

AIX-MARSEILLE UNIVERSITE
FACULTE DE MÉDECINE DE MARSEILLE
ECOLE DOCTORALE 62 – Science de la Vie et de la Santé

T H È S E

Présentée et publiquement soutenue devant
LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE MARSEILLE

Le 15 Février 2013

Par Franck DUBRUC

Né le 23 Février 1984 à Marseille (France)

Modulation de la Fidélité Temporelle de la décharge neuronale par l'activité GABAergique et le Système des Endocannabinoïdes dans l'Hippocampe

Unité de Neurobiologie des canaux Ioniques et de la Synapse
(UNIS – INSERM UMR 1072)

Pour obtenir le grade de
DOCTORAT d'AIX-MARSEILLE UNIVERSITÉ

SPÉCIALITÉ : Neurosciences

Membres du Jury de la Thèse :

Jérôme TROUSLARD	Président
Alain MARTY	Rapporteur
Laurent VENANCE	Rapporteur
David DUPRET	Examineur
Bruno BUISSON	Examineur
Dominique DEBANNE	Co-Directeur de thèse
Olivier CAILLARD	Directeur de thèse

Financements



Région



Provence-Alpes-Côte d'Azur



Remerciements

Je remercie le Dr. Jérôme Trouslard pour avoir accepté d'être Président de mon jury de thèse.

Je remercie le Dr. Alain Marty et le Dr. Laurent Venance pour avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse.

Je remercie le Dr. David Dupret et le Dr. Bruno Buisson pour avoir accepté d'être examinateur de ma thèse.

Je remercie le Dr. Michael SEAGAR, Directeur du Laboratoire de Neurobiologie des Canaux Ioniques (INSERM, UMR641), de m'avoir permis d'effectuer mon début de thèse au sein de son laboratoire.

Je remercie le Dr. Dominique DEBANNE, Chef d'équipe et Directeur de l'Unité de Neurobiologie des canaux Ioniques et de la synapse (INSERM, UMR1072), de m'avoir permis d'effectuer ma thèse au sein de son équipe et de son laboratoire.

Je remercie tout spécialement le Dr. Olivier CAILLARD, mon Directeur de thèse, pour tout le temps qu'il m'a consacré pendant toute la durée de ma thèse ainsi que dans la réalisation des différentes expériences.

Je remercie également l'INSERM, la Région PACA et Neuroservice (Bruno Buisson) pour avoir aidé au financement de ma thèse.

Enfin, je tiens à remercier tous les membres du laboratoire pour leur accueil chaleureux et leur aide pour que je puisse réaliser ma thèse dans des conditions respectables.

Résumé

Les neurones pyramidaux sont constamment bombardés par une activité GABAergique spontanée qui régule le comportement de la décharge neuronale. Des résultats récents ont montré que cette activité spontanée GABAergique pouvait moduler l'excitabilité mais aussi la fidélité temporelle de décharge d'un neurone définie comme sa capacité à reproduire à l'identique un patron de décharge lors de la présentation répétée d'un même stimulus (Caillard, 2011). D'autre part, de nombreuses études ont caractérisé l'existence d'une plasticité à court-terme de l'activité GABAergique médiée par les endocannabinoïdes. Ce phénomène, connu sous le nom de DSI (Depolarization-induced Suppression of Inhibition) a été décrit dans de nombreuses structures comme le cervelet, le cortex ou encore l'hippocampe (pour revue voir Freund et al. 2003 ; Kano et al. 2009).

Au cours de ma thèse, j'ai étudié quelles pouvaient être les conséquences fonctionnelles de la production d'endocannabinoïdes sur l'activité neuronale et en particulier sur la fidélité temporelle de la décharge des neurones pyramidaux de la région CA1 de l'hippocampe. Dans un premier temps nous avons montré que le profil de décharge *in vivo* des cellules de lieu de la région CA1 de l'hippocampe pouvait induire, quand il était rejoué *in vitro*, une diminution de la libération spontanée de GABA via la voie de signalisation des endocannabinoïdes. . Nous avons observé ensuite que cette diminution transitoire de la transmission GABAergique était associée à une amélioration de la fidélité temporelle de la décharge des neurones pyramidaux de la région CA1 de l'hippocampe.

D'autre part, nous nous sommes intéressés à l'impact que pourrait avoir une plasticité de l'activité inhibitrice antérograde (ou feed-forward inhibition) sur le couplage entre une entrée synaptique excitatrice et l'émission d'un potentiel d'action (couplage EPSP-Spike). Jusqu'à présent, cette inhibition antérograde a été montrée comme amélioratrice de la précision temporelle de la décharge neuronale évaluée lors du couplage entre une entrée synaptique excitatrice et l'émission d'un potentiel d'action (couplage EPSP-Spike) (Pouille and Scanziani, 2001). Nos travaux ont montré d'une part que cette inhibition antérograde était sensible aux endocannabinoïdes, et d'autre part que l'inhibition antérograde améliorait ou dégradait la précision temporelle du couplage EPSP-Spike selon la probabilité de couplage initiale.

En conclusion, nos travaux suggèrent que l'activité des cellules de lieu de la région CA1 de l'hippocampe peut provoquer, par la synthèse et la libération rétrograde d'endocannabinoïdes, une diminution à court-terme de l'activité GABAergique reçue par ces cellules avec pour conséquence des modifications de la précision temporelle de la décharge neuronale.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	11
1. L'hippocampe	11
1.1 Base anatomique de la région de l'hippocampe	11
1.2 Connexion entre la formation hippocampique et la région para-hippocampique	12
1.3 Le circuit tri-synaptique	13
1.4 Région CA2 de l'hippocampe	15
1.5 Innervation cholinergique de la région hippocampique et rôle physiologique	16
1.6 Contribution des neurones hippocampiques dans la mémoire de reconnaissance	18
1.7 Les cellules de lieu	18
2. L'activité inhibitrice dans le SNC	20
2.1 L'acide gamma-aminobutyrique (GABA)	20
2.2 Récepteur GABA _A	21
2.3 Récepteur GABA _B	21
2.4 Du GABA dépolarisant au GABA hyperpolarisant	22
2.5 Connectivité inhibitrice dans l'hippocampe	23
2.6 Distinction entre les interneurons CCK et PV	24
2.7 Feed-back Inhibition et Feed-Forward Inhibition	26
3. Le système des endocannabinoïdes	28
3.1 Découverte, utilisation et identification du système cannabinoïde	28
3.2 Les récepteurs aux cannabinoïdes : récepteur CB1 et CB2	29
3.3 Les cannabinoïdes endogènes	31
3.4 Dépression à court-terme de la transmission synaptique inhibitrice : la DSI	33
3.5 Quel endocannabinoïde est responsable du phénomène de DSI dans l'hippocampe?	35
3.6 Dépression à court-terme de la transmission synaptique excitatrice : la DSE	37
3.7 Rôle du monoxyde d'azote (NO) dans la DSI	38
3.8 Dépression à long-terme de la transmission synaptique inhibitrice : la i-LTD	39
3.9 Plasticité intrinsèque des neurones corticaux : la SSI	40
3.10 Plasticité du compartiment glial	41
4. Fidélité temporelle de la décharge neuronale	42
5. Questions & Objectifs de la thèse	45
MATERIELS ET METHODES	47
1. Préparation des tranches de cerveau	47

2. Enregistrements électrophysiologiques	48
3. Pharmacologie	49
4. Imagerie par Fluorescence du calcium	52
5. Stimuli	52
6. Modélisation neuronale et synaptique	53
7. Courant imposé dynamique	54
8. Acquisitions et Analyse des enregistrements	54
RESULTATS	59
1. Résultats préliminaires : Caractérisation du phénomène de DSI.....	59
1.1 Diffusion des endocannabinoïdes	59
1.2 La DSI est un phénomène calcium-dépendant	59
1.3 Expression pré-synaptique de la DSI	62
1.4 La DSI est similaire sur l'activité spontanée et l'activité évoquée GABAergique	63
2. Résultats principaux : Rôle de la DSI dans la précision temporelle	65
2.1 Induction de la DSI par des patrons de décharges de cellules de lieu	65
2.2 Blocage de la DSI par le THL et non par le RHC-80267	70
2.3 Modulation de la fidélité temporelle de décharge neuronale par les endocannabinoïdes	74
2.4 Modulation du couplage EPSP-Spike par la DSI	77
2.5 La Feed-Forward inhibition affecte le couplage EPSP-Spike d'une manière bi-phasique	80
2.6 Contribution théorique de l'activité spontanée inhibitrice et la feed-forward inhibition sur la modulation de la fidélité temporelle du couplage EPSP-Spike	81
DISCUSSION.....	89
1. Phénomène de DSI et processus de mémorisation spatiale	89
2. Activité des cellules de lieu, prérequis de la DSI et endocannabinoïdes	91
3. Contribution de l'activité inhibitrice dans la précision temporelle	93
PERSPECTIVES.....	96
1. Induction de la i-LTD par des patrons de décharge <i>in vivo</i> .	97
2. Altération pharmacologique du système des endocannabinoïdes et conséquences sur la mémoire de reconnaissance.	99
3. Modulation cholinergique de l'activité spontanée GABAergique par recrutement spécifique de certaines classes d'interneurones.	101
ANNEXE (ARTICLE)	105
BIBLIOGRAPHIE	137

INTRODUCTION

Le but de cette introduction, composée de 4 grandes parties, est de poser les bases nécessaires à la compréhension des principales questions qui seront abordées au cours de cette thèse portant sur la modulation de la fidélité temporelle de la décharge neuronale par l'activité GABAergique et le système des endocannabinoïdes dans la région CA1 de l'hippocampe.

Dans une première partie, il sera donc présenté la région d'étude choisie, l'hippocampe, qui est une région avec une organisation morphologique et fonctionnelle bien définie dont on a de très bonnes connaissances anatomiques. De plus, de nombreuses études portant sur la plasticité synaptique et la précision temporelle ont été faites dans cette région cérébrale faisant le lien tout naturellement avec l'étude entreprise au cours de cette thèse.

Dans une deuxième partie, il sera traité du principal système inhibiteur dans le cerveau, l'activité GABAergique, et de ses différentes composantes que sont l'inhibition rétrograde et antérograde, ainsi que des types cellulaires responsables de l'inhibition dans les réseaux neuronaux, à savoir les interneurons.

Dans une troisième partie, il sera abordé un système neuromodulateur important dans la transmission synaptique, le système des endocannabinoïdes, dont l'essor de la pharmacologie a permis de mettre en évidence son rôle crucial dans la modulation de la transmission inhibitrice.

Et enfin, dans une dernière partie, il sera traité de la précision (ou fidélité) temporelle de la décharge neuronale, et notamment de sa modulation par des conductances voltage-dépendantes ou bien encore par des conductances bruitées comme par exemple l'activité spontanée synaptique.

1. L'hippocampe

1.1 Base anatomique de la région de l'hippocampe

L'hippocampe, ou formation hippocampique, est une structure cérébrale appartenant au système limbique et joue un rôle crucial dans les processus de mémorisation et d'apprentissage. Le terme de région hippocampique regroupe à la fois la formation hippocampique et la région para-hippocampique.

Chez le rat, la formation hippocampique est une structure bilatérale, symétrique, en forme de C et qui est située dans la partie caudale du cerveau. 3 sous-régions peuvent être

distinguées : le gyrus dentelé (DG), l'hippocampe proprement dit (constitué des champs ammoniques CA3, CA2 et CA1) et le subiculum. Le cortex qui constitue la formation hippocampique a une apparence en 3 couches. La première couche est la couche profonde, comprenant un ensemble de fibres afférentes et efférentes ainsi que des interneurons. Dans le DG, cette couche porte le nom de hile, tandis que dans les champs ammoniques (CA) cette couche se réfère comme étant le stratum oriens (SO). En superficie de cette couche polymorphe on retrouve la couche cellulaire qui est composée de cellules principales excitatrices et d'interneurones. Dans le DG, cette couche est appelée couche granulaire tandis que dans les CA et le subiculum elle est appelée couche des cellules pyramidales ou encore stratum pyramidale (SP). Enfin la couche la plus superficielle est la couche moléculaire (ou stratum moleculare) dans le DG et le subiculum. Dans les CA, la couche moléculaire est subdivisée en plusieurs sous-couches. Dans CA3, 3 sous-couches se distinguent : le stratum lucidum (SL) qui reçoit les afférences provenant du DG, le stratum radiatum (SR) comprenant les dendrites apicales des neurones localisés dans le SP, et plus superficiellement le stratum lacunosum-moleculare (SLM) comprenant une arborisation dendritique distale des neurones. La représentation des sous-couches dans CA2 et CA1 est la même, à l'exception du SL qui est absent.

La région para-hippocampique quant à elle est adjacente à la formation hippocampique, bordant le subiculum. Elle est divisée en 5 sous-régions : le pré-subiculum, le para-subiculum, le cortex entorhinal (EC, avec une aire médiale (MEA) et une aire latérale (LEA)), le cortex périrhinal et le cortex post-rhinal (Van Strien et al., 2009).

1.2 Connexion entre la formation hippocampique et la région para-hippocampique

Les projections néocorticales ont pour cible la région para-hippocampique (PHR), qui en retour devient la principale source des projections neuronales reçues par la formation hippocampique (HF). Dans la PHR, deux courants de projection parallèles sont discernés : le cortex péri-rhinal (PER) projette vers le cortex entorhinal latéral (LEA), alors que le cortex post-rhinal (POR) projette lui vers le cortex entorhinal médian (MEA), et ce de manière réciproque entre le cortex entorhinal (EC) et le PER/POR. De plus l'EC reçoit également des afférences synaptiques provenant du pré-subiculum (PrS). L'EC est la source de la voie perforante qui projette vers toutes les régions de la formation hippocampique. La couche II du EC projette vers le DG et CA3, tandis que la couche III projette vers CA1 et le subiculum.

