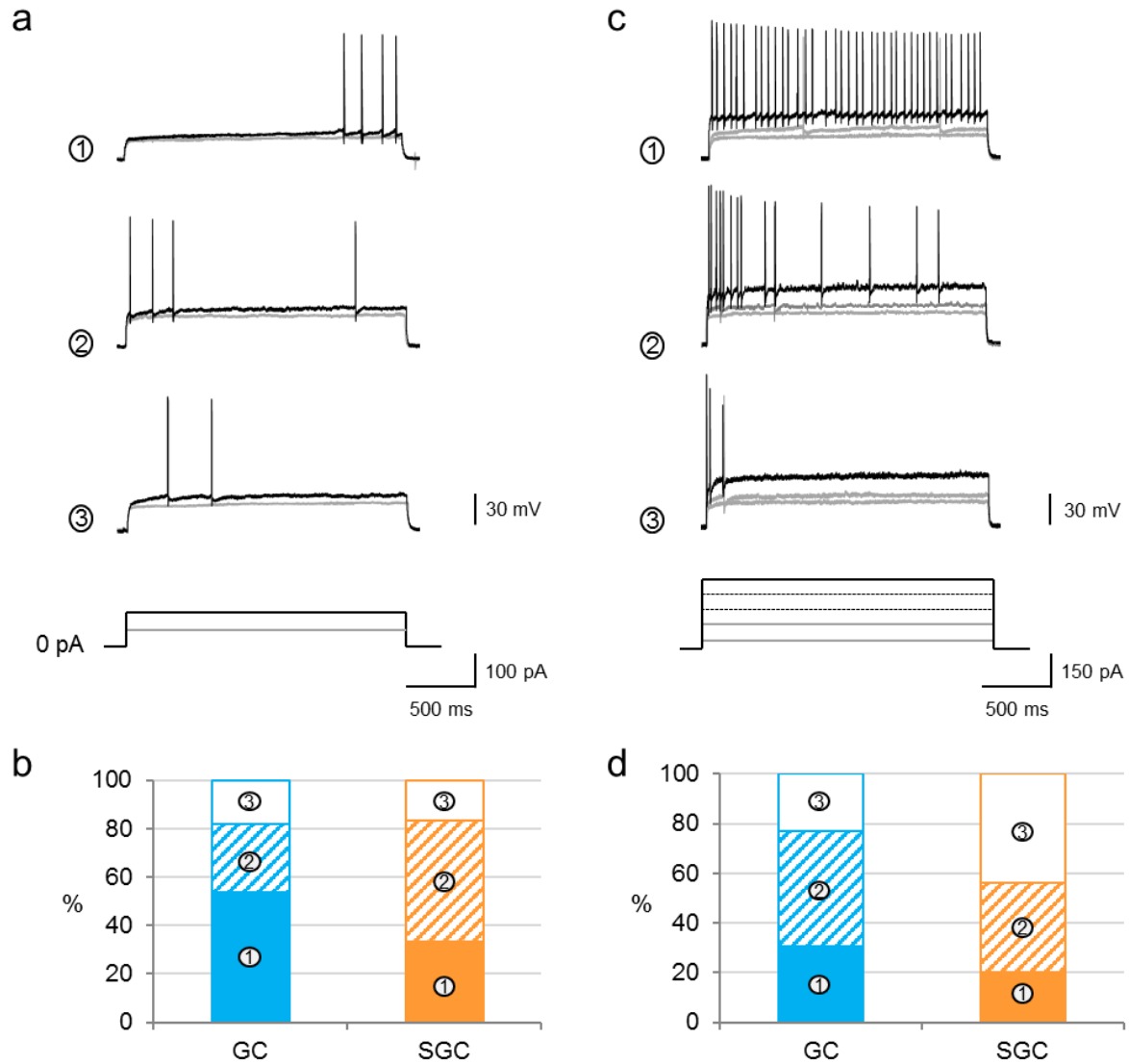


Figure 3 Evoked firing patterns of SGCs and GCs in the adult Dentate Gyrus. (a) Three types of firing patterns are observed at the rheobase (black traces, first depolarizing step displaying more than one AP, see methods) in three representative examples: 1, delayed (representative SGC); 2, adapting (representative SGC); 3, delayed-adapting (representative random GC). Grey traces show the stimulation and the responses one step before the defined rheobase. (b) Histogram showing the proportion of GCs and SGCs exhibiting the 3 firing patterns defined above at the rheobase. (c) Representative examples of the three main firing patterns recorded at the maximum depolarization, following incremented depolarizing steps: 1, regular (representative SGC); 2, adapting (representative random GC); 3, strongly adapting (representative SGC). (d) Histogram showing the proportion of GCs and SGCs exhibiting the 3 different firing patterns following incremented depolarizing steps. Note the higher proportion of SGCs displaying an adapting firing pattern.

We next asked whether the physiological characteristics of these early-born cells also differed from other GCs, as previously reported for SGCs (Williams et al., 2007). To this aim, we performed an unbiased analysis of multiple electrophysiological variables.

Early born granule cells segregate into a cluster of low excitability neurons

Three types of DG cells were targeted for current-clamp recordings based on their morphology and Td-tomato expression (Table 1): (1) randomly targeted unlabelled GCs (GC random), (2) early born developmental GCs expressing Td-Tomato following tamoxifen supply at E12.5 (GC E12.5), and (3) early born SGCs expressing Td-Tomato following tamoxifen supply at E12.5 (SGC E12.5). Regarding evoked Action Potential (AP) firing patterns, we observed that SGCs, in contrast to GCs, displayed more frequently an adapting profile at the rheobase (Figure 3a), with a stronger adaptation also at more depolarized current steps (Figure 3b, Table 1). This is in agreement with a previous report (Gupta et al., 2012) and indicates that SGCs would be less excitable than GCs.

To further identify functional families of DG cells without any a priori assignment of possible cell classes, we next performed a cluster analysis based on the following eleven physiological variables (Ward's method, Euclidian distance): AP amplitude, AP threshold, AP duration, gain (i.e. the slope linking the evoked firing frequency to the injected current), the maximum firing rate, cell firing frequency adaptation, fAHP

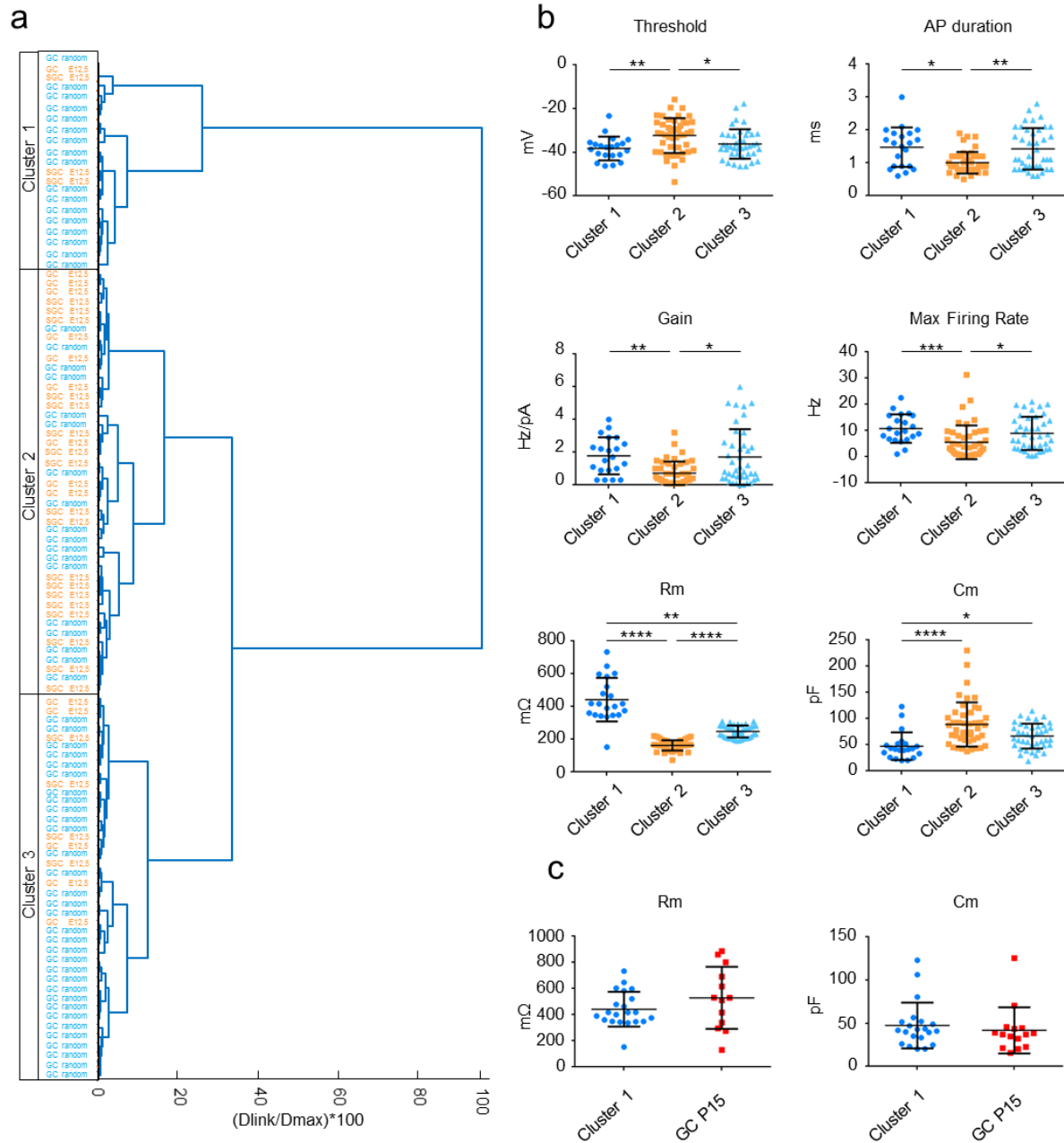


Figure 4 Cluster analysis of all recorded neurons based on electrophysiological features segregates into three groups. **(a)** Cluster analysis tree of the electrophysiological dataset from all cells in the dentate gyrus ($n=107$, Ward's method, Dlink: Euclidian distances, see Materials and Methods). Most (almost 72%) early born (E12,5) SGCs and GCs (orange) segregate into the same group (Cluster 2) whereas most of the random GCs (blue) fall into two distinct clusters, Cluster 1 and 3. **(b)** Scatter plots (mean $\pm$ standard deviation) of AP (action potential) threshold and duration, Gain and Maximum firing rate, Cm (membrane capacitance) and Rm (membrane resistance). Note that cluster 2 cells display lower values of gain, Max firing Rate, Rm and higher values for AP threshold and Cm; these physiological properties suggest that cluster 2 cells, that contain the highest number of SGCs, are less excitable. Statistical analysis: Kruskal and Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons test. **** $p < 0.0001$; *** $p < 0.0005$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; ns, no statistical difference. **(c)** Rm and Cm values for Cluster 1 cells are not different (Mann and Whitney test) from those of GCs randomly recorded at P15.

amplitude, resting membrane potential (V_m), AP firing accommodation, the Membrane Resistance (R_m) and the membrane capacitance (C_m). Such analysis segregated our dataset into three separate groups (Table 2; Figure 4a): clusters 1 and 3 mainly contained random GCs (81% and 78%, respectively); in contrast, cluster 2 mainly contained early born SGCs and GCs (60%).

Closer inspection of the electrophysiological variables within clusters revealed that the cluster that grouped together granule cells with an early temporal origin (cluster 2) displayed a significantly higher AP threshold and faster duration together with a lower gain and maximum firing rate as compared to the other two clusters (Figure 4b, $p < 0.005$, Kruskal-Wallis). This indicated a lower intrinsic excitability for cells in that cluster. Interestingly, the only two parameters that differentiated clusters 1 and 3 were the R_m and C_m , with a significantly higher R_m and lower C_m for neurons in cluster 1 (Figure 4b, $p < 0.0001$, Kruskal-Wallis). These two parameters typically reflect a smaller cell size, often linked to a delayed developmental stage, indicating that the GCs in that group could be adult born cells still at immature developmental stages. To test this possibility, we randomly recorded GCs at juvenile stages (P15), assuming that most GCs recorded in these slices would still be developing (Table 1). We observed no significant difference between R_m and C_m for GCs recorded at P15 and adult random GCs belonging to cluster 1 (Tables 1, 2; Figure 5c). This suggests that cluster 1 may indeed group together adult born GCs at an immature stage. We conclude that early born granule cells in the dentate gyrus form a distinct subpopulation of low excitability neurons uniformly scattered within the molecular and granule cell layers.

TABLE 2
Morpho-physiological properties of the three segregated clusters of SGCs and GCs

	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3
Electrophysiological properties			
<i>number of cells</i>	21	45	41
R_m (Mohms)****	442,1 $\pm$ 29,01	162,4 $\pm$ 4,73	248,0 $\pm$ 5,72

Cm (pF) ^{****}	47,5 ± 5,78	88,8 ± 6,27	66,7 ± 3,72
Vthresh (mV) ^{**}	-38,2 ± 1,19	-32,3 ± 1,19	-36,2 ± 1,06
AP amplitude (mV) ^{ns}	81,0 ± 2,26	77,2 ± 1,77	80,4 ± 1,62
AP duration (ms) ^{**}	1,5 ± 0,13	1,0 ± 0,05	1,4 ± 0,10
Vrest (mV) ^{ns}	-71,2 ± 1,80	-69,5 ± 1,38	-71,5 ± 1,33
fAHP (mV) ^{ns}	16,1 ± 1,42	17,4 ± 0,89	14,7 ± 0,74
Accommodation (mV) ^{ns}	16,4 ± 1,74	14,7 ± 1,24	15,5 ± 1,32
Gain ^{***}	7,0 ± 0,99	2,8 ± 0,43	6,8 ± 1,06
Maximum Firing Rate ^{***}	10,8 ± 1,19	5,5 ± 0,96	8,9 ± 0,99
% of adaptation ^{***}	16,1 ± 2,02	51,9 ± 5,38	29,1 ± 4,09
Firing pattern			
<i>number of cells</i>			
<u>At the rheobase</u>	20	45	40
% of delayed spiking	75	31	55
% of adapting	10	51	25
% of delayed and adapting	15	18	20
<u>At incremented depol steps</u>			
% of strongly adapting	0	64	34
% of adapting	65	18	44
% of regular spiking	35	18	22
Morphology			
<i>number of cells</i>	8	23	20
Cell body perimeter (μm) ^{ns}	134,6 ± 8,59	132,1 ± 9,80	134,0 ± 6,94
Dendrites			
Number of nodes ^{ns}	12,8 ± 0,78	11,3 ± 0,68	12,4 ± 0,72
Number of endings ^{ns}	14,5 ± 0,86	13,8 ± 0,71	13,7 ± 0,71
Length (mm) ^{ns}	6,23 ± 0,85	5,89 ± 0,54	6,31 ± 0,48
Angle Spread (°) ^{ns}	115,0 ± 9,90	141,7 ± 9,71	117,5 ± 7,94
Axonal morphology (# cells)			
Number of nodes ^{ns}	3	8	6
Number of endings ^{ns}	7,3 ± 2,33	4,5 ± 1,30	5,8 ± 1,25
Number of endings ^{ns}	8,0 ± 2,65	5,4 ± 1,35	5,8 ± 1,25
Length (mm) ^{ns}	2,91 ± 0,82	3,64 ± 1,00	3,43 ± 0,65

****p < 0.0001 ; ***p < 0.0005 ; ** p < 0.01 ; * p < 0.05; ns , no statistical difference; p values as given by the Kruskal and Wallis test. All data are given as mean ± SEM. AP, action potential; Cm, membrane capacitance; Rm, membrane resistance; Vthresh, action potential threshold; Vrest, resting membrane potential; fAHP, fast afterhyperpolarization.

We next probed that lower excitability *in vivo* by immunolabelling the Immediate Early Gene (IEG) c-Fos. We first used E12.5 tamoxifen-treated Ngn2Ai14 mice housed in a regular home cage (n=3) and observed a sparse pattern of c-Fos positive cells (Figure 5a), none of which was co-labeled with Td-Tomato, indicating that none of the early born granule cells was recruited in basal conditions. In order to increase the likelihood to label neurons, we next provided the former mice littermates unlimited access to a running wheel (for 4 consecutive

days), since running was previously shown to induce a 5-fold increase in the number of c-Fos positive cells in the Dentate Gyrus (Clark et al., 2011). However, even in these conditions, none of the early born granule cell stained with Td-Tomato was also positive for c-Fos, indicating a low recruitment probability of these cells (Figs. 5b and c). We thus conclude that, probably related to their lower excitability, early born granule cells, including SGCs are not prone to be spontaneously part of the small active minority of the DG in basic behavioral conditions. However, semilunar cells were previously shown to contribute to the sustained depolarization of hilar interneurons, possibly through the activation of Mossy cells (Larimer and Strowbridge, 2010). Given that Mossy cells were proposed to contribute to the earlier waves of glutamatergic neuron production (Li et al., 2008) in the Dentate Gyrus, we next asked whether they could form isochronic circuits (Deguchi et al., 2011) with early born granule cells.

Mossy cells are contacted by early born granule cells: temporally-matched circuits in the adult DG

As mentioned previously, E12.5-labelled neurons in the DG comprised cells in the hilus with a typical Mossy Cell (MC) morphology including the presence of thorny excrescences (Figure 6), which do not exist on interneurons or granule cells (Scharfman, 2016). We

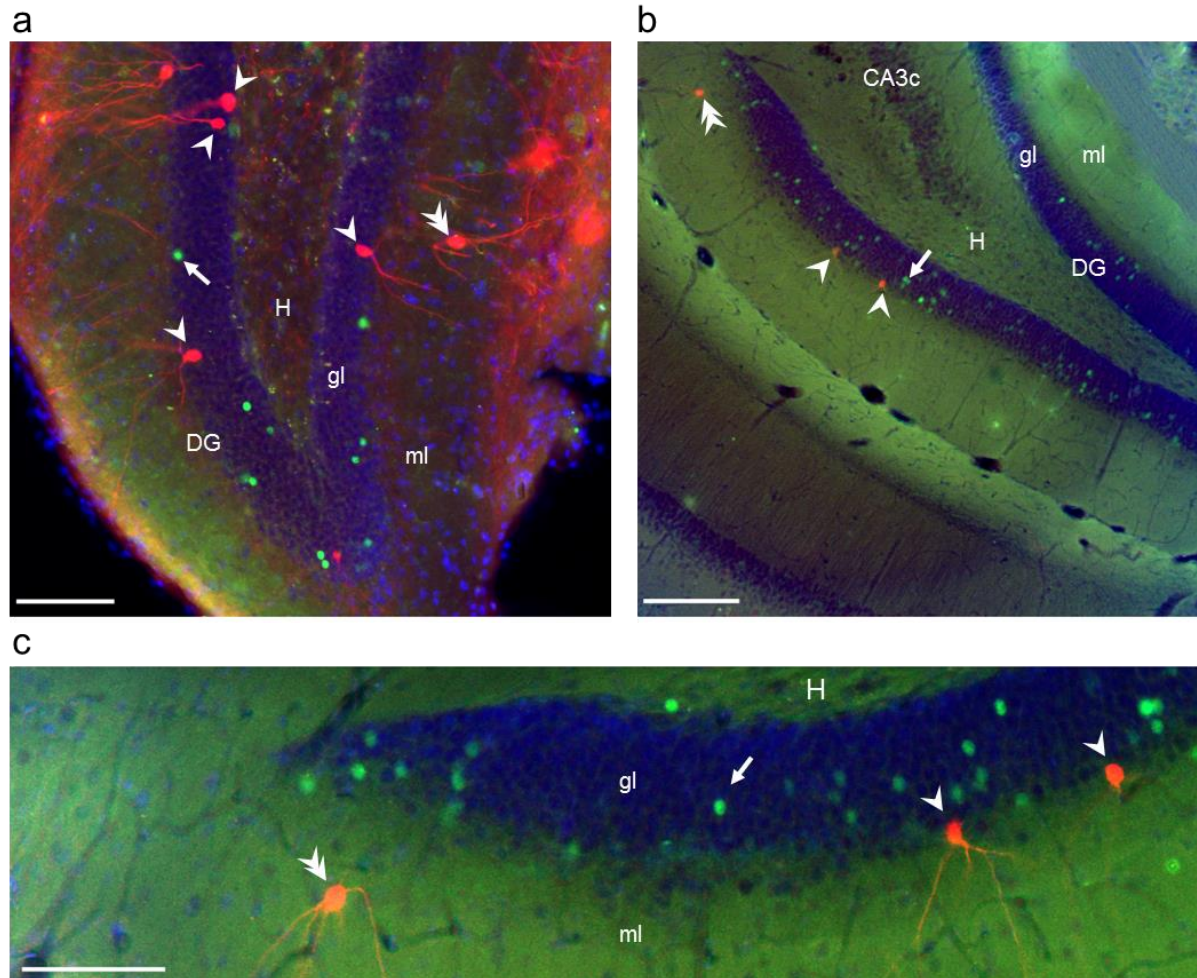
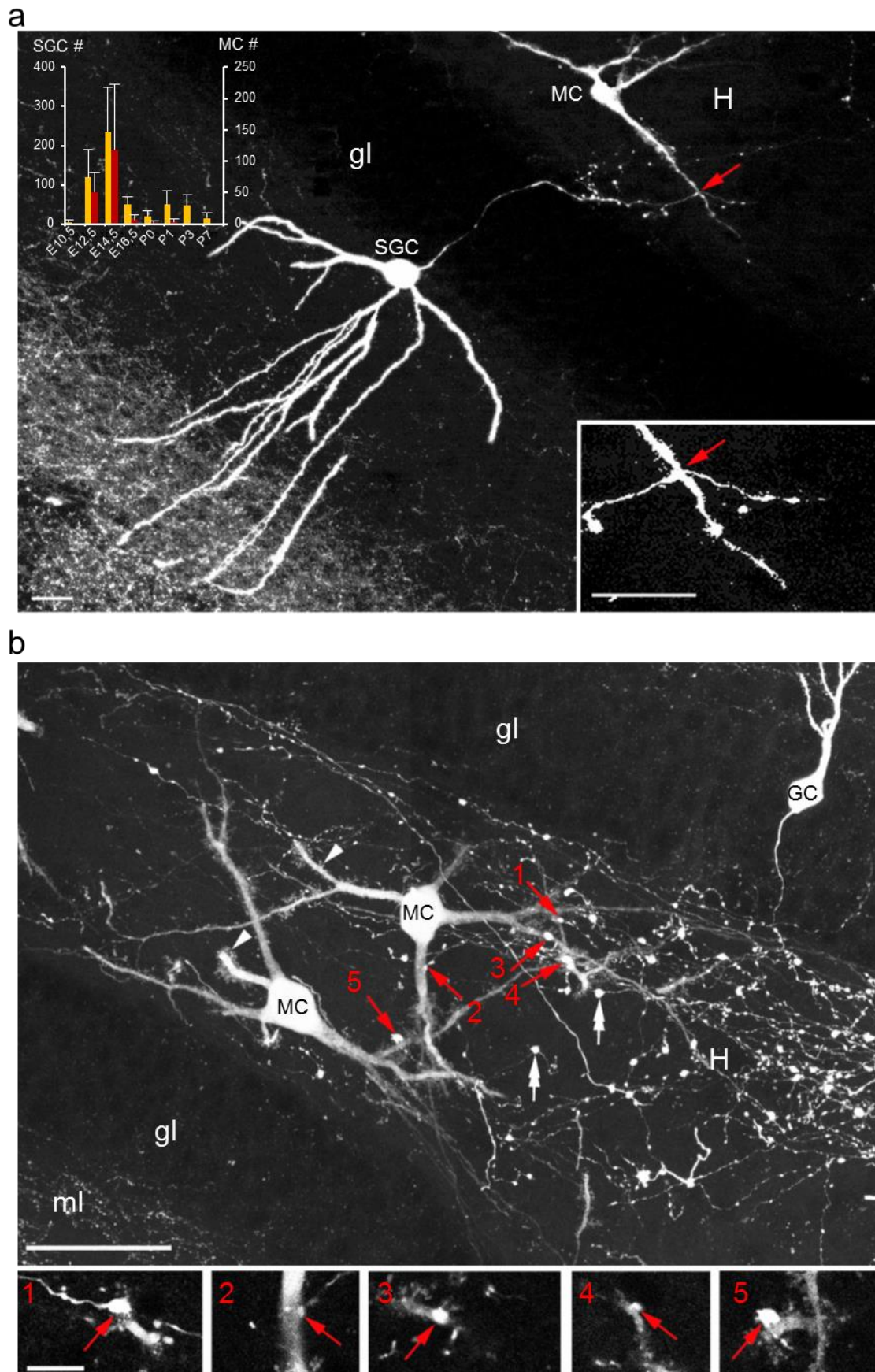


Figure 5 The influence of free access to a running wheel on c-Fos labelling in the Dentate Gyrus (DG). (a-b) None of the early born SGCs (double arrow heads) or GCs (arrow heads) displayed c-Fos labelling neither in conventional housing conditions (a) nor when given free access to a running wheel (b and c), albeit the number of c-Fos-labelled cells increased in the former environment (green, arrows). Scale bars = 100 μ m in a; 200 μ m in b and c. gl, granule cell; H, hilus; ml, molecular layer. Counterstaining was performed with DAPI (blue).

therefore quantified the developmental profile of MCs production and found that it nicely paralleled that of SGCs, with a peak at E14.5 (Figure 6a, insert).

We next asked whether early born GCs/SGCs could indeed display functional synaptic contacts with early born MCs. To this aim, we first attempted to perform paired-recordings in E12.5 tamoxifen-treated Ngn2/Ai14 mice. However, the low



can be labelled with tdTomato in the hilus (H) of *Ngn2CreERTM;Ai14:LoxP* (Td-Tomato) mice following tamoxifen administration at E12.5; other early born neurons such as semilunar granule cells (SGC) and granule cells (GC) are also visible. Inset histogram in **(a)** plots the developmental profile of MCs production (red) and SGCs (orange) as a function of tamoxifen administration date. Numerous mossy fibers (double arrows in **b**) run throughout the hilus. The axon of a representative SGC goes through the granular layer (gl), arborizes in the hilus (H) and contacts a mossy cell dendrite (red arrows in **a**). Five putative contacts (red numbers and arrows) between mossy fibers and two mossy cells dendrites are shown in **b**. Large images in **a** and **b** are confocal maximal-intensity projection of z stacks, insert in **a** and bottom images in **b** are high-magnification single optical sections from (a) and (b) z stacks, respectively). Scale bars = 20 μm in **a**; 50 μm and 10 μm in upper and bottom images in **b**, respectively.

number of labeled cells in the DG per slice (about 2 cells), combined to high chances to observe cut axons by the slicing made it almost impossible to get any successful recording despite several attempts (n=27 mice, 12 paired-recorded cells). We therefore decided to look for putative contacts using morphological inspection of labeled cells and characteristic mossy axons. Interestingly, close apposition of mossy terminals and/or en-passant varicosities from GCs or SGCs could frequently be observed on MC proximal dendrites; we found that 80% of MCs (12 out of 15 recovered cells) received a mean of 2.5 ± 0.5 putative contacts (Figure 6b). This clearly indicates that semilunar granule cells and mossy cells form a specific pioneer circuit embedded within the adult Dentate Gyrus.

Discussion

This study analyses the morpho-functional diversity of glutamatergic neurons in the adult hippocampus from a developmental perspective. Using inducible genetic fate-mapping combined to unbiased multiparametric electrophysiological analysis, we uncover a functional subtype of excitatory neuron in the Dentate Gyrus that is sparsely scattered in the granular layer and comprises critical components of the DG network, including the semilunar cells. Early born neurons in the granular layer are not intrinsically prone to be active, but together with their early born partners in the hilus, the MCs, they form a hidden scaffold that may be recruited in specific conditions to gate information transfer to the hippocampus.

We find that temporal origin specifies physiology rather than morphology. Indeed, early born glutamatergic neurons issued from Ngn2-expressing embryonic progenitors were found here to develop into a morphologically diverse but electrophysiologically distinct population of granule cells. Indeed, neurons labelled with E12.5 tamoxifen administration comprised both semilunar granule cells in the molecular layer and granule cells distributed throughout the granular layer. Such morphological diversity among early born cells is reminiscent of our previous observations for CA3 early born glutamatergic cells (Marissal et al., 2012) as well as for CA3 and CA1 early born GABAergic neurons (Picardo et al., 2011), which comprised cells with different dendritic and axonal arbors, different somatic locations and expressing various neurochemical contents. Therefore, it is possible that morphological diversity is a hallmark of early born cortical neurons. Here we used the temporal schedule for Ngn2 expression to label early born glutamatergic cells. It was shown that most DG neurons originate from Ngn2-expressing progenitors, a transcription factor expressed at the earliest stages of DG development (Galichet et al., 2008). It will be interesting to find out whether early born neurons are generated from a specific pool of progenitors. Increasing evidence indicates that glutamatergic neurons are issued from the same multipotent progenitors and that fate distinctions are mostly temporally controlled. Interestingly, progenitor potential was shown to be progressively, temporally restricted, with early cortical progenitors being multipotent in comparison to later ones (Lodato et al., 2015). This could partly account for the morphological diversity of early born DG neurons. However, rather than genetic predetermination, the characteristic morphological traits of SGCs may well also just arise from the fact that they develop in less crowded environments, more permissive for the widening of the dendritic arbor. Early born granule cells are morphologically heterogeneous, but share a remarkable set of electrophysiological characteristics. Indeed, our unbiased multiparametric analysis segregated the granule cell population into three classes, one of which comprised early born granule cells with the following electrophysiological traits: (1) a higher threshold for AP generation; (2) faster APs; (3) a lower gain and lower maximal firing rate; (4) a stronger frequency adaptation. Therefore, both active and passive intrinsic

properties of these cells are different and converge into a lower probability to fire action potentials. It is interesting to note that this is in contrast with early born GABA and glutamatergic cells in CA3 which expressed a higher excitability (Marissal et al., 2012; Picardo et al., 2011). Deep CA1 pyramidal neurons, which are most likely born before their more superficial counterparts, also differed in their intrinsic membrane excitability displaying a more hyperpolarized resting membrane potential and a smaller h current (Lee et al., 2014; Maroso et al., 2016). Both characteristics, combined with a stronger inhibitory drive (Lee et al., 2014; Valero et al., 2015), may also render these cells less excitable. In the same way, granule cells originating from adult neurogenesis are less excitable as age proceeds (Alme et al., 2010). How such physiological specificity may be temporally-regulated remains to be determined. Single-cells are known to display tightly orchestrated sequences of spontaneous activity patterns (Allene et al., 2012), which in turn may contribute to the maturation of physiological specificity. The other classes emerging from the clustering segregated cells that were randomly targeted, are most likely GCs issued from later developmental schedules and cells that were likely to originate from adult neurogenesis. The latter assumption is supported by the fact that the passive properties of these cells, including their capacitance and resistance, were comparable to those of immature GCs recorded in P15 mice. Smaller capacitances and higher resistances typically reflect more immature stages of development.

In the CA3 region of the hippocampus, early born GABAergic and glutamatergic neurons develop into specific functional subtypes that are master regulators of local networks as they include hub cells (Picardo et al., 2011) or pacemakers (Marissal et al., 2012). This finding also holds for GABAergic neurons in the developing entorhinal cortex (Mòdol et al., 2017). Here we extend this rule to the DG where early born neurons develop into semilunar cells, a cell type that was previously proposed as a cellular substrate for working memory (Larimer and Strowbridge, 2010). We assert that our fate-mapped neurons comprise semilunar cells for several reasons. First, these cells recapitulate the previously described morphological traits of semilunar cells, in particular their ectopic location in the IML and typical wider

dendritic spread (Gupta et al., 2012; Ramon y Cajal, 1909; Williams et al., 2007). The only feature that we were not able to recover in our experimental dataset was the presence of associational axon collaterals in the IML and granular layer (Gupta et al., 2012; Williams et al., 2007). These were previously observed in a small fraction (about 30%) of biocytin-filled semilunar cells in juvenile rats (P14-25 in (Williams et al., 2007) and around P30 in (Gupta et al., 2012)). Since all of our reconstructed SGCs were sampled from mice aged P60 and beyond, these collaterals may correspond to an immature attribute of SGCs that is no longer observed at older ages; alternatively, this discrepancy may arise from a species difference. Our experimental sample also displayed some of the previously reported electrophysiological characteristics of semilunar cells, including a lower resistance and a stronger spike frequency adaptation (Gupta et al., 2012), although the latter was not observed by others (Williams et al., 2007). Therefore, the above observations indicate that semilunar granule cells arise from the earliest stages of Dentate Gyrus embryogenesis. Their peak of generation is around E14.5 and they represent almost half of the granule cells generated at E12.5. Interestingly, we also confirm that MCs are the other archetypic subtype of DG glutamatergic neuron among the earliest generated. In addition, early born MCs receive putative synaptic contacts from temporally-matched granule cells and SGCs. Such putative contacts can be found in 80% of the labelled MCs, which is a higher ratio of the connection probability previously probed electrophysiologically (less than 10% connection probability between SGCs and MCs according to (Williams et al., 2007)). This temporally-matched circuit is consistent with previous studies (Deguchi et al., 2011). In addition, we observed numerous E12.5 fate-mapped axons within the IML, the privileged site of axonal arborization of MCs (see Figure 1). Since SGCs are located in the IML, it is also possible that these cells in turn receive inputs from MCs, thus forming a close-loop circuit of pioneer neurons. In this study, the embedment of early born cells within GABAergic networks has not been examined. However, a previous study suggests that SGCs may be preferentially targeted by dendrite-projecting interneurons, including somatostatin-containing ones, rather than PV-expressing perisomatic cells (Gupta et al., 2012). Given that somatostatin-expressing

neurons are generated earlier than their perisomatic counterparts, with some at very early stages (Picardo et al., 2011), we can speculate that early born granule cells are also preferentially contacted by early born GABA neurons in the DG, as previously shown in CA1 for the PV innervation onto deep versus superficial pyramidal cells (Donato et al., 2015). Regardless, probably the most unexpected and unique arrangement of early born granule cells uncovered here, is the absence of radial layering, a feature that was previously reported only for cortical GABAergic neurons derived from the caudal ganglionic eminence (Miyoshi et al., 2010).