Après avoir effectué le circuit tri-synaptique au sein de la formation hippocampique, la sortie et le retour vers la PHR se fait via les projections de CA1 et du subiculum vers les couches profondes V et VI du EC.

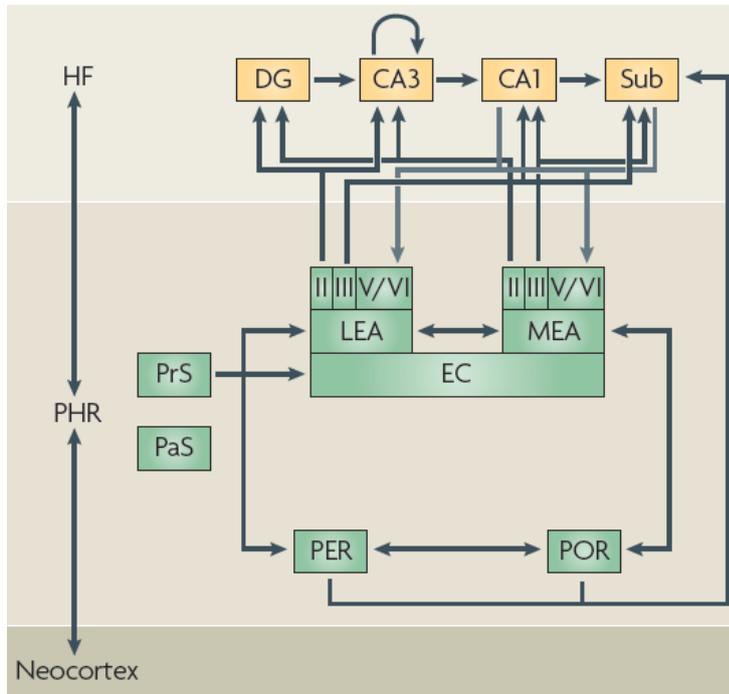


Figure I1. Vue standard de la connexion entre la formation hippocampique (HF) et la région para-hippocampique (PHR).

Cette vue standard de la connexion entre la formation hippocampique et la région para-hippocampique présentée ici est basée sur des modèles de connexion d'articles récents (Brown and Aggleton, 2001; Squire et al., 2004; Eichenbaum et al., 2007; Bird and Burgess, 2008).

1.3 Le circuit tri-synaptique

Traditionnellement, le fonctionnement de l'hippocampe est décrit par la mise en jeu du circuit tri-synaptique qui forme une boucle entre le cortex entorhinal (porte d'entrée et de sortie) et la formation hippocampique où l'on retrouve les 3 sortes de contacts synaptiques entre différentes cellules excitatrices.

L'entrée majeure du circuit tri-synaptique est faite par la voie perforante constituée des projections axonales de neurones de la couche II du cortex entorhinal. Cette voie perforante (PP, perforant path) est à l'origine de la première connexion synaptique avec les cellules granulaires du gyrus dentelé (DG). Les cellules granulaires du DG projettent ensuite leurs axones, les fibres moussues, vers les dendrites proximales des cellules pyramidales de CA3, créant ainsi la deuxième connexion synaptique du circuit tri-synaptique. La région CA3 est considérée comme une zone épileptogène en raison de la forte connexion récurrente entre les cellules pyramidales excitatrices de CA3. Pour finir, les cellules pyramidales CA3 projettent via les collatérales de Schaffer (collatérales d'axones) vers les dendrites proximales des

cellules pyramidales de CA1, créant la troisième et dernière connexion synaptique et finissant donc le circuit tri-synaptique de l'hippocampe.

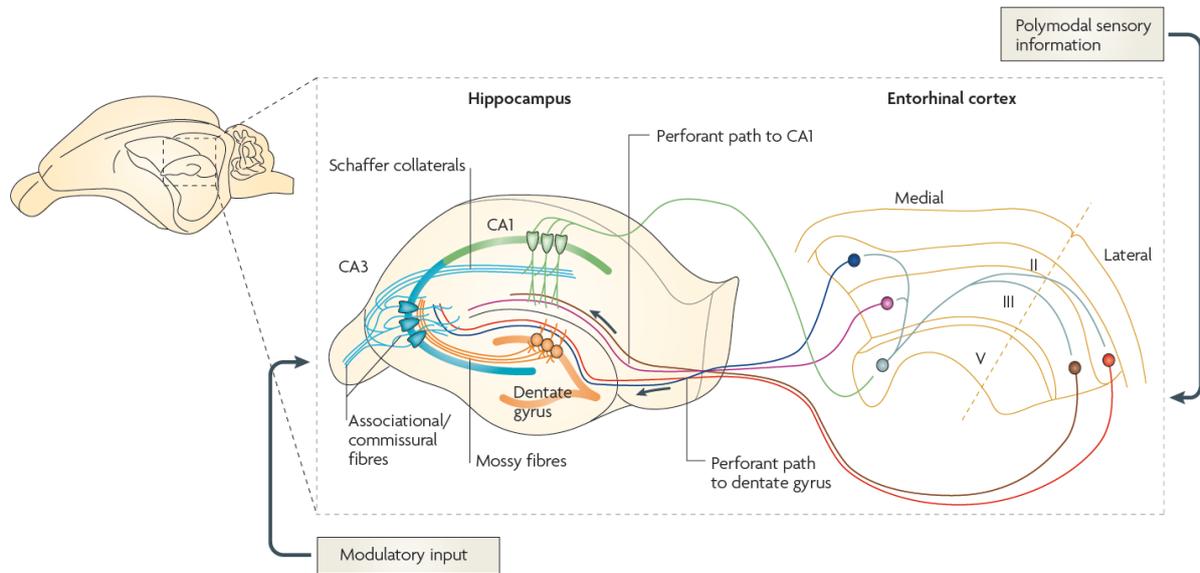


Figure I2. Anatomie basique de l'hippocampe.

Représentation schématique du circuit tri-synaptique (EC>DG>CA3>CA1) de l'hippocampe mais d'une voie plus directe (EC>CA1). Illustration tiré de Neves et al., 2008.

D'autre part, il existe une voie plus directe entre le cortex entorhinal et l'hippocampe. En effet, les cellules excitatrices de la couche III du cortex entorhinal projettent directement, par une autre voie similaire à la voie perforante, la voie temporo-ammonique, vers les dendrites distales des cellules pyramidales de CA1. Ceci peut poser légitimement la question du rôle crucial ou non de ce circuit tri-synaptique dans le fonctionnement de l'hippocampe et des fameuses cellules pyramidales CA1 appelées aussi cellules de lieu (voir chapitres suivants). Dans une revue récente (Ahmed and Mehta, 2009), il est discuté de la relative contribution de la région CA3 et du cortex entorhinal sur l'activité de cellules de lieu de CA1. Concernant l'importance de la région CA3 sur le fonctionnement des cellules de lieu CA1, des études du groupe de Moser faites chez le rat (Brun et al., 2002) ou encore du groupe de Tonegawa chez la souris (Nakashiba et al., 2008) ont montré que des lésions des afférences de CA1 provenant de la région CA3 ne perturbaient pas le fonctionnement des cellules de lieu. Cependant le taux de décharge (plus faible) des cellules de lieux ainsi que la représentation spatiale du champ d'activité (plus large) de ces dernières étaient affectés de manière significative par rapport aux animaux contrôles. Concernant les conséquences comportementales de ces lésions des projections de CA3 vers CA1, il est intéressant d'apprendre qu'il est différent entre le rat et la souris. En effet, chez le rat, il semble que les lésions occasionnent des déficits au niveau de la

mémoire spatiale tandis que chez les souris, il ne semble pas y avoir de déficits après le test de la piscine de Morris. Cette différence de résultat comportemental entre espèce peut s'expliquer par les différences anatomiques de l'hippocampe qu'ont les rats et les souris (Ahmed and Mehta, 2009). Pour comprendre en retour la contribution du cortex entorhinal sur le fonctionnement des cellules de lieu, une autre étude du groupe de Moser (Brun et al., 2008) a montré que des lésions chimiques du cortex entorhinal, provoquant donc une absence d'innervation directement par le cortex entorhinal des cellules de CA1, montraient les mêmes résultats qu'avec les lésions de CA3, à savoir une baisse du taux de décharge et un élargissement des champs d'activité des cellules de lieu. Ces résultats d'études lésionnelles montrent que CA3 seul ou le cortex entorhinal seul suffisent pour que les cellules de CA1 puissent décharger et définir une représentation spatiale de l'environnement.

1.4 Région CA2 de l'hippocampe

Il est admis que dans l'hippocampe, le principal chemin de l'information mnésique est celui emprunté par le circuit dit « tri-synaptique ». C'est-à-dire que la voie d'entrée, la voie perforante, provenant du CE, fait une première synapse avec les cellules granulaires du gyrus dentelé. Puis les axones de ces dernières, les fibres moussues, projettent vers la région CA3 où elles contactent les cellules pyramidales de CA3. Enfin, les collatérales d'axones de cellules pyramidales de CA3, les collatérales de Schaffer, projettent vers la région CA1 de l'hippocampe où se trouve la troisième et dernière synapse de ce circuit tri-synaptique.

Une récente étude a montré cependant que ce circuit pouvait être beaucoup plus complexe si l'on tenait compte de la région CA2 de l'hippocampe. Le groupe de Siegelbaum a récemment montré dans une étude que les cellules pyramidales de CA2 pouvaient s'incorporer dans le circuit hippocampique créant ainsi un circuit di-synaptique (Chevalayre and Siegelbaum, 2010), shuntant la région CA3 connue pour être épileptogène. Dans leur étude, les auteurs font une étude à la fois morphologique mais aussi fonctionnelle de cette région peu étudiée. Les neurones de CA2 sont principalement excités au niveau de leurs dendrites distales par des afférences excitatrices provenant de la couche II du CE et au contraire faiblement excités par les cellules pyramidales de CA3. Ces neurones de CA2 projettent ensuite vers les cellules pyramidales de CA1 en faisant synapse à la fois au niveau du stratum oriens et radiatum, créant alors un circuit hippocampique dit « di-synaptique ».

Une autre étude morphologique montrera que ces cellules pyramidales de CA2 ont comme cibles prioritaires les cellules pyramidales CA1 ipsi-latérales donc du même

hippocampe, contrairement aux cellules de CA3 qui ont une innervation bilatérale des cellules CA1 aussi bien de l'hippocampe ipsi que contra-latéral (Shinohara et al., 2012).

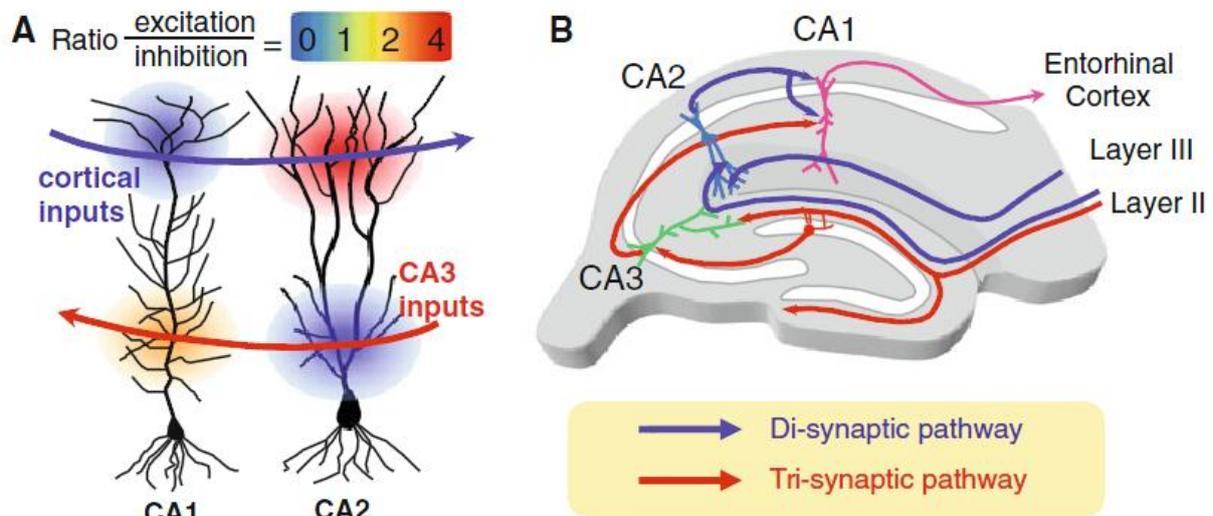


Figure I3. Intégration synaptique de CA1 vs CA2 dans les différents circuits polysynaptiques. A, Représentation schématique de la conduction synaptique nette entre les entrées synaptiques provenant du cortex entorhinal et de CA3 sur les neurones de CA1 et CA2. Le ratio excitation/inhibition montre que les afférences corticales du EC ont un effet plus excitateur sur les neurones de CA2 que pour CA1 où une forte inhibition reste présente, tandis que les afférences provenant de CA3 montrent un effet excitateur plutôt en faveur de CA1 car au niveau de CA2, une forte feed-forward inhibition vient baisser le ratio. B, Illustration schématique du transfert de l'information dans l'hippocampe par la voie di-synaptique et/ou la voie tri-synaptique classique (Piskorowski and Chevaleyre, 2012).

1.5 Innervation cholinergique de la région hippocampique et rôle physiologique

Le système cholinergique dans l'hippocampe est principalement représentée par la voie septo-hippocampique. Les corps cellulaires des neurones cholinergiques projetant vers l'hippocampe sont localisés dans le septum médian et dans la bande diagonale de Broca. Ces projections sont en grande partie cholinergiques et GABAergiques. Pour ce qui est de l'innervation cholinergique proprement dite, une étude immunocytochimique (Frotscher and Léránth, 1985) a révélé que les terminaisons cholinergiques des neurones de la voie septo-hippocampique étaient observés au niveau des dendrites proximales de neurones pyramidaux et du gyrus dentelé, ainsi que dans la région du hile et de toutes les couches cellulaires de l'hippocampe (stratum oriens, radiatum, et lacunosum-moleculare). Une autre étude plus

récente a montré qu'il existait aussi des neurones non-GABAergiques qui seraient des neurones non-principaux cholinergiques (Frotscher et al., 2000).

Le système cholinergique au sein de l'hippocampe est également marqué par l'importante expression des récepteurs cholinergiques nicotinique et muscarinique. Les récepteurs nicotiniques sont fortement exprimés dans l'hippocampe que ce soit sur les cellules pyramidales excitatrices ou les interneurons inhibiteurs. Les récepteurs muscariniques sont également fortement exprimés sur les différentes classes de neurones de l'hippocampe, au niveau pré-synaptique mais aussi post-synaptique, permettant une fine régulation de l'excitabilité neuronale et de la libération de neurotransmetteurs comme le glutamate ou le GABA (pour revue voir Drever et al., 2011).

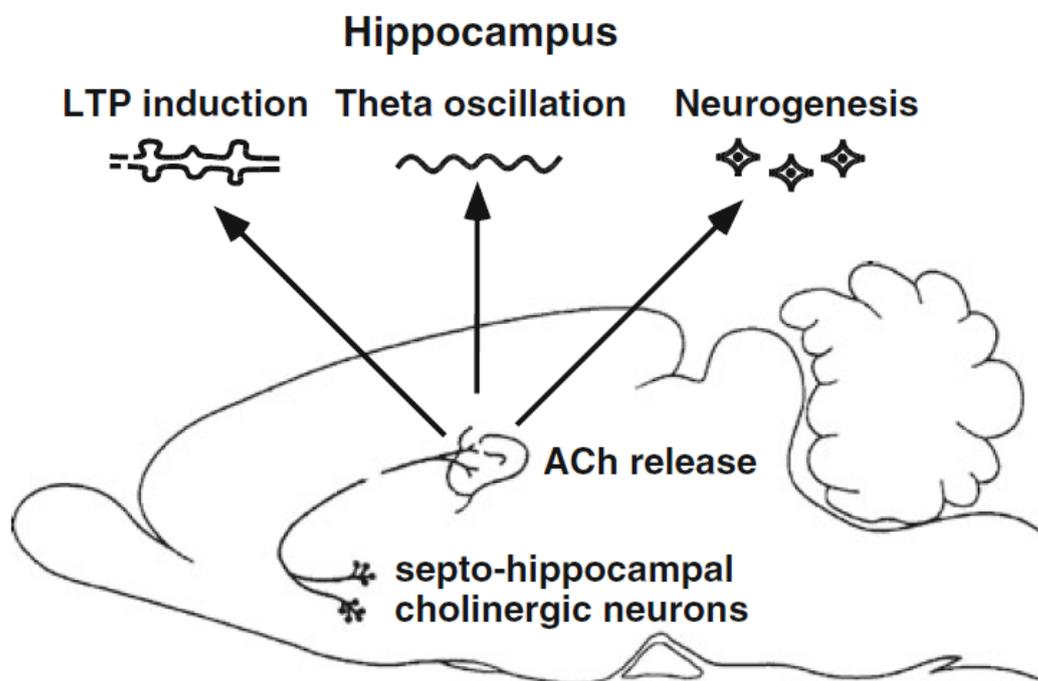


Figure I4. Illustration schématique des neurones cholinergiques de la voie septo-hippocampique. La libération d'acétylcholine va jouer un rôle important dans les processus mnésiques que ce soit au niveau cellulaire (induction de la LTP), à l'échelle du réseau (genèse du rythme thêta), ou bien encore dans la neurogenèse hippocampique.

Plusieurs études ont montré que le système cholinergique, via l'acétylcholine (ACh), joue un rôle important dans les fonctions majeures de l'hippocampe (pour revue voir Mitsushima, 2011). Le taux d'acétylcholine est connu pour augmenter au cours de tests comportementaux comme l'exploration spatiale. Cela suggère que le système cholinergique joue un rôle crucial dans la mémoire spatiale. De plus des altérations pharmacologiques de ce système par divers antagonistes des récepteurs muscariniques (scopolamine par exemple)

montrent des baisses de la performance spatiale chez le rat (Herrera-Morales et al., 2007). A l'échelle du réseau neuronal de l'hippocampe, l'ACh est à l'origine de la genèse du rythme thêta qui module notamment des processus de plasticité comme la plasticité à long-terme (LTP) et qui semble être un rythme essentiel dans les processus de mémoire et d'apprentissage. Au niveau cellulaire, l'application d'agonistes cholinergique comme le carbachol (CCh) peuvent induire de la LTP dans les cellules principales de l'hippocampe sans protocole électrique d'induction de la LTP (stimulation électrique à haute fréquence) (Auerbach and Segal, 1996). De plus, l'ACh semble également jouer un rôle important dans la neurogenèse notamment dans la région du DG où l'application de scopolamine réduit considérablement le nombre de nouvelles cellules formées dans la région de l'hippocampe connue pour sa neurogenèse chez l'adulte (Knox et al., 2011).

1.6 Contribution des neurones hippocampiques dans la mémoire de reconnaissance

Le rôle de l'hippocampe dans la mémoire de reconnaissance est controversé. Cette mémoire de reconnaissance peut se diviser en deux. D'une part la mémoire de reconnaissance spatiale où l'aspect de la localisation d'un objet est déterminant, et d'autre part la mémoire de reconnaissance non-spatiale où sera pris en compte essentiellement la forme de l'objet et/ou ses différentes caractéristiques. Dans une étude récente du groupe d'Elizabeth Warburton, il a été montré qu'à la suite de lésion de l'hippocampe, la mémoire de reconnaissance spatiale était affectée de façon significative alors que la mémoire de reconnaissance non-spatiale était plutôt affectée suite à des lésions de la région para-hippocampique comme le cortex péri-rhinal (Barker and Warburton, 2011).

1.7 Les cellules de lieu

Les cellules de lieu (ou place cells) découvertes par John O'Keefe et John Dostrovsky (O'Keefe and Dostrovsky, 1971) sont l'argument majeur, encore aujourd'hui, de l'implication de l'hippocampe dans le codage des informations relatives à la mémoire spatiale. Ces cellules de l'hippocampe présentent des bouffées soudaines de potentiels d'action lorsque l'animal se trouve à certains emplacements d'un environnement spatial qu'il parcourt librement. L'étude approfondie de la décharge neuronale de ces cellules de lieu a montré qu'il s'agissait bien de

cellules sensibles à la localisation dans l'espace de l'animal et non à l'orientation ou la trajectoire de l'animal, d'où leur nom de « cellule de lieu ».

D'autres cellules dites « intégrateurs neuronaux de l'espace », et ayant un mécanisme d'action comparable aux cellules de lieu, ont été identifiées par la suite comme les cellules d'orientation de la tête (head-direction cells), initialement découvertes dans le post-subiculum puis le thalamus (Muller et al., 1996; Taube, 1998), ou encore les cellules de grilles (ou grid cells) du cortex entorhinal (Hafting et al., 2005) qui fournissent, à la différence des cellules de lieu, un maillage de l'espace dans lequel l'animal se déplace.

Anatomiquement, les cellules de lieu sont des cellules pyramidales que l'on peut trouver aussi bien dans la région CA1 que CA3 de l'hippocampe (O'Keefe, 1979) mais aussi dans toute la structure de l'hippocampe que ce soit l'hippocampe ventral ou dorsal. La fréquence de décharge moyenne des cellules de lieux est d'environ 1 Hz (Ranck 1973) bien que cette fréquence puisse être plus importante en fréquence instantanée et est fonction de la vitesse et/ou de la durée avec laquelle le rat va traverser le champ d'activité (ou place field) pour la cellule de lieu considérée (McNaughton et al., 1983).

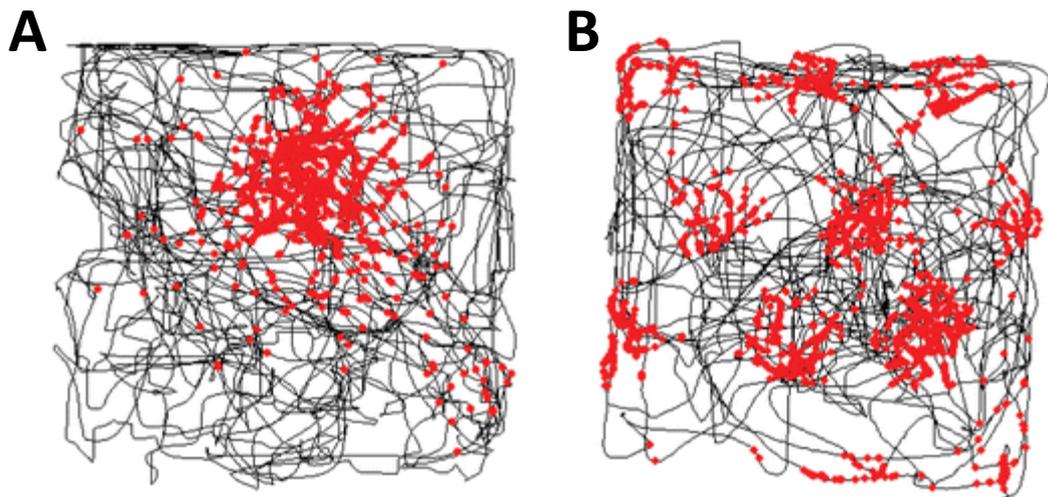


Figure 15. Cellule de lieu et cellule de grille. A, Représentation de la localisation de l'émission des potentiels d'action d'une cellule de lieu (en rouge) au cours de la trajectoire (en noir) d'un animal dans une arène. B, Représentation de la localisation de l'émission des potentiels d'action d'une cellule en grille (en rouge) au cours de la trajectoire (en noir) d'un animal dans une arène. A noter une seule localisation pour la cellule de lieu (A), tandis que la cellule de grille (B) montre plusieurs localisations d'activité définissant un maillage de l'environnement dans lequel évolue l'animal. Illustration tirée de Moser et al., 2008.

2. L'activité inhibitrice dans le SNC

2.1 L'acide gamma-aminobutyrique (GABA)

L'acide gamma-aminobutyrique (GABA) est le principal neurotransmetteur inhibiteur du système nerveux central (cerveau et moelle épinière). Il a pour fonction de diminuer l'activité nerveuse des neurones après s'être fixé sur les récepteurs membranaires. Il interviendrait dans de nombreux processus physiologiques comme la mémorisation, le sommeil ou la dépendance aux drogues. Véritable frein pour la transmission de l'influx nerveux le GABA servirait entre autre à contrôler la peur ou l'anxiété qui se manifeste par une surexcitation neuronale. Ainsi, il apparaît qu'un dysfonctionnement du système GABAergique est à l'origine de nombreux troubles du système nerveux (Bettler et al., 2004). Alors qu'une hyperactivité de ce système est associée à la schizophrénie, une hypoactivité peut provoquer des crises d'épilepsie, d'anxiété, des états dépressifs ainsi que des troubles du sommeil. Le GABA agit principalement via deux types de récepteurs : le récepteur ionotropique GABA_A essentiellement perméable aux ions chlorure, et le récepteur métabotrope GABA_B à sept segments transmembranaires et couplé aux protéines Gi/o. Il existe également un troisième type de récepteur, le récepteur ionotropique GABA_C, essentiellement localisé dans la rétine.

Dans le cerveau des mammifères, le GABA est principalement synthétisé à partir du glutamate (neurotransmetteur exciteur) via des décarboxylases que sont les enzymes GAD 65 et GAD 67 (GAD, glutamic acid decarboxylase). Une fois synthétisé, le GABA est chargé dans des vésicules synaptiques grâce à des transporteurs vésiculaires (VGAT) et est ensuite libéré dans la fente synaptique où il pourra se fixer sur ses récepteurs membranaires. Le GABA peut être ensuite recapturé par ses transporteurs neuronaux ou gliaux (GAT) où il sera pris en charge par des transaminases pour recyclage dans le métabolisme (Owens and Kriegstein, 2002).

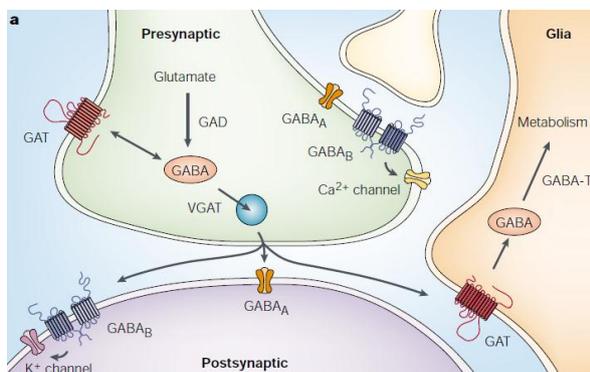


Figure I6. Signalisation du GABA. Illustration schématique de la synthèse, de l'action, et de la dégradation du GABA dans le système nerveux central. Tiré de Owens and Kriegstein, 2002.

2.2 Récepteur GABA_A

Les récepteurs GABA_A sont des récepteurs canaux dits ionotropiques. Lorsque le GABA se fixe sur cette famille de récepteurs, il se produit un changement de conformation spatial qui va conduire en une ouverture du pore du canal, et donc au passage d'un flux d'ions entrant ou sortant. Le récepteur GABA_A est principalement perméable aux ions chlorures qui sont des anions (Cl⁻). Cependant, d'autres anions comme les ions bicarbonates (HCO₃⁻) peuvent aussi passer à travers le pore du récepteur GABA_A. Les récepteurs GABA_A sont composés par l'assemblage de 5 sous-unités différentes (pentamères) parmi les sous-unités α, β, γ, δ, ε, θ, et π, les sites de fixations du GABA se situant en général entre les sous-unités α et β du pentamère. Les récepteurs GABA_A sont localisés aussi bien au niveau pré-synaptique que post-synaptique (Owens and Kriegstein, 2002).