Although early born granule cells are critically positioned to control information transfer into the hippocampus, they are also less excitable. Accordingly, our c-Fos staining experiments indicate that they are not part of the small subset of cells active regardless of the environmental conditions or cognitive load of the task (Buzsaki and Mizuseki, 2014). Behavioral contexts more specifically engaging hippocampus-dependent tasks may be more favorable to observe such activation. Hence, deep CA1 pyramidal cells were shown to better represent behaviorally-relevant task information than superficial ones (Danielson et al., 2016). However, overall, cells in the granule cell layer rarely fire during behavior with less than 10% of them having a place field in a given environment. This is in contrast with MCs, which were recently shown to be active in most environments, typically displaying multiple place fields (Danielson et al., 2017; Goodsmith et al., 2017). It is possible that such spatially tuned multiple firing pattern is conveyed to MCs by SGCs and early born GCs. The DG is generally thought to perform a pattern separation computation, receiving overlapping inputs from entorhinal cortex and sending less correlated outputs to CA3. It may well be that the silent network of early born granule cells is only activated in specific conditions where context and integrated spatio-temporal information need to be bound, or alternatively in pathological conditions where their intrinsic brake is alleviated as shown for SGCs in epilepsy (Gupta et al., 2012). Our study renders this unique population of cells accessible to the conditional

expression of genes of interest, including optogenetic vectors or calcium indicators, which opens the way for exploring their role *in vivo*, in health and disease.

Materials and methods

Inducible genetic fate mapping

All protocols were performed under the guidelines of the French National Ethic Committee for Sciences and Health report on “Ethical Principles for Animal Experimentation” in agreement with the European Community Directive 86/609/EEC under agreement #01413.03. All efforts were made to minimize pain and suffering and to reduce the number of animals used.

In order to birthdate developmentally-generated glutamatergic cells in the Dentate Gyrus, we used the fact that most cortical glutamatergic neurons originate from progenitors expressing a combination of transcription factors including the proneural bHLH transcription factor Neurogenin2 (*Ngn2*). *Ngn2* is expressed in both neuronal progenitors and early postmitotic neurons in the VZ and SVZ (Hand et al., 2005). *Ngn2* expression is transitory and rapidly downregulated as soon as cells leave the cell cycle and start migrating towards their ultimate position (Galichet et al., 2008; Hand et al., 2005; Ozen et al., 2007). To follow the fate of glutamatergic neurons within the adult DG, *Ngn2*Cre^{ERTM/wt}/*Ai14:LoxP*^{+/-} (Miyoshi et al., 2010; Zirlinger et al., 2002) male mice were crossed with 7- to 8-weeks-old wild-type Swiss females (C.E Janvier, France) for offspring production. To induce Cre activity during embryogenesis, tamoxifen was delivered to pregnant mothers (2mg per 30g of body weight of tamoxifen solution (10 mg/ml prepared in corn oil Sigma, St. Louis, MO) at embryonic days E10.5, 12.5, 14.5, 16.5 post vaginal plug. To induce postnatal Cre activity, P0 (postnatal day- zero), P1, P3 and P7 pups were intraperitoneally injected with the tamoxifen solution. Recombination of the reporter allele is achieved within 24 hours upon administration of tamoxifen. For

simplification purposes *Ngn2*^{CreERTM/wt}/*Ai14:LoxP*^{+/wt} mice pups expressing Td-tomato are named tamoxifen-treated *Ngn2/Ai14*.

We assessed unspecific labelling in pups issued from non-tamoxifen-gavaged mothers. We have quantified the number of Td-Tomato expressing neurons per 70 µm-thick horizontal and coronal hippocampal sections from adult mice. We show that the “leaky” expression resulting in non-tamoxifen-dependent Cre-mediated recombination (Madisen et al., 2010) is negligible (0.8% of TdTomato expressing cells, n=10 brains).

Morphological analysis

Adult tamoxifen-treated *Ngn2/Ai14* animals were deeply anesthetized with a ketamine (250 mg /kg) and xylazine (25 mg /kg) solution (i.p.) and transcardially perfused (1ml/g) with 4% paraformaldehyde in saline phosphate buffer (PBS). Brains were post-fixed overnight, then washed in PBS. Seventy µm-thick horizontal or coronal brain sections were sliced (E10.5, n=2 brains; E12.5, n=5 brains; E14.5, n=5 brains; E16.5, n=4 brains; P0, n=4 brains; P1, n=5 brains; P3, n=5 brains; P7, n=4 brains).

In order to quantify Td-tomato labelled neurons, granule cells, semilunar granule cells and mossy cells were manually counted according to previously established morphological criteria (Larimer and Strowbridge, 2010) using Zeiss Axiolmager Z2 microscope.

The distribution of Td-tomato labelled neurons throughout the granule cell layer after tamoxifen administration at different time points was assessed manually by estimating the position of the labelled cells within the thickness of the granular layer normalized to 1. Therefore, a cell scoring at 0.5 is located in the middle of the granular layer while a score from 0.5 to 1 or from 0 to 0.5 located the cell towards the outer or inner part of the granular layer, respectively.

A total of 53 and 14 Neurobiotin-filled neurons were recovered for morphological analysis from adult or P15 mice, respectively. Slices were fixed overnight at 4 °C in Antigenfix (www.diapath.com), rinsed in PBS containing 0.3% Triton X-100 (PBST) and incubated overnight at room temperature in Al488-streptavidin (1/1000 in PBST; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Stacks of optical sections (pixel size 0.24 μm , z step = 0.4 μm) were collected using a Leica TCS SP5-X confocal microscope (488 nm laser wavelength). Neuronal reconstruction and post-hoc analysis were performed with a computer-assisted system (Neurolucida, MicroBrightfield). Morphological variables included dendritic and axonal lengths, somatic, dendritic and axonal surfaces, number of dendritic and axonal endings and nodes, and dendritic angle spread.

Seventy microns-thick sections from E12.5 tamoxifen-treated Ngn2/Ai14 mice (n=3 mice) were randomly examined to search for contacts between mossy fibers and mossy cells within the hilus using a Zeiss LSM 510 confocal microscope (561 nm laser wavelength, pixel size 0.068 μm , z step 0.46 μm).

Immunolabelling for the Immediate Early Gene (IEG) c-Fos was used as a proxy for cell activity within early born glutamatergic cells in DG in two groups of E12.5 tamoxifen-treated Ngn2/Ai14 mice from the same litter. The first group of mice (n=3) was housed in a regular home cage. The second group (2 x n=3) had unlimited access to a running wheel (for 4 consecutive days). After the 4 days period, the mice were perfused as detailed above. Brains were processed and immunolabelled for c-Fos the same days for the two mouse groups using a monoclonal rabbit c-Fos antibody (1/500; #2250, Cell Signaling Technology, Inc).

Electrophysiology

Horizontal hippocampal slices (350 μm) were prepared from adult ($>\text{P50}$) and 15-days-old (P15) mice, wild-type for control or E12.5 tamoxifen-treated Ngn2/Ai14, with a Leica VT1200 Vibratome using the Vibrocheck module in ice-cold oxygenated modified artificial cerebrospinal fluid (0.5 mM CaCl_2 and 7 mM MgSO_4 ; NaCl replaced by an equimolar concentration of choline). Slices were then transferred for rest (1 hour) in oxygenated normal aCSF containing (in mM): 126 NaCl, 3.5 KCl, 1.2 NaH_2PO_4 , 26 NaHCO_3 , 1.3 MgCl_2 , 2.0 CaCl_2 , and 10 D-glucose, pH 7.4.

A total of 137 cells within the DG were recorded in hippocampal slices of mice aged P15 (GC, $n=10$; SGC, $n=21$) and $> \text{P50}$ (GC, $n=81$; SGC, $n=25$) for morpho-physiological characterization. Neurons were held in current-clamp using a patch-clamp amplifier (HEKA, EPC10) in the whole-cell configuration. Intracellular solution composition was (in mM): 130 K-methyl SO_4 , 5 KCl, 5 NaCl, 10 HEPES, 2.5 Mg-ATP, 0.3 GTP and 0.5 % Neurobiotin. No correction for liquid junction potential was applied. The osmolarity was 265–275 mOsm, pH 7.3. Microelectrodes resistance was 7–10 MOhms. Uncompensated access resistance was monitored throughout the recordings. Values below 20MOhms were considered acceptable and the results were discarded if it changed by more than 20%. Whole-cell measurements were filtered at 3 kHz using a patch-clamp amplifier. Recordings were digitized online (10 kHz) with an interface card to a personal computer and acquired using Axoscope 7.0 software. The resting potential (V_{rest}) was measured as the membrane potential baseline value obtained in current-clamp mode in the absence of current injection. Firing patterns at the rheobase and at incremented depolarizing steps, Action Potential (AP) threshold ($V_{\text{threshold}}$, mV), duration (the thickness at $\frac{1}{2}$ of the AP amplitude), accommodation (amplitude difference between the first and the last AP of a step, mV) and amplitude (AP amplitude, mV), fast and medium after-hyperpolarization (fAHP, ms), maximum firing rate (the maximum number of APs per step duration), gain (the slope of the curve representing

the number of APs as a function of the injected current), membrane capacitance (C_m , pF) and resistance (R_m , $m\Omega$) were measured offline using Clampfit. To characterize firing patterns, we calculated for each cell at the rheobase and at the maximum firing step, a “fraction of adaptation” (% adaptation) that represented the ratio between the spikes occurring within the first 10% temporal window of the step divided by the total number of spikes evoked by the depolarization. Cells were classified as: (1) delayed firing if this value was 0; (2) adapting if this value ranged between 20 and 80%; (3) strongly adapting if it exceeded 80%; (4) regular: if this value was in the range of 10% with an interspike interval that did not vary significantly from visual inspection.

Cluster Analysis of electrophysiological parameters

The term “cluster analysis” refers to a set of multivariate exploratory statistical methods that group objects (cases) of a data set based on their degree of similarity. All cases are first plotted in a multidimensional space defined by all the measures variables; we included in this study 11 physiological variables: membrane resistance, membrane capacitance, resting membrane potential, AP threshold, AP duration, AP amplitude, AHP, accommodation, % of adaptation, maximum firing rate and gain. A certain measure of proximity is chosen (distance), and clusters are eventually formed by the cases that fulfill the criteria of the clustering method selected. The cluster analysis was performed with Euclidean distances by using Ward’s method (Statistica Software) only with SGCs and GCs ($n=107$) recorded in adult animals where the 11 physiological variables were measured (see Table 2). According to Ward’s method, cases are assigned to clusters so that the variance (sum of squared deviation from the mean) within each cluster is minimized. The analysis resulted in three well-defined clusters.

References

- Allene C**, Picardo MA, Becq H, Miyoshi G, Fishell G, Cossart R. 2012. Dynamic Changes in Interneuron Morphophysiological Properties Mark the Maturation of Hippocampal Network Activity. *The Journal of Neuroscience* **32**:6688–6698. doi: [10.1523/JNEUROSCI.0081-12.2012](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0081-12.2012).
- Alme CB**, Buzzetti RA, Marrone DF, Leutgeb JK, Chawla MK, Schaner MJ, Bohanick JD, Khoboko T, Leutgeb S, Moser EI, Moser M, McNaughton BL, Barnes CA. 2010. Hippocampal Granule Cells Opt for Early Retirement. *Hippocampus* **1123**:1109–1123. doi: [10.1002/hipo.20810](https://doi.org/10.1002/hipo.20810).
- Altman J**, Bayer SA. 1990. Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods. *The Journal of Comparative Neurology* **301**:365–381. doi: [10.1002/cne.903010304](https://doi.org/10.1002/cne.903010304).
- Buzsaki G**, Mizuseki K. 2014. The log-dynamic brain: how skewed distributions affect network operations. *Nature Review Neuroscience* **23**:1–7. doi: [10.1038/nrn3687](https://doi.org/10.1038/nrn3687).
- Clark PJ**, Bhattacharya TK, Miller DS, Rhodes JS. 2011. Induction of c-fos, Zif268, and from Acute Bouts of Voluntary Wheel Running in new and pre-existing Adult Mouse Hippocampal Granule Neurons. *Neuroscience* **184**:16–27. doi: [10.1016/j.neuroscience.2011.03.072](https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.03.072).
- Danielson NB**, Kaifosh P, Zaremba JD, Lovett-barron M, Tsai J, Denny CA, Balough EM, Goldberg AR, Drew LJ, Hen R, Losonczy A, Kheirbek MA. 2016. Distinct Contribution of Adult-Born Hippocampal Granule Cells to Context Encoding. *Neuron* **90**:101–112. doi: [10.1016/j.neuron.2016.02.019](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.02.019).
- Danielson NB**, Turi GF, Ladow M, Chavlis S, Petrantonakis PC, Danielson NB, Turi GF, Ladow M, Chavlis S, Petrantonakis PC. 2017. In Vivo Imaging of Dentate Gyrus Mossy Cells in Behaving Mice. *Neuron* **93**:552–559.e4. doi: [10.1016/j.neuron.2016.12.019](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.12.019).
- Deguchi Y**, Donato F, Galimberti I, Cabuy E, Caroni P. 2011. Temporally matched subpopulations of selectively interconnected principal neurons in the hippocampus. *Nature Neuroscience* **14**:495–504. doi: [10.1038/nn.2768](https://doi.org/10.1038/nn.2768).
- Donato F**, Chowdhury A, Donato F, Chowdhury A, Lahr M, Caroni P. 2015. Early- and Late-Born Parvalbumin Basket Cell Subpopulations Exhibiting Distinct Regulation and Roles in Learning. *Neuron* **85**:770–786. doi: [10.1016/j.neuron.2015.01.011](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.01.011).
- Galichet C**, Guillemot F, Parras CM. 2008. Neurogenin 2 has an essential role in development of the dentate gyrus. *Development* **135**:2031–2041. doi: [10.1242/dev.015115](https://doi.org/10.1242/dev.015115).
- Goodsmith D**, Chen X, Wang C, Burgalossi A, Christian KM, Knierim JJ. 2017. Spatial Representations of Granule Cells and Mossy Cells of the Dentate Gyrus. *Neuron* **93**:677–690.e5. doi: [10.1016/j.neuron.2016.12.026](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.12.026).
- Gupta A**, Elgammal FS, Proddutur A, Shah S, Santhakumar V. 2012. Decrease in Tonic Inhibition Contributes to

- Increase in Dentate Semilunar Granule Cell Excitability after Brain Injury. *The Journal of Neuroscience* **32**:2523–2537. doi: [10.1523/JNEUROSCI.4141-11.2012](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4141-11.2012).
- Hand R**, Bortone D, Mattar P, Nguyen L, Heng JI, Guerrier S, Boutt E, Peters E, Barnes AP, Parras C, Schuurmans C, Guillemot F, Polleux F. 2005. Phosphorylation of Neurogenin2 Specifies the Migration Properties and the Dendritic Morphology of Pyramidal Neurons in the Neocortex. *Neuron* **48**:45–62. doi: [10.1016/j.neuron.2005.08.032](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.08.032).
- Kron MM**, Zhang H, Parent JM. 2010. The Developmental Stage of Dentate Granule Cells Dictates Their Contribution to Seizure-Induced Plasticity. *The Journal of Neuroscience* **30**:2051–2059. doi: [10.1523/JNEUROSCI.5655-09.2010](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5655-09.2010).
- Laplagne DA**, Esposito MS, Piatti VC, Morgenstern NA, Zhao C, Praag H Van, Gage FH, Schinder AF. 2006. Functional Convergence of Neurons Generated in the Developing and Adult Hippocampus. *PLoS One* **4**:e409. doi: [10.1371/journal.pbio.0040409](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040409).
- Laplagne DA**, Kamienkowski JE, Espósito MS, Piatti VC, Zhao C, Gage FH, Schinder AF. 2007. Similar GABAergic inputs in dentate granule cells born during embryonic and adult neurogenesis. *The European Journal of Neuroscience* **25**:2973–2981. doi: [10.1111/j.1460-9568.2007.05549.x](https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05549.x).
- Larimer P**, Strowbridge BW. 2010. Representing information in neuronal cell assemblies: Persistent activity in the dentate gyrus mediated by semilunar granule cells. *Nature Neuroscience* **13**:213–222. doi: [10.1038/nn.2458](https://doi.org/10.1038/nn.2458).
- Lee SH**, Marchionni I, Bezaire M, Varga C, Danielson N, Lovett-Barron M, Losonczy A, Soltesz I. 2014. Parvalbumin-positive basket cells differentiate among hippocampal pyramidal cells. *Neuron* **82**:1129–1144. doi: [10.1016/j.neuron.2014.03.034](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.03.034).
- Li G**, Berger O, Mercedes SH, Wu PN, Pleasure SJ. 2008. Hilar Mossy Cells Share Developmental Influences with Dentate Granule Neurons. *Developmental Neuroscience* **30**:255–261. doi: [10.1159/000110347](https://doi.org/10.1159/000110347).
- Lodato S**, Shetty AS, Arlotta P. 2015. Cerebral cortex assembly : generating and reprogramming projection neuron diversity. *Trends in Neuroscience* **38**:117–125. doi: [10.1016/j.tins.2014.11.003](https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.11.003).
- Madisen L**, Zwingman TA, Sunkin SM, Oh SW, Hatim A, Gu H, Ng LL, Palmiter RD, Hawrylycz MJ, Allan R, Lein ES, Zeng H. 2010. A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nature Neuroscience* **13**:133–140. doi: [10.1038/nn.2467](https://doi.org/10.1038/nn.2467).
- Marissal T**, Bonifazi P, Picardo MA, Nardou R, Petit LF, Baude A, Fishell GJ, Ben-Ari Y, Cossart R. 2012. Pioneer glutamatergic cells develop into a morpho-functionally distinct population in the juvenile CA3 hippocampus. *Nature Communication* **3**:1316. doi: [10.1038/ncomms2318](https://doi.org/10.1038/ncomms2318).
- Maroso M**, Szabo GG, Kim HK, Lee S, Soltesz I, Maroso M, Szabo GG, Kim HK, Alexander A, Bui AD, Lee S, Lutz B. 2016. Cannabinoid Control of Learning and Memory through HCN Channels. *Neuron* **89**:1059–1073. doi: [10.1016/j.neuron.2016.01.023](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.01.023).