2.3 Récepteur GABA_B

Les récepteurs GABA_B sont des récepteurs liés aux protéines G dits métabotropiques. Contrairement aux récepteurs GABA_A, ils ne sont perméables à aucun ions et la fixation du GABA sur ce type de récepteur va conduire à l'activation de protéines G intracellulaires qui sera à l'origine de la mise en action d'effecteurs primaires, de seconds messagers et d'enzymes qui pourront à leur tour moduler d'autres canaux ou récepteurs. Les récepteurs GABA_B pré-synaptiques sont à l'origine d'une diminution de la transmission synaptique en réduisant l'entrée de calcium au niveau de la terminaison synaptique par la fermeture des canaux calciques, tandis que les récepteurs GABA_B localisés au niveau post-synaptique vont être à l'origine d'une hyperpolarisation du neurone post-synaptique en activant des canaux potassiques de type GIRK (Bormann, 1988).

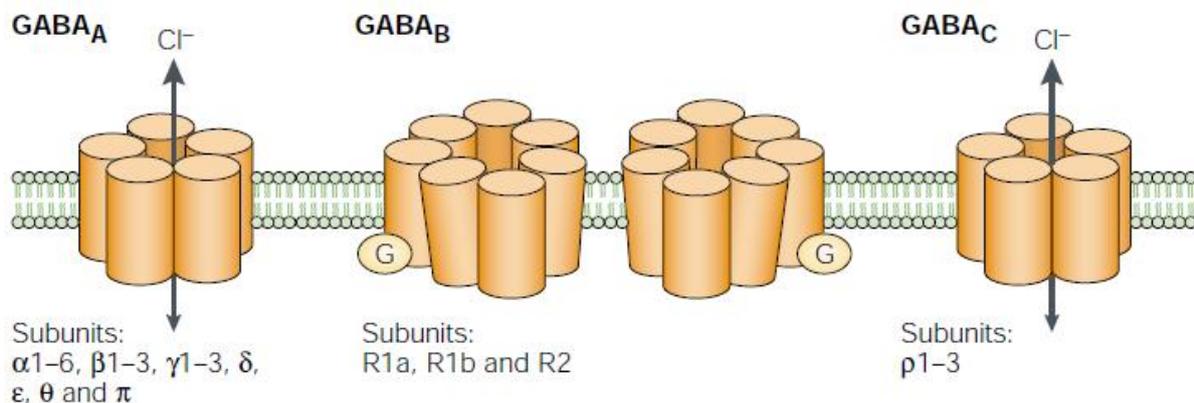


Figure I7. Récepteurs GABA. Schéma illustrant les différentes sous-unités composant les récepteurs GABA_A GABA_B et GABA_C (Owens and Kriegstein, 2002).

2.4 Du GABA dépolarisant au GABA hyperpolarisant

Dans le cerveau adulte, le GABA est connu pour être le principal neurotransmetteur inhibiteur. Or la polarité du GABA n'a pas toujours été ainsi au cours du développement et notamment, chez le rat, durant les premiers jours après la naissance. En effet, dans le cerveau immature, le GABA est plutôt excitateur (ou dépolarisant) en raison d'une concentration en ions chlorure intracellulaire plus élevée. Parce que le potentiel d'inversion des récepteurs GABA_A est plus dépolarisé que le potentiel de repos, à l'ouverture des récepteurs GABA_A, il y a une sortie d'ions chlorure ce qui va avoir comme conséquence une dépolarisation du potentiel de membrane et donc un effet excitateur du GABA. Cette concentration élevée en ions chlorure intracellulaire s'explique par l'expression tardive de la pompe de relargage des ions Cl⁻ (KCC2). D'après les travaux de Yehezkel Ben-Ari, l'effet dépolarisant du GABA aurait un rôle crucial dans le développement du cerveau immature car les synapses GABAergiques seraient formées avant les synapses glutamatergiques, d'où l'intérêt d'avoir un système excitateur fonctionnel pour créer un réseau neuronal. De plus, le GABA dépolarisant serait en partie à l'origine de potentiels dépolarisants géants, les GDP (Giant depolarizing potentials), qui permettraient également de former les réseaux neuronaux. Une fois les réseaux neuronaux formés avec à la fois des synapses GABAergiques et glutamatergiques, la nécessité d'un système inhibiteur verrait alors l'expression de la pompe KCC2 qui régulerait la concentration intracellulaire en Cl⁻, faisant du GABA le neurotransmetteur inhibiteur responsable de la régulation des réseaux neuronaux que l'on connaît dans le cerveau adulte (Ben-Ari, 2002; Ben-Ari et al., 2012).

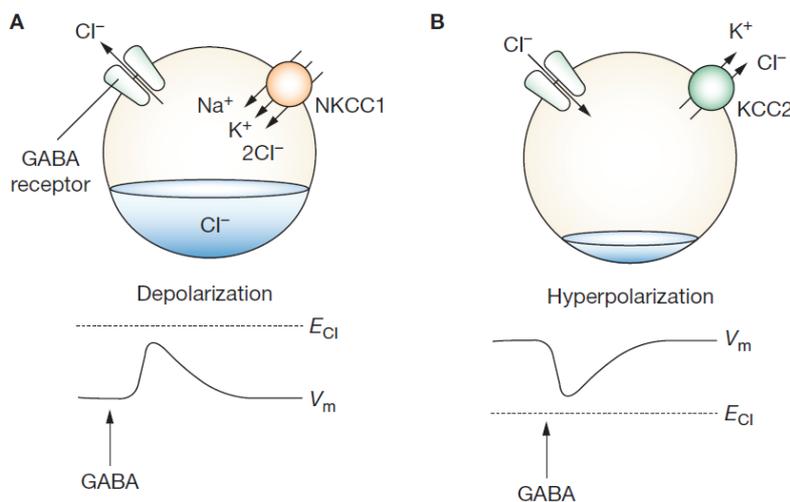


Figure 18. Régulation de la concentration intracellulaire d'ions chlorure par les pompes NKCC1 et KCC2. Le changement de $[Cl^-]_i$ va conditionner le rôle dépolarisant puis hyperpolarisant du GABA au cours du développement. D'après Kahle et al., 2008.

2.5 Connectivité inhibitrice dans l'hippocampe

Il existe une très grande diversité des neurones GABAergiques dans le système nerveux central tant du point de vue de leur morphologie, leur profil de décharge (fast spiking, regular spiking...), leur mode de libération (synchrone ou asynchrone), leur projections sur les cellules cibles (périsomatique, axonale, dendritique...) que de leur contenu en peptides qu'ils expriment (cholécystokinine, parvalbumine, somatostatine...). Il est donc difficile de passer en revue tous ces types de neurones GABAergiques et de les classer de façon distincte les uns des autres. Dans un souci de clarté, nous nous focaliserons sur certains neurones GABAergiques dans la région CA1 de l'hippocampe, notamment ceux qui semblent être impliqués de près à la régulation du réseau hippocampique et à la modulation de la précision de la décharge neuronale comme par exemple les neurones GABAergiques exprimant la cholécystokinine (CCK) ou bien encore la parvalbumine (PV).

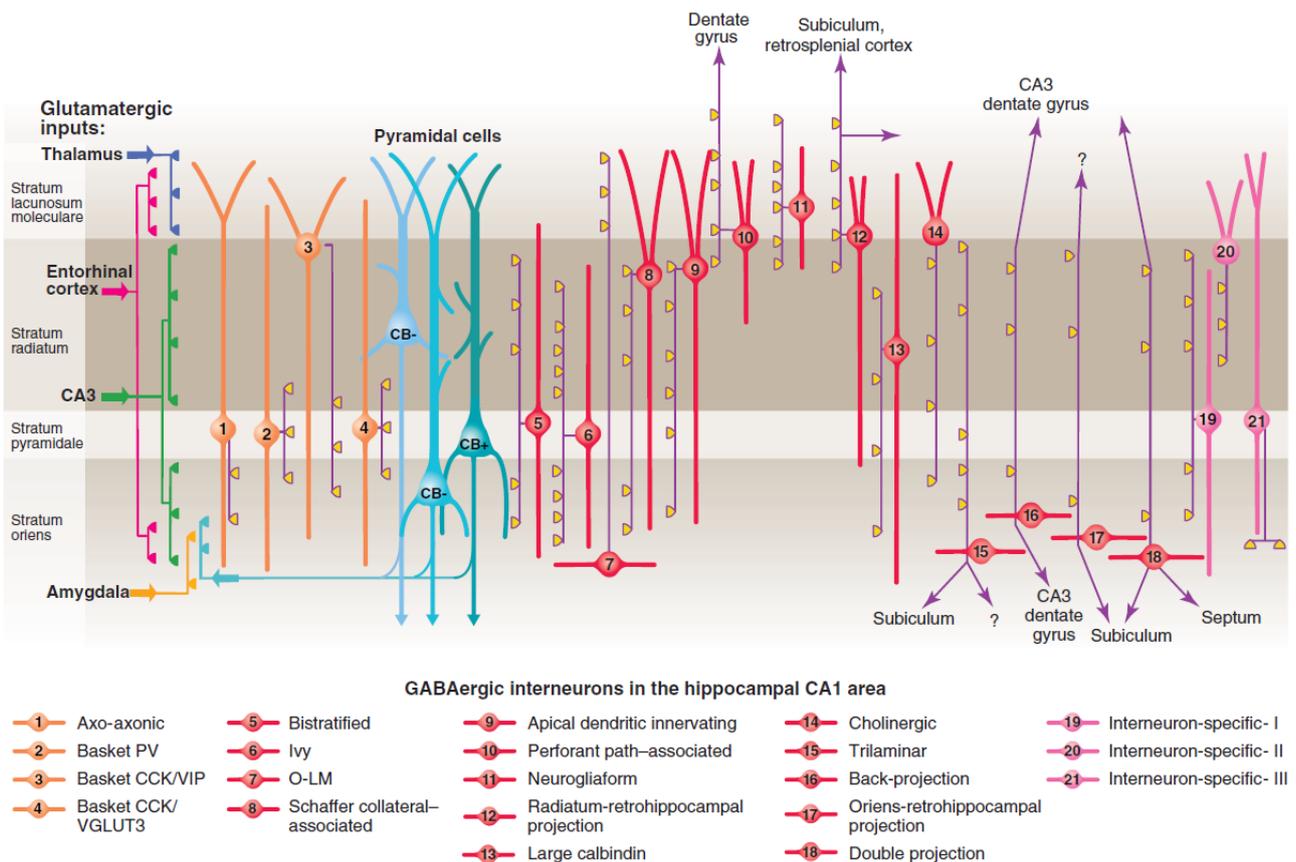


Figure I9. Illustration schématique de l'innervation d'une cellule pyramidale par les différents sous-types d'interneurones dans la région CA1 de l'hippocampe. Les afférences excitatrices sont indiquées sur la gauche. Les interneurones en orange et rouge innervent principalement les cellules pyramidales (bleu) alors que les interneurones en rose innervent d'autres interneurones de la région CA1 (Klausberger and Somogyi, 2008).

Dans la région CA1 de l'hippocampe, une cellule pyramidale peut recevoir des afférences inhibitrices d'au moins 21 sous-types d'interneurones (Klausberger and Somogyi, 2008). Par exemple, les interneurones exprimant la PV peuvent innervier plusieurs compartiments distincts d'une cellule pyramidale comme le segment initial de l'axone (cellule axo-axonique), le corps cellulaire ou les dendrites proximales (cellule en panier ou basket cell), les dendrites basales et obliques co-alignées avec les entrées excitatrices provenant de CA3 (cellule bi-stratifiée), ou bien encore l'arborisation terminale des dendrites apicales recevant également les entrées excitatrices provenant du cortex entorhinal (interneurone O-LM). En plus des neurones exprimant la PV, il y a les neurones exprimant la CCK qui innervent de manière non négligeable les cellules pyramidales de CA1. Les cellules en panier par exemple innervent les neurones pyramidaux au niveau du soma et des dendrites proximales, mais d'autres types d'interneurones exprimant la CCK innervent aussi les cellules pyramidales au niveau des dendrites recevant les afférences excitatrices provenant de CA3 ou encore de façon plus distale dans la couche du stratum lacunosum-moleculare (Klausberger and Somogyi, 2008).

Pour finir il y a aussi la présence au sein de la région CA1 de l'hippocampe, d'interneurones projetant vers d'autres régions hippocampiques comme CA3, le gyrus dentelé ou le subiculum voire extra-hippocampiques comme le septum.

2.6 Distinction entre les interneurones CCK et PV

Une distinction importante entre les interneurones PV et CCK est leur mode de libération de neurotransmetteur. En effet, Hefft et Jonas ont montré que les interneurones CCK libéraient préférentiellement le GABA de manière asynchrone alors que les interneurones PV avaient un mode de libération plutôt synchrone au niveau du gyrus dentelé (Hefft and Jonas, 2005).

Une étude du groupe de Somogyi a montré que les interneurones PV et CCK avaient un rôle complémentaire dans le fonctionnement des oscillations du réseau hippocampique. Les résultats de cette étude démontrent que contrairement aux neurones PV dont le but serait de réguler la synchronisation de tout le réseau hippocampique durant le cycle thêta, les neurones CCK qui sont sensibles aux endocannabinoïdes pourraient contribuer à la modulation de la décharge de sous-groupes de neurones pyramidaux notamment ceux mis en action lors de processus d'exploration spatiale comme les fameuses cellules de lieu de l'hippocampe (Klausberger et al., 2005).

Une autre étude du groupe de Scanziani a montré également une distinction temporelle de l'activité des interneurons CB1+ (exprimant la CCK) et les interneurons CB1- (exprimant la PV). Dans cette étude, les auteurs montrent que l'amplitude et la dynamique de l'excitation reçue par les différentes classes d'interneurons ainsi que leur constante de temps membranaire et la quantité d'inhibition di-synaptique va déterminer leur patron d'activité spécifique. Ainsi, les interneurons PV (CB1-) sont capables de répondre à des entrées synaptiques excitatrices de façon indépendante (délai d'au moins 3ms nécessaire) ce qui permet une feed-forward inhibition de leurs cellules cibles. Les interneurons CCK (CB1+) recevant une excitation moindre auront besoin d'une sommation des entrées synaptiques excitatrices pour générer un potentiel d'action ce qui implique de façon préférentielle les interneurons CCK dans la feed-back inhibition et leur contribution dans la modulation du rythme gamma dans l'hippocampe (Glickfeld et al., 2008).

D'autre part, il a été également montré ces dernières années qu'il pouvait y avoir une régulation des interneurons CCK sur les différentes classes d'interneurons régulant l'activité des cellules pyramidales dans CA1. Ainsi le groupe de Alger a montré dans une étude que la CCK libérée par les interneurons serait responsable de l'augmentation de l'activité inhibitrice provenant d'interneurons insensibles aux endocannabinoïdes (comme les interneurons PV+) qui en retour, par une libération accrue de GABA, inhiberaient les interneurons CCK+ par activation des récepteurs GABA_B pré-synaptiques de ces derniers (Karson et al., 2008).

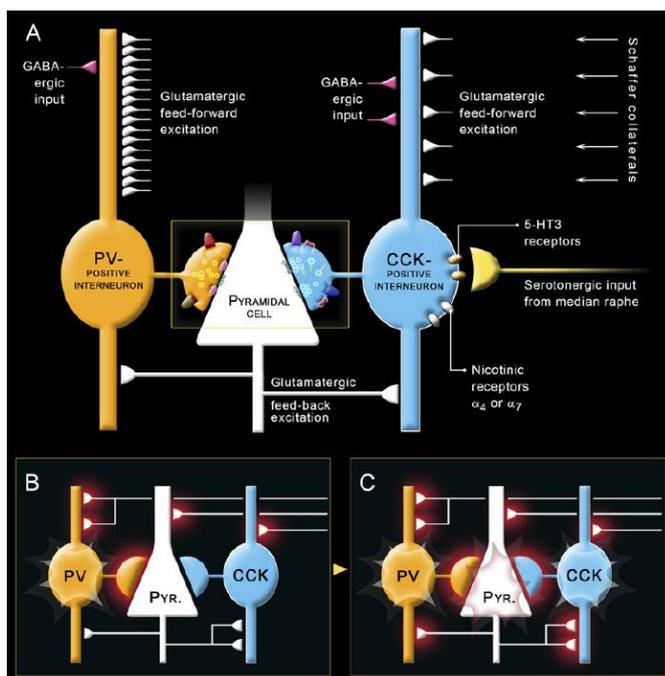


Figure I10. Connectivité des interneurons PV+ et CCK+ dans l'hippocampe. A, Schéma représentant les entrées synaptiques excitatrices et inhibitrices reçues par les interneurons CCK+ et PV+. A noter que les interneurons PV+ reçoivent jusqu'à 3 fois plus d'excitation que les interneurons PV-. B, La stimulation des collatérales de Schaffer (provenant de CA3) vont stimuler en premier lieu les interneurons PV+. C, Les interneurons CCK+, en raison de leur constante de temps membranaire, sommeront leurs entrées synaptiques excitatrices, et seront en activité quand les neurones pyramidaux voisins déchargeront, créant une excitation supplémentaire des interneurons CCK+ (Freund et al., 2003).

Récemment, une étude du groupe de Soltesz a montré une spécificité au niveau des synapses périsomatiques entre les interneurons PV et les neurones pyramidaux. Il semblerait que la présence de canaux chlorures sensible au voltage (CIC-2) permettrait une régulation de la concentration intracellulaire local en ions chlorures au niveau de ces synapses. Les auteurs ont remarqué que le potentiel d'inversion du GABA était plus hyperpolarisé au niveau des synapses PV+ que des synapses CCK+ (-71mV contre -68mV respectivement). Le canal CIC-2 permettrait donc, par son expression sélective au niveau des synapses PV+, de relarguer des ions chlorures à l'extérieur du neurone pyramidal, maintenant ainsi une action hyperpolarisante plus importante du GABA au niveau de ces synapses, notamment lors de période d'activité neuronale intense (Földy et al., 2010).

2.7 Feed-back Inhibition et Feed-Forward Inhibition

L'inhibition récurrente (ou feed-back inhibition) est une inhibition di-synaptique des neurones pyramidaux qui suite à leur activation va entraîner l'excitation des interneurons qui les contactent, ayant comme conséquence une inhibition en retour des neurones pyramidaux. Dans la région CA1 de l'hippocampe, cette feed-back inhibition concerne plusieurs sous-types d'interneurons comme les neurones exprimant la PV ou la CCK qui innervent la région périsomatique des neurones pyramidaux de CA1 (Glickfeld et al., 2008), ou bien encore les interneurons axo-axoniques (cellule chandelier) qui innervent plutôt le compartiment axonal et notamment la région du segment initial de l'axone (Kullmann, 2011). La feed-back inhibition semble jouer un rôle important dans l'apparition des oscillations gamma puisque l'activation par exemple des interneurons PV+ par des techniques d'optogénétique facilite l'émergence de ces oscillations (Cardin et al., 2009) alors que l'application d'agonistes des récepteurs opioïdes qui inhibent l'activité des interneurons PV+ abolissent les oscillations gamma (Gulyás et al., 2010)

L'inhibition antérograde (ou feed-forward inhibition) quant à elle est une inhibition di-synaptique des neurones pyramidaux qui s'accompagne également d'une excitation mono-synaptique de ces derniers. Dans la région CA1 de l'hippocampe, les collatérales de Schaffer, provenant de la région CA3, peuvent contacter à la fois un neurone pyramidal (neurone cible) de la région CA1, créant dans un premier temps un EPSP dans le neurone cible, mais aussi un interneurone lui-même connecté au neurone cible créant une composante inhibitrice, l'IPSP, qui caractérise la feed-forward inhibition. Au début des années 2000, le groupe de Scanziani a émis l'hypothèse que cette feed-forward inhibition était responsable d'une amélioration de la

précision temporelle de la décharge neuronale dans les neurones CA1 de l'hippocampe (Pouille and Scanziani, 2001). Dans cette étude, les auteurs montrent qu'après le blocage pharmacologique de la composante inhibitrice de la séquence EPSP-IPSP réalisée suite à la stimulation des collatérales de Schaffer, la fenêtre de temps avec laquelle un potentiel d'action peut être émis par le neurone pyramidal va être augmentée créant ainsi une diminution de la fidélité temporelle. La feed-forward inhibition serait donc responsable, en court-circuitant l'EPSP, d'une amélioration de la fidélité temporelle mais dans une condition particulière où la probabilité du couplage EPSP-spike (probabilité qu'un EPSP reçu par le neurone induise l'émission d'un potentiel d'action) est de 0,5.

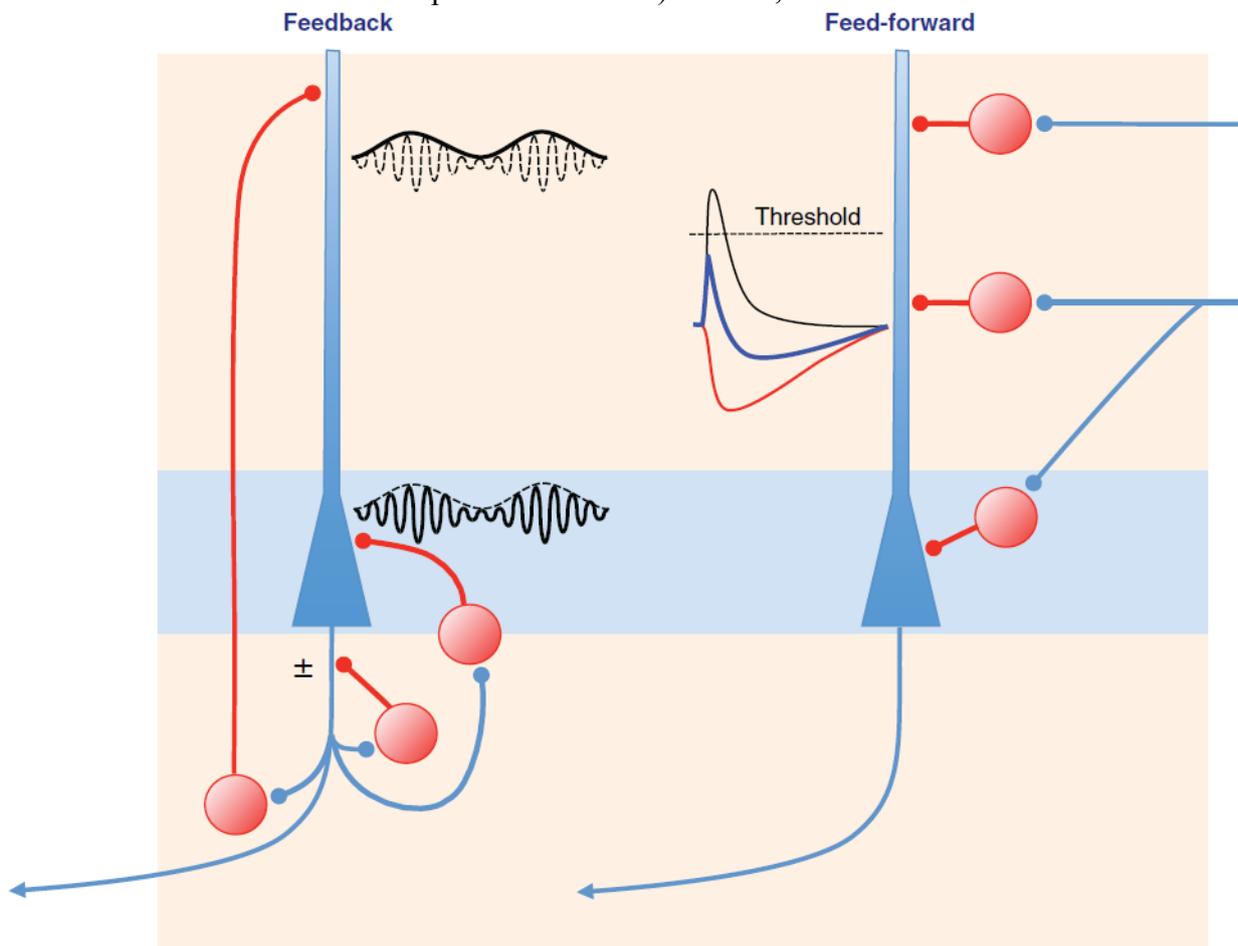


Figure I11. Illustration de la connectivité des neurones de l'hippocampe dans la feed-back et la feed-forward inhibition et leur possible rôle. La feed-back inhibition semble jouer un rôle important dans la genèse des rythmes thêta et gamma alors que la feed-forward inhibition semble être plus concernée par le contrôle dans la discrimination temporelle. D'après Kullmann, 2011.

3. Le système des endocannabinoïdes

3.1 Découverte, utilisation et identification du système cannabinoïde

L'utilisation et la consommation du cannabis par l'Homme remonte bien avant la naissance de Jésus Christ, notamment au nord de la Mésopotamie en Assyrie où le cannabis était consommé pour ses effets psychoactifs mais aussi pour ses propriétés médicinales. En Europe, le cannabis a été introduit par les troupes napoléoniennes de retour d'Égypte et par les médecins britanniques revenant d'Inde. En France, le cannabis et ses effets sur le comportement humain devinrent connus suite aux écrits de certains membres du Club des Hashischins fondé en 1844 par le docteur Jacques-Joseph Moreau, médecin psychiatre français qui décrivit précisément les effets psychotropes de la consommation de haschich dans son traité *Du hachisch et de l'aliénation mentale* (1845). Ces effets sur le comportement humain furent notamment décrits par d'autres personnalités de l'époque comme Théophile Gautier dans son ouvrage *Le Club des hachichins* (1846) ou encore par Charles Baudelaire dans son essai *Les Paradis artificiels* (1860). Dans la plupart des cas, il fut mentionné les propriétés relaxantes ou d'euphorie de la consommation du cannabis mais aussi des troubles de la mémoire.

Les chimistes du milieu du XIX^{ème} siècle explorèrent, par analogie avec d'autres phytocomposés psychoactifs identifiés comme la morphine ou la cocaïne, la piste d'un alcaloïde comme principe actif du cannabis. Ceci retarda pendant plus de 100 ans l'identification du principe actif puisqu'il faudra attendre 1964 et les travaux de Raphael Mechoulam (Gaoni & Mechoulam, 1964) pour s'apercevoir qu'il s'agissait finalement d'un terpénoïde, le Δ^9 -tétrahydrocannabinol (Δ^9 -THC). Le THC, appartenant au groupe des lipides bioactifs, était supposé agir indépendamment d'une liaison à un récepteur et donc avoir un mécanisme d'action comparable à celui des anesthésiques et solvants. Son caractère très liposoluble explique son passage rapide de la barrière hémato-encéphalique, et donc en partie son effet quasi immédiat lors de la consommation de cannabis. Or, la stéréospécificité de l'action du THC mise en évidence supposa l'hypothèse de l'existence d'un récepteur pouvant lier ce composé psychoactif notamment dans le cerveau. En 1990, le premier récepteur aux cannabinoïdes (CB1) fut cloné (Matsuda *et al.* 1990) dans le système nerveux central, permettant la recherche et l'identification de ligands endogènes, l'hypothèse étant que des agonistes endogènes des récepteurs CB1 analogues au THC puissent avoir des effets similaires à cette molécule d'origine végétale.

3.2 Les récepteurs aux cannabinoïdes : récepteur CB1 et CB2

Le récepteur CB1 est un récepteur appartenant à la famille des récepteurs à sept segments transmembranaire et fait partie des récepteurs les plus abondants du système nerveux central (SNC). Les plus fortes densités d'expression du récepteur CB1 dans le SNC se trouvent dans les ganglions de la base, la substance noire, le globus pallidus, le cervelet et l'hippocampe. Le récepteur CB1 est principalement exprimé au niveau des terminaisons axonales où il peut contrôler et moduler à plus ou moins long-terme la libération de neurotransmetteurs comme le glutamate ou le GABA (Freund et al., 2003). Il semble être également exprimé au niveau du corps cellulaire de certains types d'interneurones et de neurones pyramidaux (Bacci et al., 2004; Marinelli et al., 2009) mais aussi d'autres types cellulaires comme les astrocytes (Navarrete and Araque, 2008, 2010).