- Miyoshi G**, Hjerling-leffler J, Karayannis T, Sousa VH, Butt JB, Battiste J, Johnson JE, Machold RP, Fishell G. 2010. Genetic fate mapping reveals that the caudal ganglionic eminence produces a large and diverse population of superficial cortical interneurons. *The Journal of Neuroscience* **30**:1582–1594. doi: [10.1523/JNEUROSCI.4515-09.2010](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4515-09.2010).
- Mòdol L**, Sousa VH, Malvache A, Tressard T, Baude A, Cossart R. 2017. Spatial Embryonic Origin Delineates GABAergic Hub Neurons Driving Network Dynamics in the Developing Entorhinal Cortex. *Cerebral Cortex* in press.
- Nakashiba T**, Cushman JD, Pelkey KA, Renaudineau S, Buhl DL, Mchugh TJ, Barrera VR, Chittajallu R, Iwamoto KS, Mcbain CJ, Fanselow MS, Tonegawa S. 2012. Young Dentate Granule Cells Mediate Pattern Separation whereas Old Granule Cells Contribute to Pattern Completion. *Cell* **149**:188–201. doi: [10.1016/j.cell.2012.01.046](https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.046).
- Ozen I**, Galichet C, Watts C, Parras C, Guillemot F, Raineteau O. 2007. Proliferating neuronal progenitors in the postnatal hippocampus transiently express the proneural gene Ngn2. *The European Journal of Neuroscience* **25**:2591–2603. doi: [10.1111/j.1460-9568.2007.05541.x](https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05541.x).
- Picardo MA**, Guigue P, Bonifazi P, Batista-Brito R, Allene C, Ribas A, Fishell G, Baude A, Cossart R. 2011. Pioneer GABA cells comprise a subpopulation of hub neurons in the developing hippocampus. *Neuron* **71**:695–709. doi: [10.1016/j.neuron.2011.06.018](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.06.018).
- Ramon y Cajal S**. 1909. Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés. Paris: Maloine.
- Scharfman HE**. 2016. The enigmatic mossy cell of the dentate gyrus. *Nature Reviews Neuroscience* **17**:562–575. doi: [10.1038/nrn.2016.87](https://doi.org/10.1038/nrn.2016.87).
- Schmidt-Hieber C**, Jonas P, Bischofberger J. 2004. Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature* **429**:184–187. doi: [10.1038/nature02553](https://doi.org/10.1038/nature02553).
- Valero M**, Cid E, Averkin RG, Aguilar J, Sanchez-aguilera A, Viney TJ, Gomez-domínguez D, Bellistri E, Menendez de la Prida L. 2015. Determinants of different deep and superficial CA1 pyramidal cell dynamics during sharp-wave ripples. *Nature Neuroscience* **18**:1281–1290. doi: [10.1038/nn.4074](https://doi.org/10.1038/nn.4074).
- Williams PA**, Larimer P, Gao Y, Strowbridge BW. 2007. Semilunar Granule Cells: Glutamatergic Neurons in the Rat Dentate Gyrus with Axon Collaterals in the Inner Molecular Layer. *The Journal of Neuroscience* **27**:13756–13761. doi: [10.1523/JNEUROSCI.4053-07.2007](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4053-07.2007).
- Zirlinger M**, Lo L, McMahon J, McMahon AP, Anderson DJ. 2002. Transient expression of the bHLH factor neurogenin-2 marks a subpopulation of neural crest cells biased for a sensory but not a neuronal fate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**:8084–8089. doi: [10.1073/pnas.122231199](https://doi.org/10.1073/pnas.122231199).

Funding information

This work was supported by the European Research Council under the European Union's FP7 and Horizon 2020 research and innovation programs (grant agreement no. 242842 and 646925) as well as by the Agence Nationale pour la Recherche (ANR, Programme Blanc bilatéraux, ANR-13-ISV4-0002-01 "EbGluNet"). L.S. is funded by the « Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation ». A.B. and R.C. are supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS).

Acknowledgments

We thank Pr. David Anderson for providing the Ngn2CreERTM mouse. We thank T. Tressard, C. Pauchet and L. Cagnacci for their technical support. We also thank S. Pellegrino-Corby, M. Kurz, T. Titus and F. Michel from the INMED animal and imaging facilities (InMagic).

Author contributions

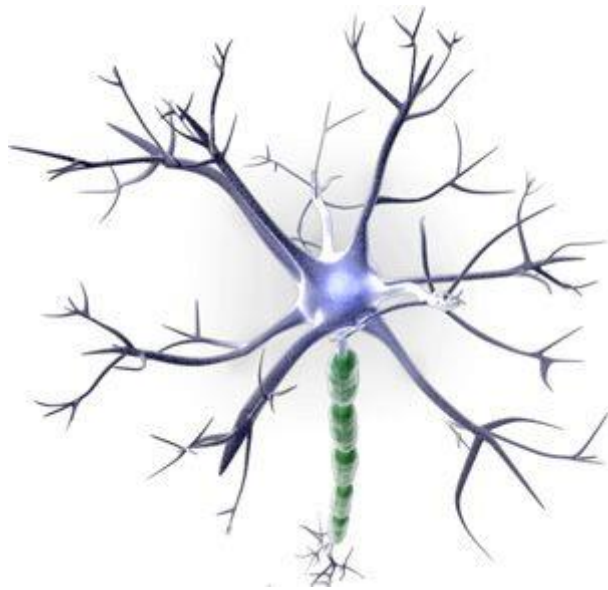
L.S. performed the experiments and analyzed the results. L.S., A.B. and R.C. designed the experiments and wrote the manuscript. R.C. designed the project

Competing interests

The authors declare no competing financial interests.

PARTIE 4

Discussion



Partie 4

Discussion

« Le but de la discussion ne doit pas être la victoire, mais l'amélioration. »

Joseph Joubert – écrivain français du 18eme siècle

I. Contraintes expérimentales

Dans cette partie, je vais exposer les contraintes expérimentales auxquelles j'ai été confrontée selon deux axes principaux : la lignée de souris transgénique, l'étude de neurones générés tôt.

A/ La lignée de souris transgéniques

Au cours de mon doctorat, j'ai dû faire face à plusieurs limites expérimentales. Pour la première, il s'agit des lignées des souris que nous avons utilisées. Au tout début de ma thèse, nous avons réalisé les premiers enregistrements électrophysiologiques chez des souris possédant un rapporteur fluorescence vert (GFP). Or cette fluorescence étant très faible, cela compliquait la tâche du ciblage des neurones d'intérêt qui étaient déjà assez rares. Nous sommes alors passés à une lignée de souris transgéniques possédant un rapporteur fluorescent rouge (td-tomato) qui a la propriété d'être beaucoup plus puissant. Or, nous nous sommes rendu compte que les souris exprimant ce rapporteur avaient plus de risque de déclencher son expression en l'absence de tamoxifène, rendant le marquage non-spécifique, ce que nous avons appelé « la fuite ».

Afin de valider notre modèle de souris, nous avons quantifié la probabilité de marquage non-spécifique en comptant les neurones fluorescents en l'absence d'injection de tamoxifène afin de donner une estimation de cette fuite. Nous avons pu voir qu'il y avait moins de 0,02% de cellules marquées (n=10 cerveaux) en l'absence de tamoxifène au

sein du gyrus denté, rendant la fuite grandement négligeable. Nous pouvions alors utiliser cette lignée de souris.

Une deuxième difficulté pour cette lignée de souris avec le rapporteur td-tomato, absente pour la lignée de souris GFP, a été observée au cours du premier mois d'enregistrement. Si l'intensité de la fluorescence a réellement été améliorée avec ce rapporteur, celle-ci avait cependant tendance à photo-blanchir très rapidement (disparition irréversible de la fluorescence), ce qui imposait une contrainte de temps très stricte pour la phase d'approche des cellules ; cette difficulté a été contournée en nous dotant d'un filtre diminuant l'illumination fluorescente entrante.

L'obtention de souris transgéniques pour l'enregistrement électrophysiologique et pour le « fate mapping » n'est pas chose aisée. Par exemple, il y a eu des périodes d'avortements successifs ou d'accouplement sans fécondation (présence du bouchon vaginale, mais pas de grossesse), ce qui a considérablement retardé les expériences de comptage (par exemple l'administration de tamoxifène à E16,5 pour le comptage provoque bien souvent un avortement chez la souris gestante).

Une autre difficulté rencontrée est que pour chaque portée obtenue après croisement la quantité de souris au bon génotype était tellement aléatoire que parfois nous nous retrouvions avec seulement deux animaux positifs (exprimant le rapporteur fluorescent) sur une portée de 16 souriceaux.

La dernière difficulté liée à cette lignée de souris, concerne les expériences d'enregistrements électrophysiologiques que j'ai réalisées à un stade juvénile. En effet, il nous faut rappeler que lorsque le tamoxifène déclenche l'expression de la protéine fluorescente, celle-ci est produite tout au long de la vie du neurone. En réalisant les enregistrements chez l'adulte, la quantité de protéine était optimale afin de bien visualiser les neurones. Mais en nous plaçant beaucoup plus tôt (P15, P11 et P12), la fluorescence était nettement moins importante, sans doute dû au fait que la production de protéine n'était pas encore suffisante pour nous permettre de bien discerner les neurones générés tôt. Cette limite s'est directement répercutée sur le nombre total de neurones que j'ai réussi à enregistrer à cet âge-là.

Pour conclure, nous avons dans un premier temps amélioré la visualisation des cellules générées tôt grâce au remplacement du rapporteur GFP par la td-tomato. Ensuite, nous avons validé le modèle de souris transgénique vis-à-vis de la « fuite » génétique. Enfin, nous avons optimisé les enregistrements électrophysiologiques en diminuant le photoblanchiment, en accélérant la phase d'approche de la cellule et en nous plaçant chez l'animal adulte, afin de permettre l'obtention d'une quantité importante de cellules enregistrées pour la suite de l'analyse.

B/ Etude de neurones rares et marquage à la neurobiotine

La neurogénèse embryonnaire, en particulier dans le GD, suit une gaussienne avec très peu de neurones formés dans les tous premiers stades de génèse de la structure, un pic de de génèse qui arrive le premier jour de la naissance et enfin une diminution progressive de la quantité de neurones produits.

Lorsqu'on se place à E12,5, nous nous situons dans les tous premiers stades de formation des neurones du GD et donc, il y a très peu de neurones produits dans le GD avec une très grande variabilité d'un animal à l'autre (voir *Article* page 123). Nous nous retrouvons quelques fois avec seulement deux ou trois neurones exprimant la td-tomato par cerveau. Cela explique en partie pourquoi nous n'avons bien souvent qu'un seul neurone généré tôt enregistré par animal.

Cela permet également de comprendre pourquoi les expériences d'enregistrement de paires de neurones générés tôt ont été compromises (voir *Résultats* page 116). En effet, il y avait trop de paramètres critiques à satisfaire pour réussir à avoir des résultats avant la fin du doctorat :

1. Avoir une CG ou une CGS générées tôt et en même temps une cellule moussue générée tôt, dans le même gyrus denté.
2. Que ces cellules soient dans le même champ. La platine du microscope n'étant pas solidaire des bras maintenant les électrodes, il est impossible d'enregistrer deux neurones éloignés de plus de 500 μm . Cette limite pourrait être résolue en optant pour une platine solidaire des bras de patch.

3. Parvenir à enregistrer les deux neurones en même temps. Ce qui ajoute encore un niveau de complexité car les cellules moussues ont une fluorescence beaucoup plus diffuse ce qui complique leur localisation et favorise le photo-blanchiment, en ajoutant qu'elles sont plus sujettes à l'éclatement que les CG ou les CGS.

4. Que les neurones soient connectés. Si l'un ne répond pas à la stimulation de l'autre, cela veut dire qu'ils ne sont pas connectés ou bien que l'axone et/ou la dendrite a été coupé lors du tranchage du cerveau par exemple. J'ai cependant pu enregistrer six paires de neurones, sans toutefois avoir pu montrer la présence de connexions fonctionnelles.

5. Que les deux neurones enregistrés, révélés après injection de neurobiotine, expriment également la td-tomato afin de confirmer leur nature de neurones pionniers, sans quoi nos résultats ne peuvent pas être exploités.

Ce dernier critère me permet d'introduire la dernière limitation de cette partie, à savoir la révélation des neurones enregistrés. En effet, nous ajoutons aux pipettes d'enregistrement de la neurobiotine qui est un traceur neuronal que nous pouvons ensuite révéler avec de la streptavidine couplée à un fluorophore. Ainsi nous pouvions visualiser les neurones que nous avons enregistrés. Or, nous avons perdu une grande quantité de données car nous n'avons pas pu révéler certains des neurones enregistrés. Cela arrive quand l'enregistrement est trop long ou lors du retrait de la pipette entraînant l'éclatement du neurone. Ces effets sont exacerbés par le fait que nous travaillons chez des animaux adultes dont les neurones sont moins résistants que chez des individus plus jeunes.

Afin de minimiser cet effet, j'ai dû optimiser au maximum les protocoles de stimulation afin de réduire le plus possible le temps d'expérience. De plus, j'ai opté pour un retrait lent et progressif de la pipette permettant à la cellule de se refermer en douceur. Grâce à ces stratégies, j'ai augmenté la quantité de neurones révélés sans pour autant atteindre un rendement excellent.

II. Discussion des résultats obtenus

Nous avons constaté que les CGS et les CM font partie des neurones pionniers du GD. Puis nous avons montré que les CGS et CG pionnières étaient rassemblées dans un même groupe, d'après l'analyse en cluster de leurs propriétés électrophysiologiques. Nous avons alors émis l'hypothèse que la date de naissance était déterminante, au-delà de la morphologie, pour conférer aux cellules glutamatergiques du gyrus denté une identité électrophysiologique ainsi qu'une localisation particulière. Nous avons par la suite vu que les CG avaient une localisation qui se démarquait des CG générées plus tardivement et que les CM pionnières étaient contactées par des fibres moussues de CG et CGS générées tôt. Enfin, nous avons vu que aucun de ces neurones pionniers (CG, CGS et CM) n'était actifs dans le gyrus denté de souris ayant eu un accès libre à des roues d'exercices.

Pour discuter de tous ces résultats, je souhaiterais dans un premier temps aborder les raisons possibles expliquant la localisation particulière des neurones pionniers. Dans un second temps, je détaillerai l'hypothèse de l'existence d'un réseau pionnier tissé entre les différents neurones générés tôt de différentes structures, idée illustrée par l'observation de contacts entre les CG et CGS pionnières avec les CM pionnières. Ensuite, j'aimerais discuter des résultats obtenus lors de la stimulation de la voie perforante au regard de l'étude américaine (Larimer and Strowbridge, 2010). Puis je discuterai du fait que les CG et CGS pionnières sont moins excitables que les CG générées plus tardivement. Je m'attacherai alors à apporter un éclairage un peu plus fonctionnel sur cette observation.

A/ Un échafaudage de neurones pionniers

Les CGS et CG générées tôt se retrouvent groupées ensemble en fonction de leurs propriétés électrophysiologiques. Mais ce n'est pas la seule particularité qui les rassemble. En effet, les CGS ont une localisation originale en ayant leur soma dans la couche moléculaire, alors que les CG générées au même moment se retrouvent dans

toute l'épaisseur de la couche granulaire, contrairement aux CG générées plus tardivement.

Si l'on considère réellement que ces deux types de neurones appartiennent à la même population, on remarque tout de suite qu'ils couvrent toutes les strates du GD depuis la couche moléculaire jusqu'à la couche granulaire interne. Ainsi en étant placé à tous les niveaux, ces cellules auraient en quelque sorte un échantillonnage complet de l'ensemble des afférences arrivant dans le GD. Cette caractéristique pourrait avoir un rôle crucial lors de l'établissement des réseaux au cours du développement, à l'âge adulte dans le maintien fonctionnel des structures ainsi que lors de l'addition de nouveaux neurones.

Nous pouvons également ajouter que, comparé à l'organisation radiale très stricte des soma des CG où les neurones du même âge se retrouvent sur la même ligne et sont en contact avec une très faible diversité de CG, les CG pionnières en se trouvant dans toutes les couches du stratum granulosum sont en contact avec des neurones de tous les âges.

Ce que nous pouvons avancer pour le moment, c'est que les neurones pionniers sont logiquement ceux créés lors de la première vague de neurogénèse située dans la ZSV (pour revue : Frotscher et al., 2007; Li and Pleasure, 2007), tandis que la majorité des neurones créés plus tardivement (durant les stades post-nataux) proviennent de la seconde zone de genèse établie par la migration des précurseurs de la zone sous-granulaire (ZSG) (Li and Pleasure, 2005, 2007). De ce fait, l'expression des facteurs de transcription pourrait être sensiblement différente, les progéniteurs pourraient également être différents (provenance) et la glie radiale pourrait aussi être particulière pour ces neurones.

Il faudrait élaborer une stratégie afin de comprendre cet avantage géographique en inactivant par exemple un facteur d'adhérence cellulaire chez les neurones générés tôt pour vérifier si l'on retrouve cette structure particulière.

B/ Connexion préférentielle entre les pionniers de différents types cellulaires

En partant du principe que les premiers neurones arrivés sont les premiers servis, on pourrait facilement s'imaginer qu'en étant les premiers sur place les neurones pionniers des différentes couches du gyrus denté établiraient entre eux des connexions transitoires pour enclencher leur maturation électrophysiologique. Cela a été décrit pour les cellules principales de l'hippocampe se connectent au cours du développement en suivant une règle respectant leur origine temporelle (Deguchi et al., 2011). Cela peut se comprendre si on considère que les neurones immatures ont besoin pour survivre d'être connectés. Or en arrivant les premiers sur site, les neurones pionniers n'auraient d'autre choix que de se connecter entre eux pour assurer leur survie mutuelle et leur maturation. Par la suite, les neurones produits ultérieurement se connecteraient à eux selon la règle de l'attachement préférentielle (Barabasi and Albert, 1999).

Dans cette optique-là, et en considérant que cette connexion n'est pas transitoire, nous avons commencé à réaliser des expériences d'enregistrement de paires de neurones pionniers pour tester leur connectivité. Ainsi nous avons ciblé des CG ou des CGS générées tôt enregistrées en paire avec des cellules moussues (CM) générées tôt, puisque nous également découvert que cette population de neurones fait aussi partie des neurones pionniers. Malheureusement, les limites expérimentales que j'ai décrites précédemment, ne nous ont pas permis d'acquérir des résultats exploitables. Cependant, une analyse morphologique nous a permis de démontrer l'existence de nombreux contacts, potentiellement synaptique, entre les fibres moussues et les CM.

Cette dernière observation nous permet de conclure qu'il existerait des connexions entre les neurones pionniers de différents types cellulaires et de différentes régions du gyrus denté. Il faudra cependant démontrer que ces connexions sont fonctionnelles. Il serait également intéressant de montrer si les CM générées tôt contacteraient en retour les CG ou CGS générées tôt, formant ainsi une boucle inhibitrice propre aux neurones pionniers. En effet, la couche moléculaire interne où se projettent les axones des fibres moussues, est enrichie d'axones marqués après administration à E12.5 de tamoxifène.

En reprenant les résultats précédents nous avons montré que les neurones pionniers forment une distribution en échafaudage dans toute la structure du GD, et que ces neurones contactent d'autres neurones pionniers du hile. On peut imaginer en combinant ces deux observations qu'il existerait un réseau neuronal pionnier qui servirait de matrice permettant aux neurones générés plus tardivement de se distribuer radialement dans la couche des grains.

C/ Une réponse sans décharge persistante pour la stimulation de la voie perforante

Nous avons montré que lorsque nous stimulons la voie perforante nous avons deux types de réponse et celle qui était majoritaire possédait une hyperpolarisation du potentiel dépendante du GABA_B. Cela va de pair avec le fait que les cellules granulaires matures, toutes catégories confondues, sont plus hyperpolarisées que la majorité des neurones créant ainsi ce qu'on a appelé la barrière inhibitrice à l'origine du codage clairsemé caractéristique du gyrus denté.

A l'issue de notre étude, une question nous vient à l'esprit. Pourquoi n'avons-nous pas trouvé les mêmes résultats que ceux publiés dans les deux articles d'équipes américaines (Larimer and Strowbridge, 2010; Williams et al., 2007) ? Pour rappel, ils avaient émis l'hypothèse que les CGS produisaient la barrière inhibitrice via les interneurones grâce à leur excitabilité plus importante (moins d'adaptation de la décharge) ainsi que leur capacité à décharger de façon persistante dans le temps après la stimulation de la voie perforante.

Plusieurs explications s'offrent à nous. Pour la première, il faut considérer que les deux précédentes études ont été faites chez des rats. Or il n'est pas aberrant de ne pas retrouver les mêmes résultats entre deux espèces différentes. Mais dans ce cas précis, si une propriété n'est pas conservée entre deux espèces très proches, on peut se demander si elle est cruciale ou pas.

La seconde explication serait des âges différents auxquels les expériences ont été réalisées. En effet, les expériences des deux publications citées plus haut sont faites chez

des rats juvéniles âgés de P15 tandis que nos expériences ont été faites chez l'adulte. Sachant, que la génèse des cellules glutamatergiques du gyrus denté se fait en majorité après la naissance, même chez le rat (Altman and Bayer, 1990), nous pouvons en déduire qu'à P15, le réseau du gyrus denté est loin d'être terminé, produisant ainsi un état inédit où les neurones déjà matures côtoient un très grand nombre de neurones encore immatures. Or il peut y avoir des propriétés de réseau particulières au stade juvénile qui n'existeraient plus chez l'adulte, une fois que les réseaux ont fini leur maturation. C'est pour cela que nous nous sommes également placés à P15 pour vérifier la réponse à la stimulation de la voie perforante. Ne trouvant toujours pas les mêmes résultats, nous avons supposé que le P15 chez le rat et la souris n'étaient pas équivalents. En nous renseignant sur l'âge chez la souris qui équivaldrait au P15 chez le rat, nous nous sommes alors placés à P11-12, où nous n'avons toujours pas retrouvé cette réponse soutenue (n=15 cellules P15/12/11).

D'autres possibilités méthodologiques peuvent être avancées pour expliquer ces différences de résultats. Ainsi, à la suite d'une discussion avec Santhakumar, nous avons modifié la position de l'électrode (placée très à l'extérieure de la couche moléculaire) et raccourci l'intervalle inter-stimulation à 10 ms. Malgré ces changements, nous n'avons pas obtenu de réponses soutenues similaires à celles publiées dans les CGS à la suite de la stimulation de la voie perforante (n=3 souris). Une dernière possibilité serait l'utilisation d'électrode de type différent ce qui pourrait influencer les paramètres de stimulation.

D/ L'excitabilité moins importante des neurones pionniers

Au cours des différentes expériences que nous avons menées, nous avons vu que les neurones pionniers étaient moins excitables (gain plus faible, taux maximal de décharge moins élevé et seuil de PA plus dépolarisé) que les neurones générés plus tardivement. Pour apporter une explication à cette différence d'excitabilité, du moins pour les CGS, on peut se pencher sur les contacts des différents types d'interneurones du GD avec les cellules glutamatergiques. En effet, en ayant leur soma dans la couche moléculaire, les CGS seraient mal positionnées pour recevoir l'inhibition périsonotique des cellules en panier, ni l'inhibition axo-axonique par les cellules chandelier, dont les axones sont compartimentés

dans la couche granulaire (voir *Contexte Scientifique* page 66). Cela a été montré pour la population globale des CGS chez le rat (Gupta et al., 2012), où les CGS reçoivent plus d'afférence inhibitrices en condition physiologique de la part d'interneurones calrétinine (par rapport au CG), sensibles aux traumatismes, que de la part d'interneurones parvalbumine robustes aux traumatismes (voir *Contexte Scientifique* page 65). Cette inhibition différentielle des CG pourrait expliquer leur excitabilité moindre.

Nous avons également montré que les neurones pionniers (CG, CGS et CM) ne sont pas recrutés lorsque l'animal avait un accès libre à la roue d'exercice pendant 4 jours (absence de co-marquage c-fos/td-tomato). Pour interpréter ce résultat, il faut se rappeler que nous avons montré que les neurones pionniers étaient moins excitables que les neurones générés plus tardivement. Cette absence d'activation en condition d'activité physique libre fait donc parfaitement écho à nos premières constatations.

Pendant la neurogénèse adulte, il a été montré que les nouveaux neurones formés encore immature étaient *très excitables* (Mongiat et al., 2009; Overstreet-Wadiche et al., 2005; Schmidt-Hieber et al., 2004; Toni and Sultan, 2011; Tozuka et al., 2005; Wang et al., 2000), ce qui conduirait à une *activité moins spécifique* lors des tâches de discrimination (Aimone et al., 2006, 2011). Or quand les neurones arrivaient à maturité, ils devenaient *moins excitables* et *s'activaient de façon spécifique* lors des tâches comportementales (Pardi et al., 2015). En ayant fait le constat que les neurones pionniers étaient *encore moins excitables* que les neurones générés plus tardivement, on peut émettre l'idée que cette propriété d'excitabilité moindre leur conférerait un rôle de puissant garant du codage clairsemé (sparse coding) et de la séparation des représentations. Suivant cette logique, une excitabilité moins importante implique qu'il faudrait un signal afférent bien plus spécifique aux processus gérés par le GD afin de déclencher chez eux une activation. Or l'exercice physique libre sur roue ne constitue pas une tâche dépendante de l'hippocampe, ce qui expliquerait pourquoi les neurones pionniers n'ont pas été recrutés.

Les neurones pionniers ne faisant donc pas partie des neurones activés de façon indifférente aux différentes conditions environnementales (Buzsaki and Mizuseki, 2014), il serait pertinent de réaliser la même expérience en entraînant les souris à des tâches de discrimination d'arènes par exemple, ce qui constitue un apprentissage hautement dépendant du gyrus denté.

En reprenant la revue de 2017 sur le « binding pattern » (Lee and Jung, 2017), on pourrait également se demander si le signal afférent bien plus spécifique, qui serait capable d'activer ces cellules, seraient une arrivée coïncidente d'informations de nature différente et provenant de structures différentes (par exemple du CE médian et du CE latéral). Le rôle des CGS et CG pionnières serait alors de « lier » ces deux informations afin de fournir aux cellules pyramidales de CA3 un seul signal cohérent, comme si elles agissaient comme des détecteurs de coïncidences.

III. Perspectives

Pour aller plus loin, nous devons répondre au questionnement suivant : ces particularités sont-elles au service d'une fonction particulière ? Au cours du développement ? Pendant l'âge adulte ? En condition pathologique ?

La première idée que l'on peut aborder nous est soufflée par les travaux précédents sur les neurones hubs (Picardo et al., 2011). A l'image de ces derniers, il serait intéressant de montrer si les neurones pionniers du GD jouent un rôle dans la mise en place des activités de réseau. Par la suite, prenant cette fois-ci exemple sur les neurones glutamatergiques pionniers de CA3 qui deviennent chez l'adulte des neurones « pacemaker » (Marissal et al., 2012), on peut alors se demander si nos pionniers auraient une fonction particulière dans les différents processus cognitifs engagés par le GD.

Par la suite, il serait intéressant de montrer que les neurones pionniers, toutes structures confondues, créent un réseau préférentiel lors de leur maturation. En effet, si ces neurones arrivent tous en même temps dans le hile et les couches granulaires et moléculaires de façon précoce, il serait logique d'imaginer qu'ils peuvent se connecter entre eux, créant ainsi un réseau pionnier afin de permettre leur maturation.

Enfin, nous pourrions nous engager dans un angle pathologique afin de connaître le rôle des neurones pionniers lors de l'épileptogénèse par exemple. Des premiers indices collectés au sein de l'équipe ont pu montrer que les CM, pourtant très vulnérables à toutes formes d'agression, survivaient aux crises d'épilepsie lorsqu'elles étaient

générées très tôt. Nous pouvons élargir cette idée à nos CG et CGS pionnières en observant leur comportement en condition pathologique.

A/ Implication fonctionnelle au cours du développement

Au regard de la place prépondérante des neurones hub et pacemaker pionniers de CA3 dans la genèse des activités de réseau (Marissal et al., 2012; Picardo et al., 2011), on peut alors se demander s'il en est de même pour les neurones pionniers du gyrus denté. Possèdent-ils un rôle particulier dans l'établissement d'un réseau connecté ?

Pour cela il faudrait nous placer à des stades plus précoces du développement et tout comme les neurones hubs, tester leur impact sur les activités de réseaux. Pour cela, nous nous placerions aux alentours de P5 en imagerie calcique afin de stimuler les générés tôt et d'en observer l'impact sur les activités de réseaux de type PDG.

Nous pourrions ensuite, de la même façon que les CA3 pacemaker, tester si nos cellules glutamatergiques pionnières induiraient des activités épileptiformes en cas d'inhibition de la transmission GABAergique.

Ainsi nous serions en mesure de dire si ces caractéristiques électrophysiologiques particulières sont au service d'un rôle particulier au cours du développement.

B/ Implication fonctionnelle dans les processus de séparation des représentations chez l'adulte

1. La place des CGS pionnières dans une séquence d'activation neuronale

Nous savons que les CG et CGS pionnières sont moins excitables à la stimulation que le reste de la population neuronale du GD. Or, le processus de séparation des représentations repose sur le principe du clairsemage de l'encodage des informations. Le fait d'avoir au sein du réseau des neurones très silencieux pose la garantie d'avoir des représentations uniques pour chaque nouvel événement, en ne les activant que sous

certaines conditions très précises avec suffisamment d'entrées par les différentes voies afférentes.

Afin de connaître la place exacte de ces neurones pionniers dans l'encodage d'événements et de la discrimination d'épisodes, nous pourrions bénéficier de la technologie maîtrisée au sein de l'équipe permettant d'imager le gyrus denté *in vivo* chez une souris éveillée tête fixée.

Grâce à une fenêtre créée dans le cortex de la souris, et des injections des marqueurs calciques fluorescentes (GcAmp) nous sommes capables d'observer l'activité de centaines de neurones chez la souris éveillée. Au lieu de la faire courir sur un tapis, nous pourrions lui présenter différents objets et de l'habituer à un ordre particulier de présentation. Après cette phase d'habituation, nous pourrions soit remplacer un objet de la liste, soit intervertir deux objets (discrimination fine), soit changer tous les objets (discrimination d'épisodes très différents). Ainsi nous pourrions observer la place que prennent les neurones pionniers dans la séquence d'encodage lors de l'exploration des nouveaux objets ou lors des modifications subtiles ou grossières que nous réaliserions.

De la même façon, au lieu de présenter des objets à la souris, nous pourrions la faire courir librement sur des tapis indicés différents. Nous pourrions ainsi enregistrer comment le gyrus denté encode ces différences plus ou moins grandes entre les tapis de course.