Au niveau intracellulaire, le récepteur CB1 est couplé à la protéine Gi/o sensible à la toxine pertussique. Son activation va principalement conduire à la fermeture de certains canaux calciques, l'ouverture de certains canaux potassiques, ainsi qu'à l'inhibition de l'adénylate cyclase, de la voie de l'AMP cycle (AMPc) et la protéine kinase A (PKA). Concernant l'effet sur les canaux calciques, une étude du groupe de Mackie a montré que l'application d'agonistes synthétiques du récepteur CB1 conduisait à l'inhibition des canaux calciques de type N et P/Q dans des cultures d'hippocampe de rat (Twitchell et al., 1997), bien qu'il semble que ce soit les canaux calciques de type N dans les tranches aiguës d'hippocampe (Wilson et al., 2001) qui soient responsables de la diminution transitoire de neurotransmetteur (voir DSI). Pour ce qui est de l'action du récepteur CB1 sur les canaux potassiques, il a été montré que les endocannabinoïdes pouvaient moduler les canaux potassiques de type A et D (Mu et al., 1999), en plus de l'activation des canaux à rectification entrante couplés aux protéines G (Guo et Ikeda, 2004) et être impliqués dans l'inhibition pré-synaptique de la libération de GABA dans le cervelet (Kreitzer et al., 2002). La voie de l'adénylate cyclase/AMPc/PKA sera aussi modulée négativement par l'activation du récepteur CB1, ce qui aura pour conséquence une inhibition à long terme de la libération de GABA dans l'hippocampe (Chevalleyre et al., 2007).

Il existe également un autre récepteur aux cannabinoïdes, le récepteur CB2, qui est plutôt exprimé dans les cellules du système immunitaire, mais aussi dans certains types cellulaires du SNC comme les cellules microgliales où l'activation du récepteur CB2 inhibe la production de cytokines (Stella, 2004, 2010). Dans une revue récente, il est fait mention que

ce type de récepteur activable par des lipides pourrait appartenir à un système de protection général pouvant moduler les réponses immunitaires comme l'inflammation (Pacher and Mechoulam, 2011).

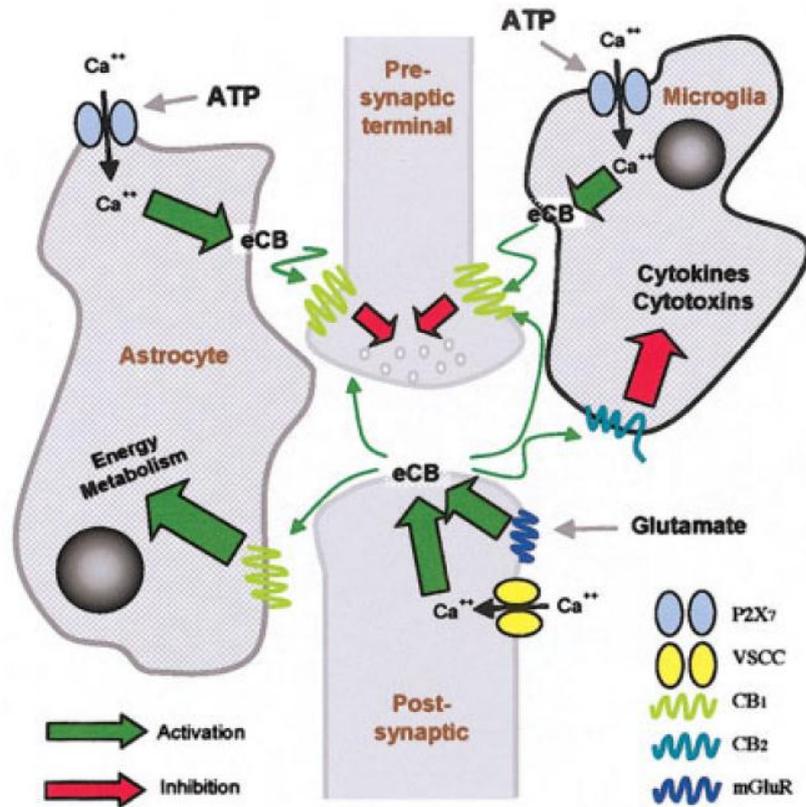


Figure I12. Modèle d'expression des récepteurs aux cannabinoïdes sur les cellules neuronales et non-neuronales. La production d'endocannabinoïde par un neurone post-synaptique peut activer des récepteurs CB1 et CB2 localisés au niveau pré-synaptique d'autres neurones mais aussi sur des cellules du compartiment glial comme les astrocytes ou encore des cellules microgliales (Stella, 2004).

3.3 Les cannabinoïdes endogènes

La découverte des récepteurs aux cannabinoïdes a suggéré l'idée que des molécules endogènes puissent activer et moduler ces récepteurs. Les premiers composés isolés dits « endocannabinoïdes » furent l'anandamide (du sanskrit « ananda » signifiant joie suprême) et le 2-arachidonoyl glycérol (2-AG). D'autres composés liant les récepteurs aux cannabinoïdes furent par la suite décrits mais les principaux agissant au niveau du SNC sont majoritairement l'anandamide et le 2-AG (Piomelli, 2003).

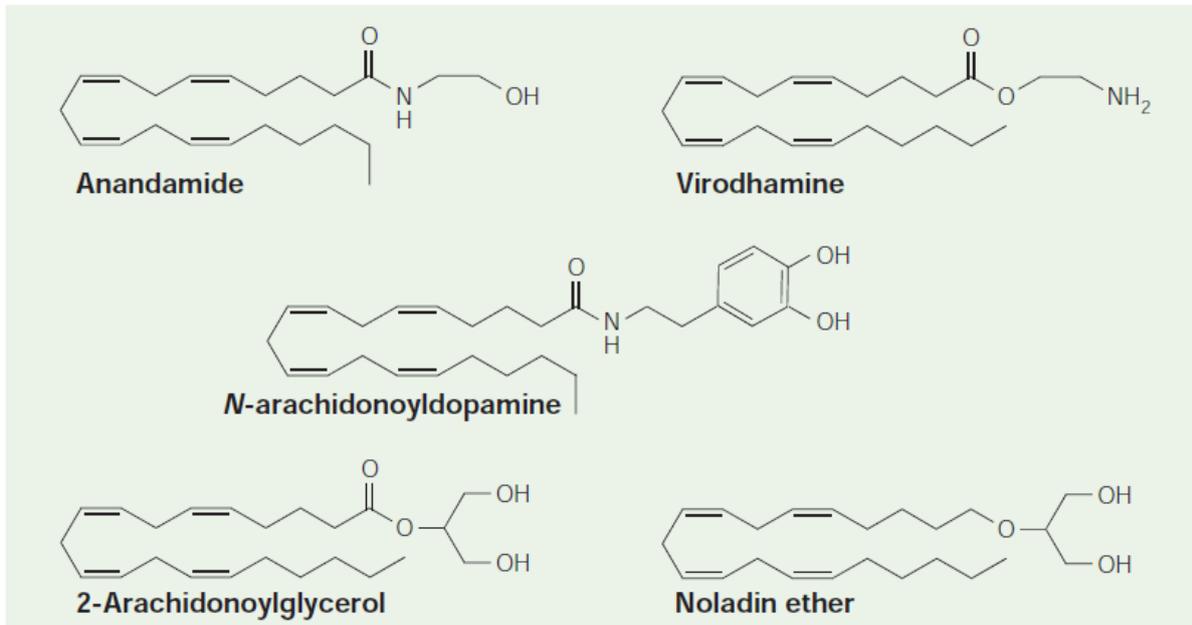


Figure I13. Structures chimiques des composés endogènes liant les récepteurs aux cannabinoïdes.

Contrairement aux neurotransmetteurs dits « classiques » comme le glutamate, le GABA ou bien encore la dopamine, les endocannabinoïdes ne sont pas stockés dans des vésicules mais plutôt synthétisés à la demande (Min et al., 2010) bien que cette idée soit remise en cause par la formation de réserve pré-formée d'endocannabinoïdes (Edwards et al., 2006; Alger and Kim, 2011). Les voies de biosynthèses de l'anandamide ou du 2-AG font respectivement intervenir comme précurseurs des lipides comme la phosphatidyl-ethanolamine ou le phosphatidyl-inositol. Leurs enzymes de biosynthèse sont principalement des lipases. Une fois libéré et après avoir agi en activant les récepteurs aux cannabinoïdes, les endocannabinoïdes sont capturés à l'aide de transporteurs membranaires puis dégradés par un système enzymatique distinct : l'anandamide et le 2-AG sont respectivement dégradés par la FAAH (Fatty Acid Amine Hydrolase) et la MGL (Mono-acyl Glycerol Lipase).

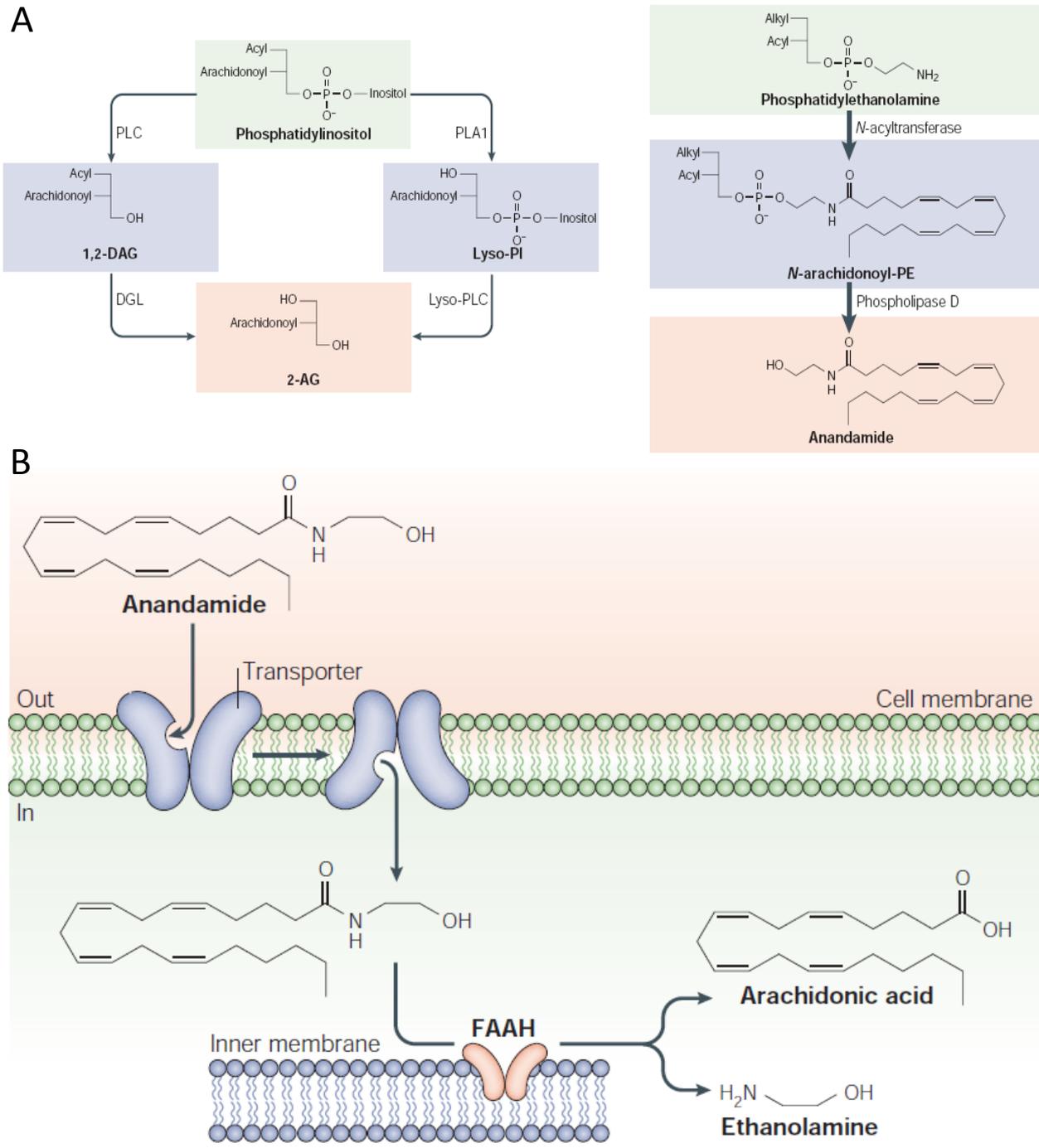


Figure I14. Voies de biosynthèse et de désactivation/dégradation des endocannabinoïdes. **A**, Le 2-AG (à gauche) est synthétisé à partir du phosphatidyl-inositol, alors que l’anandamide (à droite) est issu de la phosphatidyl-ethanolamine. **B**, les endocannabinoïdes sont ensuite internalisés par des transporteurs membranaires puis dégradés par des enzymes comme la FAAH (pour l’anandamide) ou la MGL (pour le 2-AG, non montré). D’après Piomelli, 2003.