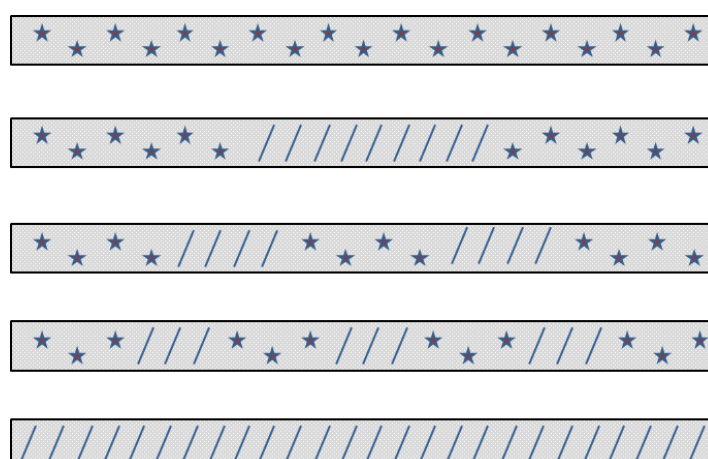


Figure 48 : Exemple de tapis indicés. Changement progressif depuis le motif étoilé jusqu'au motif rayé.

2. Le rôle des CGS pionnières dans la discrimination d'épisodes similaires

Les auteurs de l'étude américaine (Larimer and Strowbridge, 2010) avaient émis l'idée qu'en répondant de façon soutenue à la stimulation de la voie perforante, les CGS engendreraient via les cellules moussues et les interneurons l'inhibition massive des CG, induisant un codage clairsemé des informations entrantes qui serait à l'origine de la discrimination d'épisodes très similaires.

Nous avons un moyen expérimental de tester d'une autre façon cette hypothèse. En effet, au sein de l'équipe nous avons créé une lignée de souris transgéniques qui nous permet de rendre les neurones pionniers glutamatergique ou GABAergiques silencieux grâce à des injections virales localisées déclenchant une construction génétique inhibant les neurones ciblés.

A l'aide de ce modèle, nous pourrions ainsi réaliser deux sortes d'expériences.

En rendant les CG ou CGS pionnières silencieux, nous pourrions observer le comportement de la souris lors d'une tâche de discrimination. Ainsi, si on observe une diminution des performances dans la discrimination, on pourra alors en déduire que les CGS pionnières jouent effectivement un rôle crucial dans ce processus.

Cependant, il existe une limite majeure à cette expérience. En effet, on n'aura pas la possibilité de voir l'impact qu'aura cette inhibition sur la boucle inhibitrice. L'avantage majeur de cette expérience est sa rapidité d'exécution ainsi qu'une observation rapidement d'un effet sur le comportement.

La deuxième expérience que je vais proposer permet de pallier en partie à la limite expérimentale énoncée précédemment. Nous pourrions, ainsi, utiliser la technique d'imagerie in vivo en créant une fenêtre chirurgicale dans le cortex. Cela qui nous permettrait de cibler les CGS générées tôt pour venir les inhiber tout en enregistrant la réponse du réseau en temps réel. Dans ce cas, nous laisserions courir librement une souris sur des tapis indicés très similaires les uns aux autres (avec des modifications très minimes). Nous pourrions alors observer la réponse du réseau lors de l'inhibition des cellules pionnières. De la même manière que pour l'expérience précédente, si on observe une modification de l'encodage clairsemé on pourra suggérer que les CGS jouent un rôle important au sein de la boucle inhibitrice.

C/ Leur rôle dans un contexte pathologique

Les CG sont connues pour répondre d'une façon particulière à l'induction de crises d'épilepsie. Ne passant pas par la mort cellulaire programmée (apoptose), elles créent des ramifications d'axones aberrantes au sein de la couche granulaire ce qui aurait pour résultat d'amplifier l'excitation de toute la couche.

En utilisant les souris *Ngn2CreAi14* gavées à E12,5, nous serions à même d'observer la morphologie des CG pionnières ainsi que leurs propriétés électrophysiologiques en cas d'induction d'épilepsie par injection de pilocarpine. Comme nous savons que ces neurones sont naturellement moins excitables que les CG nés plus tardivement, nous pourrions ainsi savoir si cette particularité leur permettrait d'être les garants de l'intégrité fonctionnelle du réseau malgré son remodelage.

Concernant les CGS en condition pathologique, une étude de 2012 a montré que ces cellules avaient une augmentation d'excitabilité par la diminution des afférences inhibitrices suite à un traumatisme crânien (Gupta et al., 2012). Il serait donc intéressant de connaître la réaction des CGS pionnières dans ce cas pathologique, et leur impact sur le réseau endommagé.

Une fois cet aspect caractérisé nous pourrions utiliser une lignée de souris transgénique élaborée par l'équipe pour connaître l'impact réel de cette population pionnière lors des crises. En effet, cette lignée nous permet de rendre silencieux les neurones glutamatergiques pionniers grâce à une injection virale localisée. Nous pourrions inhiber les CG et CGS pionnières au cours d'une crise et voir si nous sommes capables de la diminuer ou la stopper, ou entre deux crises pour voir si nous sommes capables d'en déclencher une en prenant comme contrôle une souris qui a reçu des injections de solution saline.

Cette caractérisation apporterait de nombreux indices sur la fonction réelle des neurones pionniers du gyrus denté, dans l'idée qu'ils seraient les garants de l'intégrité du réseau en cas de dysfonctionnement majeur.

Conclusion :

Grâce à cette étude, nous avons montré qu'il existait une *population neuronale pionnière* au sein du GD qui se distinguait des autres neurones glutamatergiques par leurs propriétés électrophysiologiques et leur distribution spatiale particulière. Nous avons montré que les neurones pionniers élaboreraient un *réseau pionnier* en se connectant entre eux (les CG, CGS pionnières avec les cellules moussues pionnières). De plus, nous avons émis l'idée que ces neurones formeraient un *échafaudage pionnier* en échantillonnant tous les types de connexions existants au sein du GD.

A l'issue de ces premiers résultats, de nombreuses perspectives s'ouvrent dans l'objectif de compléter l'étude des neurones pionniers du GD, à la fois pendant le développement, à l'âge adulte ainsi qu'en condition pathologique.

Références Bibliographiques

A

- Acsády, L., Kamondi, A., Sík, A., Freund, T.F., and Buzsáki, G. (1998). GABAergic cells are the major postsynaptic targets of mossy fibers in the rat hippocampus. *J. Neurosci.* *18*, 3386–3403.
- Acsády, L., Katona, I., Martínez-Guijarro, F.J., Buzsáki, G., and Freund, T.F. (2000). Unusual target selectivity of perisomatic inhibitory cells in the hilar region of the rat hippocampus. *J. Neurosci.* *20*, 6907–6919.
- Aimone, J.B., Wiles, J., and Gage, F.H. (2006). Potential role for adult neurogenesis in the encoding of time in new memories. *Nat. Neurosci.* *9*, 723–727.
- Aimone, J.B., Deng, W., and Gage, F.H. (2011). Resolving New Memories: A Critical Look at the Dentate Gyrus, Adult Neurogenesis, and Pattern Separation. *Neuron* *70*, 589–596.
- Alder, J., Fujioka, W., Lifshitz, J., Crockett, D.P., and Thakker-varia, S. (2011). Lateral Fluid Percussion : Model of Traumatic Brain Injury in Mice. *J. Vis. Exp.* 1–7.
- Allene, C., Picardo, M.A., Becq, H., Miyoshi, G., Fishell, G., and Cossart, R. (2012). Dynamic Changes in Interneuron Morphophysiological Properties Mark the Maturation of Hippocampal Network Activity. *J. Neurosci.* *32*, 6688–6698.
- Alme, C.B., Buzzetti, R.A., Marrone, D.F., Leutgeb, J.K., Chawla, M.K., Schaner, M.J., Bohanick, J.D., Khoboko, T., Leutgeb, S., Moser, E.I., et al. (2010). Hippocampal Granule Cells Opt for Early Retirement. *Hippocampus* *1123*, 1109–1123.
- Altman, J., and Bayer, S.A. (1990). Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods. *J. Comp. Neurol.* *301*, 365–381.
- Amaral, D.G. (1978). A Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. *J. Comp. Neurol.* *182*, 851–914.
- Amaral, D.G., and Witter, M.P. (1995). *The Rat Nervous System - Hippocampal formation* (San Diego).
- Amaral, D.G., Ishizuka, N., and Claiborne, B.J. (1990). Neurons, numbers and the hippocampal network. *Prog. Brain Res.*
- Amaral, D.G., Scharfman, H.E., and Lavenex, P. (2007). The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Prog. Brain Res.* *163*.
- Anderson, P., Morris, R.G.M., Amaral, D.G., Bliss, T., and O'Keefe, J. (2007). *The Hippocampus book*.
- Aranzio, G.C. (1587). *Observaciones Anatomicas*.

B

- Baddeley, A. (1981). The concept of working memory : A view of its current state and probable future development. 17–23.
- Bagri, A., Gurney, T., He, X., Zou, Y.-R., Littman, D.R., Tessier-Lavigne, M., and Pleasure, S.J. (2002). The chemokine SDF1 regulates migration of dentate granule cells. *Development* *129*, 4249–

4260.

Barabasi, A.-L., and Albert, R. (1999). Emergence of Scaling in Random Networks. *286*, 509–513.

Baude, A., Bleasdale, C., Dalezios, Y., Somogyi, P., and Klausberger, T. (2007). Immunoreactivity for the GABAA receptor $\alpha 1$ subunit, somatostatin and connexin36 distinguishes axoaxonic, basket, and bistratified interneurons of the rat hippocampus. *Cereb. Cortex* *17*, 2094–2107.

Bayer, S.A. (1980). Development of the hippocampal region in the rat II: morphogenesis during embryonic and early postnatal life. *J. Comp. Neurol.* *190*, 115–134.

Ben-Ari, Y. (2014). The GABA excitatory / inhibitory developmental sequence: a personal journey. *Neuroscience* *279*, 187–219.

Ben-Ari, Y., Cherubini, E., Corradetti, R., and Gaiarsa, J. (1989). Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. *5*, 303–325.

Blaabjerg, M., and Zimmer, J. (2007). The dentate mossy fibers: structural organization, development and plasticity. *Prog. Brain Res.* *163*.

Boccara, C.N., Sargolini, F., Thoresen, V.H., Solstad, T., Witter, M.P., Moser, E.I., and Moser, M.-B. (2010). Grid cells in pre- and parasubiculum. *Nat. Neurosci.* *13*, 987–994.

Bonifazi, P., Goldin, M., Picardo, M.A., Jorquera, I., Cattani, A., Bianconi, G., Represa, A., and Cossart, R. (2009). GABAergic Hub Neurons Orchestrate Synchrony in Developing Hippocampal Networks. *Science* (80-.). *326*, 1419–1425.

Brandt, M.D., Jessberger, S., Steiner, B., Kronenberg, G., Reuter, K., Bick-Sander, A., Von Der Behrens, W., and Kempermann, G. (2003). Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice. *Mol. Cell. Neurosci.* *24*, 603–613.

Brown, J., Cooper-Kuhn, C.M., Kempermann, G., Van Praag, H., Winkler, J., Gage, F.H., and Kuhn, H.G. (2003). Enriched environment and physical activity stimulate hippocampal but not olfactory bulb neurogenesis. *Eur. J. Neurosci.* *17*, 2042–2046.

Buckmaster, P.S. (2012). Mossy Fiber Sprouting in the Dentate Gyrus. 1–29.

Buckmaster, P.S., and Jongen-Rêlo, A.L. (1999). Highly specific neuron loss preserves lateral inhibitory circuits in the dentate gyrus of kainate-induced epileptic rats. *J. Neurosci.* *19*, 9519–9529.

Burgess, N., Maguire, E.A., and O'Keefe, J. (2002). The human hippocampus and spatial and episodic memory. *Neuron* *35*, 625–641.

Buzsaki, G., and Mizuseki, K. (2014). The log-dynamic brain: how skewed distributions affect network operations. *Nat. Rev. Neurosci.* *23*, 1–7.

C

Cameron, H.A., and McKay, R.D.G. (2001). Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* *435*, 406–417.

Cenquizca, L.A., and Swanson, L.W. (2007). Spatial organization of direct hippocampal field CA1

axonal projections to the rest of the cerebral cortex. *Brain Res. Rev.* 56, 1–26.

Chavlis, S., Petrantonakis, P.C., and Poirazi, P. (2017). Dendrites of dentate gyrus granule cells contribute to pattern separation by controlling sparsity. *Hippocampus* 27, 89–110.

Cherubini, E., Rovira, C., Gaiarsa, J., Corradetti, R., and Ben-ari, Y. (1990). GABA mediated excitation in immature rat CA3 hippocampal neurons. *Int. J. Dev. Neurosci.*

Claiborne, B.J., Amaral, D.G., and Cowan, W.M. (1986). A light and electron microscopic analysis of the mossy fibers of the rat dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* 246, 435–458.

Claiborne, B.J., Amaral, D.G., and Cowan, W.M. (1990). Quantitative, three-dimensional analysis of granule cell dendrites in the rat dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* 302, 206–219.

Clark, P.J., Bhattacharya, T.K., Miller, D.S., and Rhodes, J.S. (2011). Induction of c-fos, Zif268, and from Acute Bouts of Voluntary Wheel Running in new and pre-existing Adult Mouse Hippocampal Granule Neurons. *NSC*.

Clayton, N.S., and Dickinson, A. (1998). Episodic-like memory during cache recovery by scrub jays. *Nature* 395, 272–274.

Clelland, C.D., Choi, M., Romberg, C., Jr, G.D.C., Fragniere, A., and Tyers, P. (2009). A Functional Role for Adult Hippocampal Neurogenesis in Spatial Pattern Separation. *Science* (80-.). 325, 210–213.

Coras, R., Siebzehnrubl, F.A., Pauli, E., Huttner, H.B., Njunting, M., Kobow, K., Villmann, C., Hahnen, E., Neuhauser, W., Weigel, D., et al. (2010). Low proliferation and differentiation capacities of adult hippocampal stem cells correlate with memory dysfunction in humans. *Brain* 133, 3359–3372.

Curlik, D.M., DiFeo, G., and Shors, T.J. (2014). Preparing for adulthood: Thousands upon thousands of new cells are born in the hippocampus during puberty, and most survive with effortful learning. *Front. Neurosci.* 8, 1–8.

D

Danielson, N.B., Kaifosh, P., Zaremba, J.D., Lovett-barron, M., Tsai, J., Denny, C.A., Balough, E.M., Goldberg, A.R., Drew, L.J., Hen, R., et al. (2016). Distinct Contribution of Adult-Born Hippocampal Granule Cells to Context Encoding. *Neuron* 90, 101–112.

Danielson, N.B., Turi, G.F., Ladow, M., Chavlis, S., Petrantonakis, P.C., Danielson, N.B., Turi, G.F., Ladow, M., Chavlis, S., and Petrantonakis, P.C. (2017). In Vivo Imaging of Dentate Gyrus Mossy Cells in Behaving Mice. *Neuron* 93, 552–559.e4.

Dayer, A.G., Ford, A.A., Cleaver, K.M., Yassaee, M., and Cameron, H.A. (2003). Short-term and long-term survival of new neurons in the rat dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* 460, 563–572.

DeFelipe, J. (1999). Chandelier cells and epilepsy. *Brain* 122, 1807–1822.

Deguchi, Y., Donato, F., Galimberti, I., Cabuy, E., and Caroni, P. (2011). Temporally matched subpopulations of selectively interconnected principal neurons in the hippocampus. *Nat. Publ. Gr.* 14, 495–504.

Deller, T., Katona, I., Cozzari, C., Frotscher, M., and Freund, T.F. (1999). Cholinergic innervation of

mossy cells in the rat fascia dentata. *Hippocampus* 9, 314–320.

Deshmukh, S.S., and Knierim, J.J. (2011). Representation of Non-Spatial and Spatial Information in the Lateral Entorhinal Cortex. *Front. Behav. Neurosci.* 5.

Desmond, N.L., and Levy, W.B. (1982). A quantitative anatomical study of the granule cell dendritic fields of the rat dentate gyrus using a novel probabilistic method. *J. Comp. Neurol.* 212, 131–145.

Desmond, N.L., and Levy, W.B. (1985). Granule cell dendritic spine density in the rat hippocampus varies with spine shape and location. *Neurosci. Lett.* 54, 219–224.

Diamantaki, M., Frey, M., Berens, P., Preston-ferrer, P., and Burgalossi, A. (2016). Sparse activity of identified dentate granule cells during spatial exploration. *Elife* 1–17.

Dieni, C. V., Chancey, J.H., and Overstreet-Wadiche, L.S. (2013). Dynamic functions of GABA signaling during granule cell maturation. *Front. Neural Circuits* 6, 1–11.

Donato, F., Chowdhury, A., Donato, F., Chowdhury, A., Lahr, M., and Caroni, P. (2015). Early- and Late-Born Parvalbumin Basket Cell Subpopulations Exhibiting Distinct Regulation and Roles in Learning Article Early- and Late-Born Parvalbumin Basket Cell Subpopulations Exhibiting Distinct Regulation and Roles in Learning. *Neuron* 85, 770–786.

Dossani, R.H., Missios, S., and Nanda, A. (2015). The Legacy of Henry Molaison (1926-2008) and the Impact of His Bilateral Mesial Temporal Lobe Surgery on the Study of Human Memory. *World Neurosurg.* 84, 1127–1135.

Drapeau, E., Mayo, W., Aurousseau, C., Le Moal, M., Piazza, P.-V., and Abrous, D.N. (2003). Spatial memory performances of aged rats in the water maze predict levels of hippocampal neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 14385–14390.

Dupret, D., Revest, J.M., Koehl, M., Ichas, F., De Giorgi, F., Costet, P., Abrous, D.N., and Piazza, P.V. (2008). Spatial relational memory requires hippocampal adult neurogenesis. *PLoS One* 3.

E

Eichenbaum, H. (2000). A cortical-hippocampal system for declarative memory. *Nat. Rev. Neurosci.* 1, 41–50.

Eichenbaum, H., and Fortin, N.J. (2005). Bridging the Gap between Brain and Behavior: Cognitive and Neural Mechanisms of Episodic Memory. *J. Exp. Anal. Behav.* 84, 619–629.

Encinas, J.M., and Sierra, A. (2012). Neural stem cell deforestation as the main force driving the age-related decline in adult hippocampal neurogenesis. *Behav. Brain Res.* 227, 433–439.

Epsztein, J., Represa, A., Jorquera, I., Ben-ari, Y., and Crépel, V. (2005). Recurrent Mossy Fibers Establish Aberrant Kainate Receptor-Operated Synapses on Granule Cells from Epileptic Rats. *J. Neurosci.* 25, 8229–8239.

Espósito, M.S., Piatti, V.C., Laplagne, D.A., Morgenstern, N.A., Ferrari, C.C., Pitossi, F.J., and Schinder, A.F. (2005). Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *J. Neurosci.* 25, 10074–10086.

F

- Frankland, P.W., and Bontempi, B. (2005). The Organisation of recent and remote memories.
- Frankland, P.W., and Bontempi, B. (2006). Fast track to the medial prefrontal cortex. *PNAS* 103, 509–510.
- Freund, T.F., and Buzsáki, G. (1996). Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6, 347–470.
- Frotscher, M., Zhao, S., and Förster, E. (2007). Development of cell and fiber layers in the dentate gyrus. *Prog. Brain Res.* 163.
- Fujise, N., Liu, Y., Hori, N., and Kosaka, T. (1998). Distribution of calretinin immunoreactivity in the mouse dentate gyrus: II. Mossy cells, with special reference to their dorsoventral difference in calretinin immunoreactivity. *Neuroscience* 82, 181–200.
- G**
- Galceran, J., Miyashita-Lin, E.M., Devaney, E., Rubenstein, J.L.R., and Grosschedl, R. (2000). Hippocampus development and generation of dentate gyrus granule cells is regulated by LEF1. *Development* 127, 469–482.
- Galichet, C., Guillemot, F., and Parras, C.M. (2008). Neurogenin 2 has an essential role in development of the dentate gyrus. *Development* 135, 2031–2041.
- Ge, S., Goh, E.L.K., Sailor, K.A., Kitabatake, Y., Ming, G., and Song, H. (2006). GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature* 439, 589–593.
- Gilbert, P.E., Kesner, R.P., and Lee, I. (2001). Dissociating hippocampal subregions: A double dissociation between dentate gyrus and CA1. *Hippocampus* 11, 626–636.
- Golgi, C. (1883). *Istologia normale, in opera omnia*.
- Goodsmith, D., Chen, X., Wang, C., Burgalossi, A., Christian, K.M., and Knierim, J.J. (2017). Spatial Representations of Granule Cells and Mossy Cells of the Dentate Gyrus. *Neuron* 93, 677–690.e5.
- Gould, E., Beylin, A., Tanapat, P., Reeves, A., and Shors, T.J. (1999). Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat Neurosci* 2, 260–265.
- Gozlan, H., and Ben-ari, Y. (2003). Interneurons are the Source and the Targets of the First Synapses Formed in the Rat Developing Hippocampal Circuit. 684–692.
- Gros, A., Veyrac, A., and Laroche, S. (2015). Cerveau et mémoire : des nouveaux neurones pour se souvenir. *Biol. Aujourd'hui*. 209, 229–248.
- Gulyás, A.I., Hájos, N., and Freund, T.F. (1996). Interneurons containing calretinin are specialized to control other interneurons in the rat hippocampus. *J. Neurosci.* 16, 3397–3411.
- Gupta, A., Elgammal, F.S., Proddutur, A., Shah, S., and Santhakumar, V. (2012). Decrease in Tonic Inhibition Contributes to Increase in Dentate Semilunar Granule Cell Excitability after Brain Injury. *J. Neurosci.* 32, 2523–2537.
- Guzowski, J.F., Knierim, J.J., and Moser, E.I. (2004). Ensemble Dynamics of Hippocampal Regions CA3 and CA1. 44, 581–584.

H

Hafting, T., Fyhn, M., Molden, S., Moser, M.-B., and Moser, E.I. (2005). Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature* 436, 801–806.

Hama, K., Ariei, T., and Kosaka, T. (1989). Three-dimensional morphometrical study of dendritic spines of the granule cell in the rat dentate gyrus with HVEM stereo images. *J. Electron Microsc. Tech.* 12, 80–87.

Han, Z.-S., Buhl, E.H., Lorinczi, Z., and Somogyi, P. (1993). a High-Degree of Spatial Selectivity in the Axonal and Dendritic Domains of Physiologically Identified Local-Circuit Neurons in the Dentate Gyrus of the Rat Hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 5, 395–410.

Hand, R., Bortone, D., Mattar, P., Nguyen, L., Heng, J.I., Guerrier, S., Boutt, E., Peters, E., Barnes, A.P., Parras, C., et al. (2005). Phosphorylation of Neurogenin2 Specifies the Migration Properties and the Dendritic Morphology of Pyramidal Neurons in the Neocortex. 48, 45–62.

He, J., and Crews, F.T. (2007). Neurogenesis decreases during brain maturation from adolescence to adulthood. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 86, 327–333.

Henze, D.A., and Buzsáki, G. (2007). Hilar mossy cells: functional identification and activity in vivo. *Prog. Brain Res.* 163.

Henze, D.A., Urban, N.N., and Barrionuevo, G. (2000). The multifarious hippocampal mossy fiber pathway: A review. *Neuroscience* 98, 407–427.

Hevner, R.F. (2016). Evolution of the mammalian dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* 524, 578–594.

Hjorth-simonsen, A., and Jeune, B. (1972). Origin and termination of the hippocampal perforant path in the rat studied by silver impregnation. 179–207.

Holmes, M.M., Galea, L.A.M., Mistlberger, R.E., and Kempermann, G. (2004). Adult Hippocampal Neurogenesis and Voluntary Running Activity: Circadian and Dose-Dependent Effects. *J. Neurosci. Res.* 76, 216–222.

Hopfield, J.J. (1982). Neural networks and physical systems with emergent collective computational abilities. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79, 2554–2558.

Hosp, J.A., Strüber, M., Yanagawa, Y., Obata, K., Vida, I., Jonas, P., and Bartos, M. (2014). Morpho-physiological criteria divide dentate gyrus interneurons into classes. *Hippocampus* 24, 189–203.

Houser, C.R. (2007). Interneurons of the dentate gyrus: an overview of cell types, terminal fields and neurochemical identity. *Prog. Brain Res.* 163, 217–233.

Hsu, M., and Buzsáki, G. (1993). Vulnerability of mossy fiber targets in the rat hippocampus to forebrain ischemia. *J. Neurosci.* 13, 3964–3979.

Hsu, T.T., Lee, C.T., Tai, M.H., and Lien, C.C. (2016). Differential Recruitment of Dentate Gyrus Interneuron Types by Commissural Versus Perforant Pathways. *Cereb. Cortex* 26, 2715–2727.

J

Jaffe, D.B., and Gutiérrez, R. (2007). Mossy fiber synaptic transmission: communication from the dentate gyrus to area CA3. *Prog. Brain Res.* 163.

Jessberger, S., and Kempermann, G. (2003). Adult-born hippocampal neurons mature into activity-dependent responsiveness. *Eur. J. Neurosci.* *18*, 2707–2712.

Jinno, S., Klausberger, T., Marton, L.F., Dalezios, Y., Roberts, J.D.B., Fuentealba, P., Bushong, E.A., Henze, D.A., and Buzsáki, G. (2007). Neuronal Diversity in GABAergic Long-Range Projections from the Hippocampus. *J. Neurosci.* *34*, 733–742.

Jung, M.W., and McNaughton, B.L. (1993). Spatial Selectivity of Unit-Activity in the Hippocampal Granular Layer. *Hippocampus* *3*, 165–182.

K

Kempermann, G., and Gage, F.H. (2002a). Genetic influence on phenotypic differentiation in adult hippocampal neurogenesis. *Dev. Brain Res.* *134*, 1–12.

Kempermann, G., and Gage, F.H. (2002b). Genetic determinants of adult hippocampal neurogenesis correlate with acquisition, but not probe trial performance, in the water maze task. *Eur. J. Neurosci.* *16*, 129–136.

Kempermann, G., Gast, D., Kronenberg, G., Yamaguchi, M., and Gage, F.H. (2003). Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development* *130*, 391–399.

Kempermann, G., Chesler, E.J., Lu, L., Williams, R.W., and Gage, F.H. (2006). Natural variation and genetic covariance in adult hippocampal neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 780–785.

Kempermann, G., Song, H., and Gage, F.H. (2015). Neurogenesis in the adult hippocampus. *Novartis Found. Symp.* *231*, 243–250.

Kesner, R.P. (2013). An analysis of the dentate gyrus function. *Behav. Brain Res.* *254*:1-7.

Klausberger, T., Marton, L.F., O'Neill, J., Huck, J.H.J., Dalezios, Y., Fuentealba, P., Suen, W.Y., Papp, E., Kaneko, T., Watanabe, M., et al. (2005). Complementary Roles of Cholecystokinin- and Parvalbumin-Expressing GABAergic Neurons in Hippocampal Network Oscillations. *J. Neurosci.* *25*, 9782–9793.

Knierim, J.J. (2006). Neural representations of location outside the hippocampus. *Learn. Mem.* *13*, 405–415.

Koehl, M., Meerlo, P., Gonzales, D., Rontal, A., Turek, F.W., and Abrous, D.N. (2008). Exercise-induced promotion of hippocampal cell proliferation requires beta-endorphin. *FASEB J.* *22*, 2253–2262.

Köhler, C. (1985). A projection from the deep layers of the entorhinal area to the hippocampal formation in the rat brain. *Neurosci. Lett.* *56*, 13–19.

Kron, M.M., Zhang, H., and Parent, J.M. (2010). The Developmental Stage of Dentate Granule Cells Dictates Their Contribution to Seizure-Induced Plasticity. *J. Neurosci.* *30*, 2051–2059.

Kropff, E., Carmichael, J.E., Moser, M.-B., and Moser, E.I. (2015). Speed cells in the medial entorhinal cortex. *Nature* *523*, 419–424.

L

- Laplagne, D.A., Esposito, M.S., Piatti, V.C., Morgenstern, N.A., Zhao, C., Praag, H. Van, Gage, F.H., and Schinder, A.F. (2006). Functional Convergence of Neurons Generated in the Developing and Adult Hippocampus. *PLoS One* 4.
- Laplagne, D.A., Kamienkowski, J.E., Espósito, M.S., Piatti, V.C., Zhao, C., Gage, F.H., and Schinder, A.F. (2007). Similar GABAergic inputs in dentate granule cells born during embryonic and adult neurogenesis. *Eur. J. Neurosci.* 25, 2973–2981.
- Larimer, P., and Strowbridge, B.W. (2010). Representing information in neuronal cell assemblies: Persistent activity in the dentate gyrus mediated by semilunar granule cells. *Nat. Neurosci.* 13, 213–222.
- Lassalle, J.-M., Bataille, T., and Halley, H. (2000). Reversible inactivation of the hippocampal mossy fiber synapses in mice impairs spatial learning, but neither consolidation nor memory retrieval, in the Morris navigation task. *Neurobiol. Learn. Mem.* 73, 243–257.
- Lee, I., and Kesner, R.P. (2004). Encoding versus retrieval of spatial memory: Double dissociation between the dentate gyrus and the perforant path inputs into CA3 in the dorsal hippocampus. *Hippocampus* 14, 66–76.
- Lee, J.W., and Jung, M.W. (2017). Separation or binding? Role of the dentate gyrus in hippocampal mnemonic processing. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 75, 183–194.
- Lee, C.-T., Kao, M.-H., Hou, W.-H., Wei, Y.-T., Chen, C.-L., and Lien, C.-C. (2016). Causal Evidence for the Role of Specific GABAergic Interneuron Types in Entorhinal Recruitment of Dentate Granule Cells. *Sci. Rep.* 6, 36885.
- Lee, S.H., Marchionni, I., Bezaire, M., Varga, C., Danielson, N., Lovett-Barron, M., Losonczy, A., and Soltesz, I. (2014). Parvalbumin-positive basket cells differentiate among hippocampal pyramidal cells. *Neuron* 82, 1129–1144.
- Lee, S.W., Clemenson, G.D., and Gage, F.H. (2012). New neurons in an aged brain. *Behav. Brain Res.* 227, 497–507.
- Lemaire, V., Lamarque, S., Le Moal, M., Piazza, P.V., and Abrous, D.N. (2006). Postnatal Stimulation of the Pups Counteracts Prenatal Stress-Induced Deficits in Hippocampal Neurogenesis. *Biol. Psychiatry* 59, 786–792.
- Leranth, C., and Hajszan, T. (2007). Extrinsic Afferent Systems to the Dentate Gyrus. *Prog. Brain Res.*
- Leutgeb, J.K., and Moser, E.I. (2007). Enigmas of the Dentate Gyrus. *Neuron* 55, 176–178.
- Leutgeb, J.K., Leutgeb, S., Moser, M.-B., and Moser, E.I. (2007). Pattern Separation in the Dentate Gyrus and CA3 of the Hippocampus. *Science* (80-.). 315, 961–966.
- Lewis, F.T. (1924). The significance of the term hippocampus. *J. Comp. Neurol.*
- Li, G., and Pleasure, S.J. (2005). Morphogenesis of the dentate gyrus: What we are learning from mouse mutants. *Dev. Neurosci.* 27, 93–99.
- Li, G., and Pleasure, S.J. (2007). Genetic regulation of dentate gyrus morphogenesis. *Prog. Brain Res.* 163.
- Li, G., Berger, O., Mercedes, S.H., Wu, P.N., and Pleasure, S.J. (2008). Hilar Mossy Cells Share

Developmental Influences with Dentate Granule Neurons. *Dev. Neurosci.* 255–261.

Liu, M., Pleasure, S.J., Collins, A.E., Noebels, J.L., Naya, F.J., Tsai, M., and Lowenstein, D.H. (2000). Loss of BETA2 /NeuroD leads to malformation of the dentate gyrus and epilepsy. 97.

Lodato, S., Shetty, A.S., and Arlotta, P. (2015). Cerebral cortex assembly: generating and reprogramming projection neuron diversity. *Trends Neurosci.* 38, 117–125.

Lowenstein, D.H., Thomas, M.J., Smith, D.H., and McIntosh, T.K. (1992). Selective vulnerability of dentate hilar neurons following traumatic brain injury: a potential mechanistic link between head trauma and disorders of the hippocampus. *J. Neurosci.* 12, 4846–4853.

Lubbers, K., and Frotscher, M. (1988). Differentiation of granule cells in relation to GABAergic neurons in the rat fascia dentata. 119–127.

Lübke, J., Frotscher, M., and Spruston, N. (1998). Specialized electrophysiological properties of anatomically identified neurons in the hilar region of the rat fascia dentata. *J. Neurophysiol.* 79, 1518–1534.

M

Madisen, L., Zwingman, T.A., Sunkin, S.M., Oh, S.W., Hatim, A., Gu, H., Ng, L.L., Palmiter, R.D., Hawrylycz, M.J., Allan, R., et al. (2010). A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat. Neurosci.* 13, 133–140.

Maglóczy, Z. (2010). Sprouting in human temporal lobe epilepsy: Excitatory pathways and axons of interneurons. *Epilepsy Res.* 89, 52–59.

Marissal, T., Bonifazi, P., Picardo, M.A., Nardou, R., Petit, L.F., Baude, A., Fishell, G.J., Ben-Ari, Y., and Cossart, R. (2012). Pioneer glutamatergic cells develop into a morpho-functionally distinct population in the juvenile CA3 hippocampus. *Nat. Commun.* 3, 1316.