3.4 Dépression à court-terme de la transmission synaptique inhibitrice : la DSI

Le phénomène de Depolarization-induced Suppression of Inhibition (DSI) a été observé la première fois dans le cervelet par le groupe de Alain Marty (Llano et al., 1991). Dans leur étude, les auteurs ont enregistré les courants post-synaptiques inhibiteurs spontanés (IPSCs) reçu par les cellules de Purkinje dans les tranches aiguës de cervelet. Suite à une dépolarisation brève (200ms) de la cellule de Purkinje qu'ils enregistraient, ils ont observé une réduction transitoire de ces IPSCs. Une observation similaire a été faite par la suite dans l'hippocampe par le groupe de Alger (Pitler and Alger, 1992). Dans cette étude portant sur les cellules pyramidales de la région CA1 de l'hippocampe (les mêmes cellules d'intérêt de notre étude), les auteurs ont montré cette réduction transitoire de ces événements spontanés inhibiteurs que ce soit en mode voltage-imposé (IPSCs) ou en mode courant imposé (IPSPs). Notons que par ces enregistrements en courant imposé, Pitler et Alger montrent une corrélation entre la durée du train de potentiels d'action et l'amplitude de la suppression des événements spontanés inhibiteurs. Le terme DSI apparaîtra ensuite dans leur publication suivante dans Neuron (Pitler and Alger, 1994). Ce phénomène de DSI sera par la suite observé dans plusieurs autres structures comme le cortex par le groupe de Levine (Fortin et al., 2004) ou encore dans le striatum par le groupe de Kano (Narushima et al., 2006).

Concernant le phénomène de DSI dans l'hippocampe, de nombreuses études ont montré que cette plasticité à court terme de l'inhibition n'était pas restreinte aux seules cellules pyramidales de la région CA1 mais à d'autres cellules hippocampiques comme les cellules pyramidales de CA3 (Morishita and Alger, 2000), les cellules granulaires du gyrus dentelé (Isokawa and Alger, 2005), voir certains interneurons comme ceux exprimant la cholécystokinine (Ali, 2007). Il a été également montré que ce phénomène de DSI était bloqué suite à l'application exogène de cadmium (Cd^{2+}) dans le milieu extracellulaire ou encore l'application intracellulaire d'un puissant chélateur du calcium (Ca^{2+}) comme le BAPTA (Pitler and Alger, 1994), suggérant un phénomène calcium-dépendant. De plus, le site d'expression de la DSI a été déterminé comme étant pré-synaptique puisque ni l'amplitude des IPSC miniatures (composante potentiel d'action-indépendante de l'activité spontanée) ni les courants évoqués à la suite de l'application de GABA n'ont montré une quelconque variation après des protocoles de dépolarisation post-synaptiques des cellules enregistrées (Pitler and Alger, 1994).

L'ensemble de ces résultats a fortement suggéré l'idée d'un mécanisme d'action rétrograde initié par l'action de messenger tel que peut l'être le glutamate. D'ailleurs le glutamate fut le premier candidat proposé par le groupe d'Alger car la DSI était atténuée par l'application d'antagonistes de récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluRI/II) comme le MCPG (Morishita et al. 1998). Mais en 2001, et notamment grâce à l'essor de la pharmacologie des endocannabinoïdes, le groupe de Roger Nicoll a suggéré que les endocannabinoïdes, en agissant comme messagers rétrogrades, seraient responsables du phénomène de DSI dans l'hippocampe (Wilson and Nicoll, 2001). Depuis, de nombreuses études au cours des années 2000 ont confirmé dans différentes régions du SNC, le rôle déterminant des endocannabinoïdes dans le phénomène de DSI, notamment grâce à l'utilisation de la pharmacologie des endocannabinoïdes à commencer par des antagonistes des récepteurs CB1 comme le SR141716A (ou rimonabant), l'AM251 ou encore l'AM281 (Kreitzer and Regehr, 2001; Ohno-Shosaku et al., 2002).

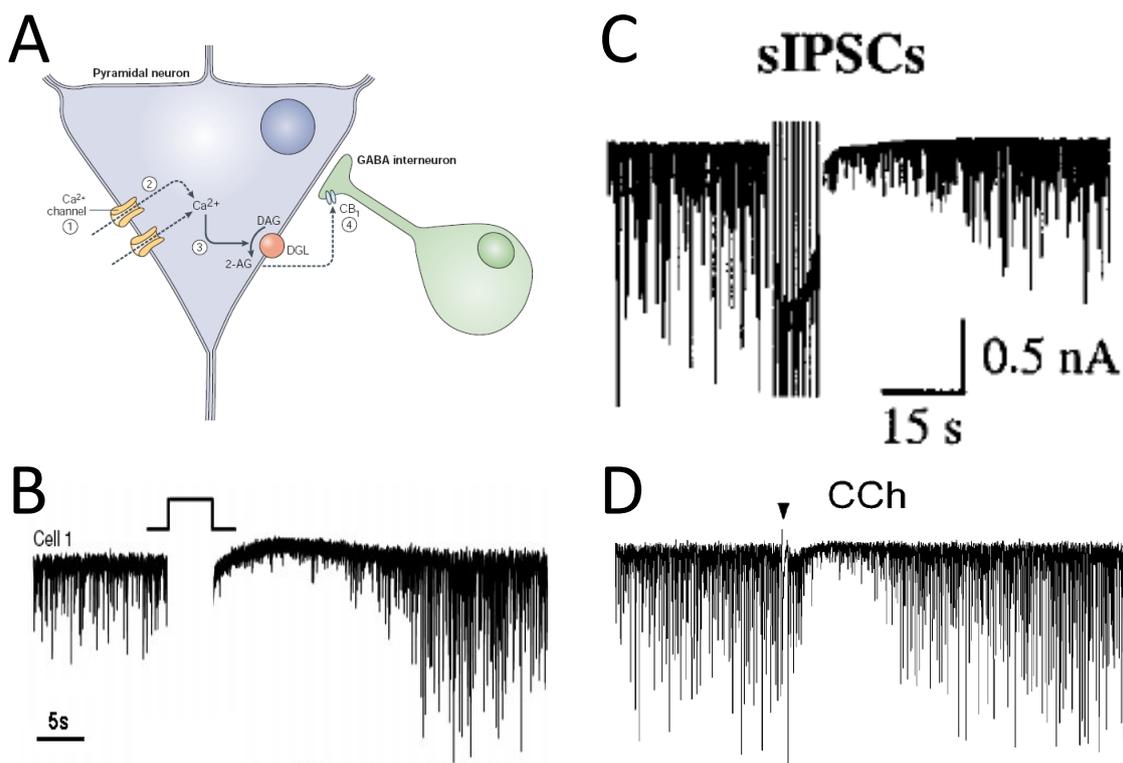


Figure I15. Phénomène de Depolarization-induced Suppression of Inhibition (DSI) dans différentes structures cérébrales et sur l'activité GABAergique spontanée. A, Schéma illustrant l'induction et l'expression de la DSI (modifié de Piomelli, 2003). B, DSI dans les neurones pyramidaux CA1 de l'hippocampe (Wilson and Nicoll, 2001). C, DSI dans les cellules de Purkinje du cervelet (Diana and Marty, 2003). D, DSI dans les neurones pyramidaux de la couche II/III du néocortex (Trettel et al., 2004). A noter que dans chaque exemple, la DSI est induite après une (B et D) ou plusieurs dépolarisations successives (C) du neurone enregistré.

3.5 Quel endocannabinoïde est responsable du phénomène de DSI dans l'hippocampe?

Cette question a été abordée au cours des années 2000 et a été sujet à beaucoup de résultats contradictoires jusqu'à ce que la génétique vienne arbitrer ce débat. En effet, les résultats mentionnés dans ces différentes études, portant pour les premières sur des études pharmacologiques, sont à l'origine de cette petite polémique concernant l'endocannabinoïde responsable des plasticités associées au système des endocannabinoïdes. Dans le système nerveux central, le 2-AG et l'anandamide sont considérés comme étant les deux principaux endocannabinoïdes qui ont une action au niveau des récepteurs CB1 centraux. Dans une première étude du groupe de Castillo, concernant le rôle des endocannabinoïdes dans la dépression à long-terme de l'inhibition (i-LTD)(Chevalyere and Castillo, 2003), les auteurs montrent qu'en bloquant la synthèse du 2-AG de façon pharmacologique par l'application dans le bain de 100µM de RHC-80267 (un inhibiteur de la diacylglycérol lipase, DGL), le phénomène de DSI n'est pas bloqué alors que l'induction de la i-LTD par stimulation à haute fréquence l'était, suggérant que le 2-AG était responsable de la i-LTD mais pas de son homologue à court-terme (DSI) au niveau des neurones CA1 de l'hippocampe de rat (Chevalyere and Castillo, 2003). Quelques années plus tard, le groupe de Freiman montra que dans le cervelet de souris, le 2-AG était responsable du phénomène de DSI car cette plasticité à court-terme était bloquée par l'application de différents inhibiteurs de la DGL que ce soit le RHC-80267 ou encore l'orlistat (ou tétrahydrolipstanine, THL). De plus, l'inhibition de l'enzyme de dégradation du 2-AG, la Monoacyl glycérol lipase (MGL), par l'application de ATMFK potentialise la DSI alors que l'inhibition de l'enzyme de dégradation de l'anandamide, la fatty acid amide hydrolase (FAAH), par l'application de l'URB597 n'a aucun effet sur l'amplitude et la durée de la DSI dans les neurones du cervelet (Szabo et al., 2006). Le groupe de Kano, qui a beaucoup travaillé sur la caractérisation de la DSI dans les cultures organotypiques d'hippocampe, a également montré que la MGL localisée au niveau pré-synaptique n'hydrolysait pas seulement le 2-AG libéré par les neurones post-synaptiques mais aussi contribuait à la dégradation de la production constitutive d'endocannabinoïde (ici de 2-AG), limitant ainsi l'accumulation d'endocannabinoïdes autour des terminaisons synaptiques (Hashimotodani et al., 2007). Dans une étude suivante, les mêmes auteurs montrèrent que la DSI dans l'hippocampe mais aussi la DSE dans le cervelet faisait intervenir le 2-AG. Dans cette même étude, les auteurs démontrent des effets non spécifiques du RHC-80267. En effet le RHC-80267, un des inhibiteurs de la DGL couramment utilisé, agirait plus

comme un antagoniste des récepteurs muscariniques que comme un réel bloqueur de la synthèse de 2-AG (Hashimotodani et al., 2008), ce qui est remis en doute dans l'étude de Chevaleyre et Castillo précédemment citée et leur non-blocage de la DSI par le RHC-80267. Le groupe de Doherty (Gao et al., 2010) et celui de Kano (Tanimura et al., 2010) confirmeront plus tard, grâce à des souris KO pour la DGL α/β , que le 2-AG est bien l'endocannabinoïde responsable de la DSI dans l'hippocampe et que l'enzyme responsable de sa synthèse est la DGL α plutôt que la DGL β . Cependant, une dernière étude du groupe de Mansvelder viendra relancer la controverse, car au niveau de connections unitaires inhibitrices, la DSI n'est pas bloquée par les différents bloqueurs de la DGL testés (OMDM-188, RHC-80267 et THL), suggérant que la DGL et le 2-AG ne sont pas impliqués dans la dépression à court-terme de l'inhibition alors qu'au contraire, la SSI (voir plus loin) était bloquée par ces inhibiteurs de la DGL (Min et al., 2010). Cependant dans cette même étude, les auteurs constateront que le THL appliqué extracellulairement bloque la DSI mais soutiendront que ce blocage apparent n'est pas la conséquence de l'inhibition de la DGL.

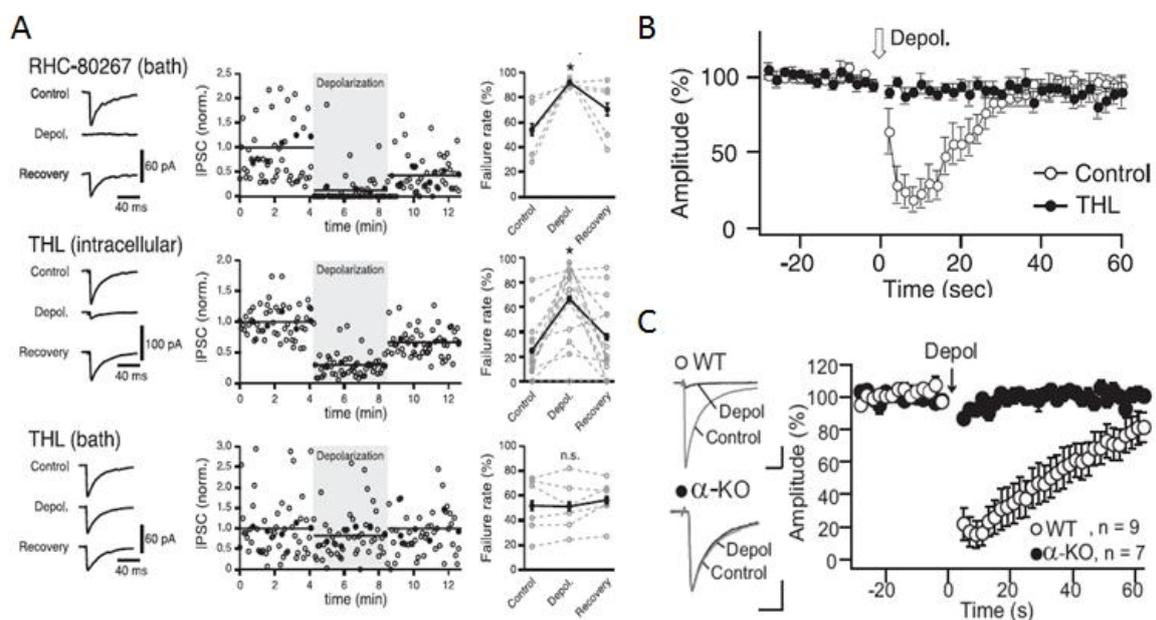


Figure I16. Controverse pharmacologique et évidence génétique de l'implication du 2-AG dans la DSI. **A**, L'application en intracellulaire d'inhibiteurs de la DGL (enzyme de biosynthèse du 2-AG) comme le RHC-80267 ou le THL ne bloque pas la DSI dans l'hippocampe de souris. Cependant, l'application en extracellulaire de THL bloque la DSI (Min et al., 2010). **B**, L'application en extracellulaire de THL bloque la DSI dans l'hippocampe de rat (Hashimotodani et al., 2007). **C**, La DSI est supprimé chez les souris KO pour la DGL α , l'enzyme de biosynthèse du 2-AG (Tanimura et al., 2010).