Maroso, M., Szabo, G.G., Kim, H.K., Lee, S., Soltesz, I., Maroso, M., Szabo, G.G., Kim, H.K., Alexander, A., Bui, A.D., et al. (2016). Cannabinoid Control of Learning and Memory through HCN Channels. *Neuron* 89, 1059–1073.

Marr, D. (1971). Simple memory: a theory for archicortex. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*

McHugh, T.J., Jones, M.W., Quinn, J.J., Balthasar, N., Coppari, R., Elmquist, J.K., Lowell, B.B., Fanselow, M.S., Wilson, M.A., and Tonegawa, S. (2007). Dentate Gyrus NMDA Receptors Mediate Rapid Pattern Separation in the Hippocampal Network. *Science* (80-.). 19, 1–7.

McNaughton, B.L., Barnes, C.A., Meltzer, J., and Sutherland, R.J. (1989). Hippocampal granule cell are necessary for normal spatial learning but not for spatially-selective pyramidal cell discharge. *Exp. Brain Res.*

Mitchell, J., Cook, I., and Hervey, V. (1997). Effect of seizures on hippocampal peptidergic neurons. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 23, 299–306.

Miyoshi, G., Hjerling-leffler, J., Karayannis, T., Sousa, V.H., Butt, J.B., Battiste, J., Johnson, J.E., Machold, R.P., and Fishell, G. (2010). Genetic fate mapping reveals that the caudal ganglionic eminence produces a large and diverse population of superficial cortical interneurons. *J. Neu* 30, 1582–1594.

Mòdol, L., Sousa, V.H., Arnaud, M., Tressard, T., Baude, A., and Cossart, R. (2017). Spatial Embryonic Origin Delineates GABAergic Hub Neurons Driving Network Dynamics in the Developing Entorhinal Cortex. *Cereb. Cortex in press*.

Mongiat, L.A., Espósito, M.S., Lombardi, G., and Schinder, A.F. (2009). Reliable activation of immature neurons in the adult hippocampus. *PLoS One* 4.

Monteiro, B.M.M., Moreira, F.A., Massensini, A.R., Moraes, M.F.D., and Pereira, G.S. (2014). Enriched environment increases neurogenesis and improves social memory persistence in socially isolated adult mice. *Hippocampus* 24, 239–248.

Morand, M. (1744). *Histoire de l'academie Royales des Sciences*.

Myers, C.E., and Scharfman, H.E. (2009). A Role for hilar cells in pattern separation in the dentate gyrus: A computational approach. *Hippocampus* 19, 321–337.

Myers, C.E., and Scharfman, H.E. (2011). Pattern separation in the dentate gyrus: A role for the CA3 backprojection. *Hippocampus* 21, 1190–1215.

N

Nakashiba, T., Cushman, J.D., Pelkey, K.A., Renaudineau, S., Buhl, D.L., Mchugh, T.J., Barrera, V.R., Chittajallu, R., Iwamoto, K.S., McBain, C.J., et al. (2012). Young Dentate Granule Cells Mediate Pattern Separation whereas Old Granule Cells Contribute to Pattern Completion. *Cell* 149, 188–201.

Nakazawa, K. (2017). Dentate Mossy Cell and Pattern Separation. *Neuron* 93, 465–467.

Nicola Z., Fabel K., Kempermann G. (2015). Development of the adult neurogenic niche in the hippocampus of mice. *Front. Neuroanat.* 7;9:53.

Niibori, Y., Yu, T.-S., Epp, J.R., Akers, K.G., Josselyn, S.A., and Frankland, P.W. (2012). Suppression of adult neurogenesis impairs population coding of similar contexts in hippocampal CA3 region. *Nat. Commun.* 3, 1253.

O

O'Keefe, J., and Dostrovsky, J. (1971). The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res.* 34, 171–175.

O'Reilly, R.C., and McClelland, J.L. (1994). Hippocampal conjunctive encoding, storage, and recall: Avoiding a trade-off. *Hippocampus* 4, 661–682.

Overstreet-Wadiche, L.S., Bromberg, D.A., Bensen, A.L., and Westbrook, G.L. (2005). GABAergic Signaling to Newborn Neurons in Dentate Gyrus. *J. Neurophysiol.* 94, 4528–4532.

Ozen, I., Galichet, C., Watts, C., Parras, C., Guillemot, F., and Raineteau, O. (2007).

P

Proliferating neuronal progenitors in the postnatal hippocampus transiently express the proneural gene *Ng2*. *Eur. J. Neurosci.* 25, 2591–2603.

Papez, J.W. (1937). A proposed mechanism of emotions. *Arch. Neurol. Psychiatry* 38, 725–743.

Pardi, M.B., Ogando, M.B., Schinder, A.F., and Marin-Burgin, A. (2015). Differential inhibition onto developing and mature granule cells generates high-frequency filters with variable gain. *Elife* 4, 1–17.

Pellegrini, M., Mansouri, A., Simeone, A., Boncinelli, E., and Gruss, P. (1996). Dentate gyrus formation requires *Emx2*. *Development* 122, 3893–3898.

Penttonen, M., Kamondi, A., Sik, A., Acsády, L., and Buzsáki, G. (1997). Feed-forward and feed-back activation of the dentate gyrus in vivo during dentate spikes and sharp wave bursts. *Hippocampus* 7, 437–450.

Picardo, M.A., Guigue, P., Bonifazi, P., Batista-Brito, R., Allene, C., Ribas, A., Fishell, G., Baude, A., and Cossart, R. (2011). Pioneer GABA cells comprise a subpopulation of hub neurons in the developing hippocampus. *Neuron* 71, 695–709.

Poucet, B., Chaillan, F., Truchet, B., Save, E., Sargolini, F., and Hok, V. (2015). Is there a pilot in the brain? Contribution of the self-positioning system to spatial navigation. *Front. Behav. Neurosci.* 9, 1–10.

R

Ramirez, S., Liu, X., Lin, P.-A., Suh, J., Pignatelli, M., Redondo, R.L., Scherjon, S., Ryan, T.J., and Tonegawa, S. (2013). Creating a False Memory in the Hippocampus. *Science* (80-.). 341, 387–392.

Ramon y Cajal, S. (1909). *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés* (Paris: Paris : Maloine).

Rees, C.L., Wheeler, D.W., Ascoli, G.A., Hamilton, D.J., White, C.M., Komendantov, A.O., and Ascoli, G.A. (2016). Graph Theoretic and Motif Analyses of the Hippocampal Neuron Type Potential Connectome. *eNeuro* 3, 1–21.

Ribak, C.E., Seress, L., and Amaral, D.G. (1985). The development, ultrastructure and synaptic connections of the mossy cells of the dentate gyrus. *J. Neurocytol.* 14, 835–857.

Ribak, C.E., Nitsch, R., and Seress, L. (1990). Proportion of parvalbumin-positive basket cells in the GABAergic innervation of pyramidal and granule cells of the rat hippocampal formation. *J. Comp. Neurol.* 300, 449–461.

Ribak, C.E., Korn, M.J., Shan, Z., and Obenaus, A. (2004). Dendritic growth cones and recurrent basal dendrites are typical features of newly generated dentate granule cells in the adult hippocampus. *1000*, 195–199.

Rolls, E.T. (1996). A theory of hippocampal function in memory. *Hippocampus* 6, 601–620.

Rolls, E.T. (2007). An attractor network in the hippocampus: Theory and neurophysiology. *Learn. Mem.* 14, 714–731.

Rolls, E.T., Treves, A., Robertson, R.G., Georges-françois, P., Rolls, E.T., Treves, A., Robertson, R.G., Georges-françois, P., and Panzeri, S. (1998). Information About Spatial View in an Ensemble of Primate Hippocampal Cells I. 1797–1813.

S

Sargolini, F., Fyhn, M., Hafting, T., McNaughton, B.L., Witter, M.P., Moser, M.-B., and Moser, E.I. (2006). Conjunctive Representation of Position, Direction, and Velocity in Entorhinal Cortex. *Handb. Brain Microcircuits* 175–192.

Scharfman, H.E. (1991). Dentate hilar cells with dendrites in the molecular layer have lower thresholds for synaptic activation by perforant path than granule cells. *J. Neurosci.* 11, 1660–1673.

Scharfman, H.E. (2007). The CA3 “backprojection” to the dentate gyrus. *Prog. Brain Res.* 163, 627–637.

Scharfman, H.E. (2016). The enigmatic mossy cell of the dentate gyrus. *Nat. Rev. Neurosci.* 17, 562–575.

Scharfman, H.E., and Myers, C.E. (2013). Hilar mossy cells of the dentate gyrus: a historical perspective. *Front. Neural Circuits* 6, 1–17.

Scharfman, H.E., Witter, M.P., and Schwarcz, R. (2000). The Parahippocampal region: Implications for neurological and psychiatric diseases. *Ann N Y Acad Sci* 911, ix–xiii.

Schlessinger, A.R., Cowan, W.M., and Gottlieb, D.I. (1975). An autoradiographic study of the time of origin and the pattern of granule cell migration in the dentate gyrus of the rat. *J. Comp. Neurobiol.* 159, 49–75.

Schmeiser, B., Zentner, J., Prinz, M., Brandt, A., and Freiman, T.M. (2017). Extent of mossy fiber sprouting in patients with mesiotemporal lobe epilepsy correlates with neuronal cell loss and granule cell dispersion. *Epilepsy Res.* 129, 51–58.

Schmidt, B., Marrone, D.F., and Markus, E.J. (2012). Disambiguating the similar: The dentate gyrus and pattern separation. *Behav. Brain Res.* 226, 56–65.

Schmidt-Hieber, C., Jonas, P., and Bischofberger, J. (2004). Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature* 429, 184–187.

Scoville, W.B., and Milner, B. (1957). Loss of Recent Memory After Bilateral Hippocampal Lesions. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 20, 11–21.

Senzai, Y., and Buzsaki, G. (2017). Physiological Properties and Behavioral Correlates of Hippocampal Granule Cells and Mossy Cells. *Neuron* 691–704.

Seress, L., and Mrzljak, L. (1987). Basal dendrites of granule cells are normal features of the fetal and adult dentate gyrus of both monkey and human hippocampal formations. *Brain Res.* 405, 169–174.

Shepherd, G.M., and Harris, K.M. (1998). Three-dimensional structure and composition of CA3->CA1 axons in rat hippocampal slices: implications for presynaptic connectivity and compartmentalization. *J. Neurosci.* 18, 8300–8310.

Skaggs, W.E., McNaughton, B.L., Wilson, M.A., and Barnes, C.A. (1996). Theta Phase Precession in Hippocampal Neuronal Populations and the Compression of Temporal Sequences. *Hippocampus* 6, 149–172.

Somogyi, P., Nunzi, M.G., Gorio, A., and Smith, A.D. (1983). A new type of specific interneuron in the monkey hippocampus forming synapses exclusively with the axon initial segments of pyramidal cells. *Brain Res.* 259, 137–142.

Soriano, E., and Frotscher, M. (1989). A GABAergic axo-axonic cell in the fascia dentata controls the main excitatory hippocampal pathway. *Brain Res.* 503, 170–174.

Soriano, E., Nitsch, R., and Frotscher, M. (1990). Axo-axonic chandelier cells in the rat fascia dentata: Golgi-electron microscopy and immunocytochemical studies. *J. Comp. Neurol.* 293, 1–25.

Steward, O., and Scoville, S.A. (1976). Cells of origin of entorhinal cortical afferents to the hippocampus and fascia dentata of the rat. *J. Comp. Neurol.* 169, 347–370.

T

Tashiro, A., Makino, H., and Gage, F.H. (2007). Experience-Specific Functional Modification of the Dentate Gyrus through Adult Neurogenesis: A Critical Period during an Immature Stage. *J. Neurosci.* 27, 3252–3259.

Taube, J.S., Muller, R.U., and Ranck, J.B.J. (1990a). Head-direction cells recorded from the postsubiculum in freely moving rats. II. Effects of environmental manipulations. *J. Neurosci.* 10, 436–447.

Taube, J.S., Muller, R.U., and Ranck, J.B.J. (1990b). Head-direction cells recorded from the postsubiculum in freely moving rats. I. Description and quantitative analysis. *J. Neurosci.* 10, 420–435.

Toni, N., and Schinder, A.F. (2016). Maturation and Functional Integration of New Granule Cells into the Adult Hippocampus. *Cold Spring Harb. Monogr. Arch.* 52, 299–319.

Toni, N., and Sultan, S. (2011). Synapse formation on adult-born hippocampal neurons. *Eur. J. Neurosci.* 33, 1062–1068.

Tóth, K., and Maglóczy, Z. (2014). The vulnerability of calretinin-containing hippocampal interneurons to temporal lobe epilepsy. *8*, 1–12.

Tozuka, Y., Fukuda, S., Namba, T., Seki, T., and Hisatsune, T. (2005). GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. *Neuron* 47, 803–815.

Treves, A., and Rolls, E.T. (1992). Computational constraints suggest the need for two distinct input systems to the hippocampal CA3 network. *Hippocampus* 2, 189–199.

Treves, A., and Rolls, E.T. (1994). Computational analysis of the role of the hippocampus in memory. *Hippocampus* 4, 374–391.

Treves, A., Tashiro, A., Witter, M.P., and Moser, E.I. (2008). What is the mammalian dentate gyrus good for? *Neuroscience* 154, 1155–1172.

Tronel, S., Belnoue, L., Grosjean, N., Revest, J.M., Piazza, P.V., Koehl, M., and Abrous, D.N. (2012). Adult-born neurons are necessary for extended contextual discrimination. *Hippocampus* 22, 292–298.

Tulving, E. (1995). Organization of memory.

Tyzio, R., Minlebaev, M., Rheims, S., Ivanov, A., Jorquera, I., Holmes, G.L., Zilberter, Y., Ben-ari, Y., and Khazipov, R. (2008). Postnatal changes in somatic c -aminobutyric acid signalling in the rat hippocampus. *27*, 2515–2528.

V

Valero, M., Cid, E., Averkin, R.G., Aguilar, J., Sanchez-aguilera, A., Viney, T.J., Gomez-dominguez, D., Bellistri, E., and Menendez de la Prida, L. (2015). Determinants of different deep and superficial CA1 pyramidal cell dynamics during sharp-wave ripples. *Nat. Neurosci.* *18*.

Veyrac, A., Gros, A., Bruel-jungerman, E., and Rochefort, C. (2013). Zif268/egr1 gene controls the selection, maturation and Functional Integration of Adult Hippocampal Newborn Neurons By Learning. *PNAS* 1–6.

W

Wang, S., Scott, B.W., and Wojtowicz, J.M. (2000). Heterogenous properties of dentate granule neurons in the adult rat. *J.Neurobiol.* *42*, 248–257.

West, M.J., and Gundersen, H.J.G. (1990). Unbiased stereological estimation of the number of neurons in the human hippocampus. *J. Comp. Neurol.* *296*, 1–22.

Williams, P.A., Larimer, P., Gao, Y., and Strowbridge, B.W. (2007). Semilunar Granule Cells: Glutamatergic Neurons in the Rat Dentate Gyrus with Axon Collaterals in the Inner Molecular Layer. *J. Neurosci.* *27*, 13756–13761.

Willshaw, D.J., Dayan, P., and Morris, R.G.M. (2015). Memory, modelling and Marr: a commentary on Marr (1971) "Simple memory: a theory of archicortex." *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* *370*, 20140383–20140383.

Witter, M.P. (2007). Intrinsic and extrinsic wiring of CA3: Indications for connectional heterogeneity. *3*, 705–713.

Witter, M.P., and Amaral, D.G. (2004). *The Rat Nervous system - Hippocampal formation* (Amsterdam).

X

Xavier, G.F., Oliveira-Filho F.J., Santos A.M. (1999). Dentate gyrus-selective colchicine lesion and disruption of performance in spatial tasks: difficulties in "place strategy" because of a lack of flexibility in the use of environmental cues? *Hippocampus* *9*:668-681.

Y

Yassa, M.A., and Stark, C.E.L. (2011). Pattern separation in the hippocampus. *Trends Neurosci.* *34*, 515–525.

Z

Zhang, S., Schönfeld, F., Wiskott, L., and Manahan-vaughan, D. (2014). Spatial representations of place cells in darkness are supported by path integration and border information. *Front. Behav. Neurosci.* *8*, 1–12.

Zhao, C., Teng, E.M., Summers, R.G., Ming, G.-L., and Gage, F.H. (2006). Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J. Neurosci.* 26, 3–11.

Zhou, C., Zhao, C., and Pleasure, S.J. (2004). Wnt Signaling Mutants Have Decreased Dentate Granule Cell Production and Radial Glial Scaffolding Abnormalities. 24, 121–126.

Zirlinger, M., Lo, L., McMahon, J., McMahon, A.P., and Anderson, D.J. (2002). Transient expression of the bHLH factor neurogenin-2 marks a subpopulation of neural crest cells biased for a sensory but not a neuronal fate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 8084–8089.