3.6 Dépression à court-terme de la transmission synaptique excitatrice : la DSE

Si les endocannabinoïdes sont responsables d'une baisse transitoire de la transmission synaptique inhibitrice (DSI) il en va de même pour la transmission synaptique excitatrice et ce dans plusieurs régions cérébrales comme le cervelet ou bien encore l'hippocampe. Une des premières études mettant en évidence le rôle des endocannabinoïdes dans la DSE (Depolarization-induced Suppression of Excitation) fut celle du groupe de Regehr quand les auteurs montrèrent que de brèves dépolarisations des cellules de Purkinje induisaient une diminution transitoire de la libération de glutamate des fibres parallèles et grimpantes (Kreitzer and Regehr, 2001). Dans l'hippocampe, la DSE est également observée. Elle partage les mêmes mécanismes d'induction et d'expression, mais est cependant beaucoup moins sensible que la DSI. En effet, alors qu'une dépolarisation de 5s induit une baisse transitoire de plus de 50% de la transmission synaptique inhibitrice dans les secondes suivant la dépolarisation, une dépolarisation de 10s est nécessaire pour avoir une baisse équivalente de la transmission excitatrice. Les afférences excitatrices dans les cultures d'hippocampe semblent être 30 fois moins sensibles aux endocannabinoïdes que les afférences inhibitrices (Ohno-Shosaku et al., 2002). De plus, une récente étude démontrera que les afférences excitatrices provenant de CA3 via les collatérales de Schaffer, sont plus sensibles à la DSE que leurs homologues provenant du cortex entorhinal par la voie perforante (Xu et al., 2010).

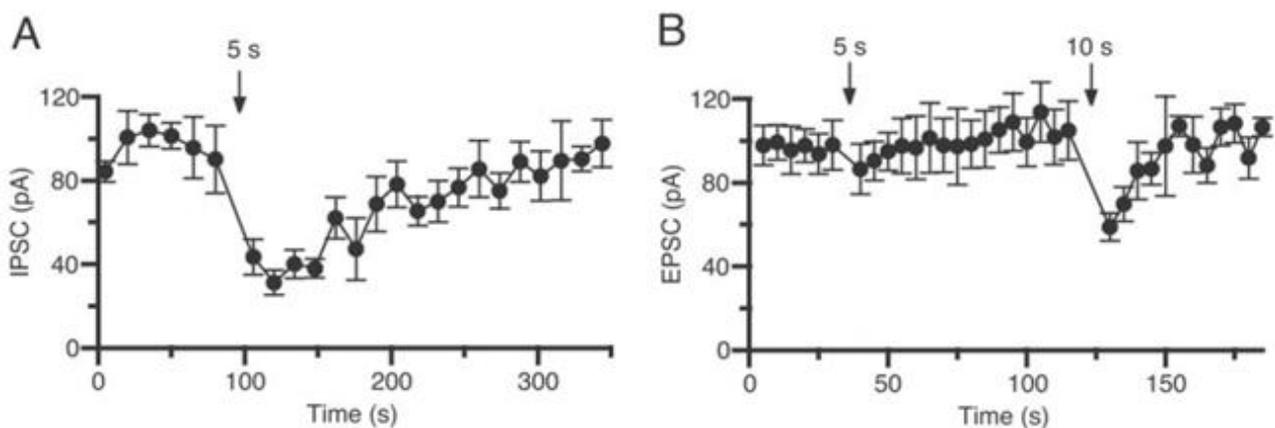


Figure I17. Comparaison entre la DSE et la DSI dans les neurones pyramidaux CA1 de l'hippocampe. A, Variation de l'amplitude des IPSCs avant et après une dépolarisation de 5s (DSI). B, Variation de l'amplitude des EPSCs avant et après une dépolarisation de 5s et 10s (DSE). Notons qu'il faut une dépolarisation 2 fois plus importante pour avoir une DSE d'amplitude comparable à celle d'une DSI. D'après Ohno-Shosaku et al., 2002.

3.7 Rôle du monoxyde d'azote (NO) dans la DSI

Le monoxyde d'azote (NO) fait partie des neurotransmetteurs dits « atypiques » du fait de son état chimique (gazeux) qui lui confère des propriétés de diffusion très rapide en traversant librement les membranes lipidiques ou encore les milieux hydrophobes. Le groupe de Hájos a montré dans une étude que le NO participait au phénomène de DSI dans les cellules pyramidales de l'hippocampe après activation des récepteurs muscariniques (Makara et al., 2007). Dans cette étude, les auteurs bloquent le phénomène de DSI suite à l'application de L-NAME, un inhibiteur de la NO synthase, l'enzyme de biosynthèse du NO. Par ailleurs l'application de L-arginine, un précurseur de la synthèse du NO, prolonge la DSI tandis que l'application d'un piègeur de NO, le CPTIO, bloque l'apparition de cette dépression à court-terme de l'inhibition reçue par les neurones pyramidaux de la région CA1 de l'hippocampe chez le rat. Cependant, le rôle crucial du NO suggéré par les auteurs n'est valable qu'en présence de carbachol, un agoniste des récepteurs muscariniques. Ceci est expliqué par le fait que le carbachol, en activant les récepteurs cholinergiques, augmenterait la production de NO tout comme la production d'endocannabinoïde (Ohno-Shosaku et al., 2003) expliquant le phénomène de DSI dans ces conditions expérimentales qui seraient censées reproduire les conditions *in vivo* où la concentration en acétylcholine est haute comme lors d'une exploration spatiale (Marrosu et al., 1995). Une autre série d'études du même laboratoire montrera quelques années après que la signalisation du NO est mobilisée suite à l'activation des récepteurs NMDA post-synaptiques au niveau des synapses inhibitrices de CA1 et CA3c (Szabadits et al., 2011), mais aussi que le NO est un messenger rétrograde au niveau des synapses excitatrices mais également inhibitrices dans l'hippocampe de la souris (Cserép et al., 2011).

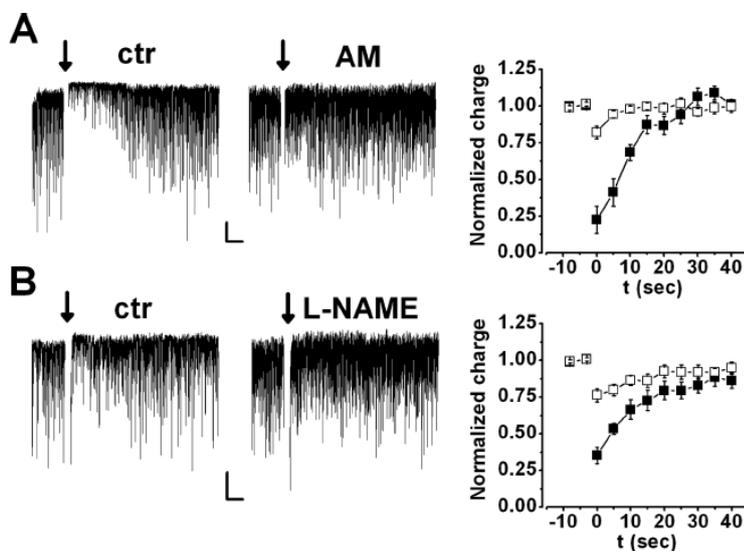


Figure I18. Le NO intervient dans la DSI. A, Activité d'une cellule pyramidale en condition contrôle (gauche), en présence d'AM251, antagoniste des CB1R (milieu) et quantification des variations d'activité GABAergique (droite). B, Enregistrements représentatifs de cellule pyramidale en condition contrôle (gauche), en présence de L-NAME, un inhibiteur de la NO Synthase (milieu) et quantification des variations d'activité GABAergique (droite) (Makara et al., 2007).

3.8 Dépression à long-terme de la transmission synaptique inhibitrice : la i-LTD

Après avoir mis en évidence le rôle des endocannabinoïdes dans le phénomène de DSI, d'autres chercheurs ont démontré que ces mêmes endocannabinoïdes étaient à l'origine d'une plasticité à long-terme de l'activité GABAergique reçue par les neurones pyramidaux de la région CA1 de l'hippocampe (Chevalyere and Castillo, 2003, 2004). Dans leur premier papier en 2003, les auteurs montrent qu'il s'agit d'une LTD hétéro-synaptique des synapses GABAergiques car c'est à la suite de l'activation des collatérales de Schaffer (par HFS ou TBS) que le glutamate libéré via l'activation de récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluR1/5) va initier une production de 2-AG (un des deux endocannabinoïdes principaux avec l'anandamide dans le SNC) au niveau des dendrites apicales des neurones pyramidaux de la région CA1 de l'hippocampe. Ceci aura pour conséquence d'activer les récepteurs CB1 présents sur les afférences inhibitrices dans un voisinage beaucoup plus localisé que celui de la DSI. Dans l'article de 2004, les auteurs vont plus loin dans le rôle physiologique de cette plasticité à long-terme contrôlée par les endocannabinoïdes puisqu'ils montrent que cette i-LTD (qui peut être induite par une fréquence d'activation de 10Hz des collatérales de Schaffer et donc ne pas induire de plasticité des afférences excitatrices) va être à l'origine d'une facilitation de la LTP de ces mêmes collatérales de Schaffer (induit par TBS) et dans une sphère beaucoup plus localisée ($<10\mu\text{m}$) que la i-LTD elle-même (environ $20\mu\text{m}$). Quelques années plus tard, les mêmes auteurs dissèqueront les voies intracellulaires impliquées dans ce phénomène de i-LTD et montreront le rôle important de l'AMPC, de la PKA et du complexe protéique RIM1 α (Chevalyere et al., 2007).

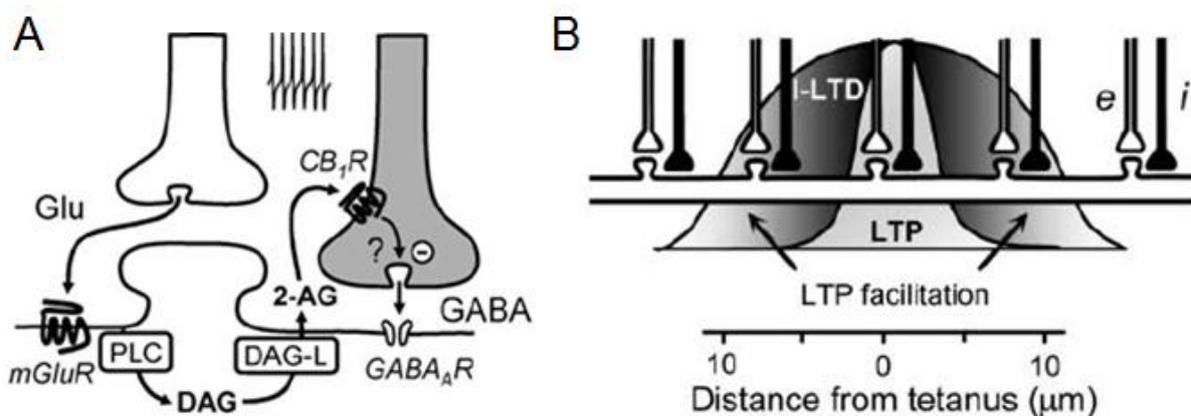
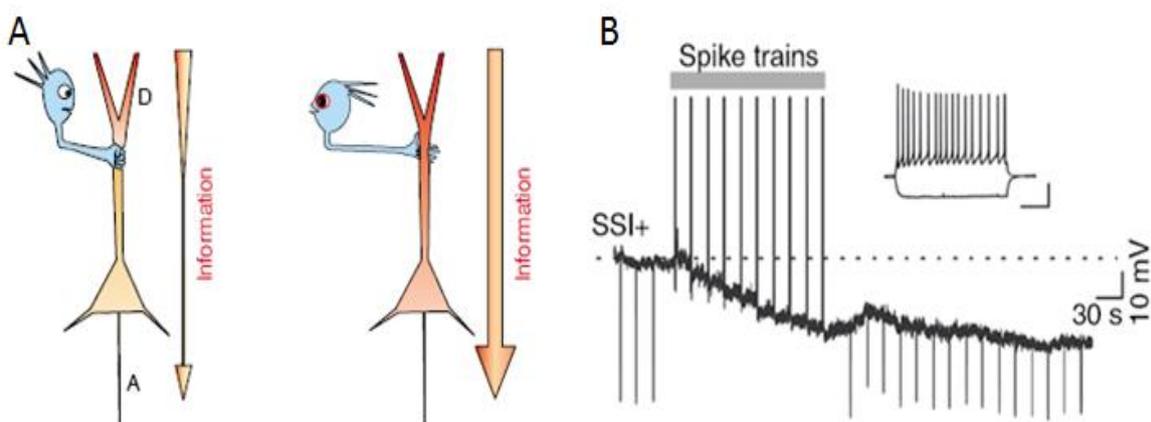


Figure I19. Induction et expression de la i-LTD. A, Schéma de la plasticité hétéro-synaptique induite par les endocannabinoïdes. B, Sphère d'action de la i-LTD par rapport à celle de la LTP (Chevalyere and Castillo, 2003).

3.9 Plasticité intrinsèque des neurones corticaux : la SSI

En 2004, les endocannabinoïdes voient encore leur rôle modulateur de l'excitabilité neuronale prendre de l'ampleur car ils sont également à l'origine du contrôle du potentiel de membrane par un effet autocrine via l'activation de récepteurs CB1 exprimés à la surface des neurones qui les ont produits. Ce phénomène d'auto-inhibition fut mis en évidence en 2004 dans une étude du groupe de David Prince (Bacci et al., 2004) où les auteurs montrèrent qu'après une série de 10 trains de 60 potentiels d'action à une fréquence de 50Hz, une classe d'interneurones corticaux (les LTS, Low Threshold Spiking et non les FS, Fast Spiking) dans la couche 5 du cortex somato-sensoriel de rat voyaient leur potentiel de membrane s'hyperpolariser de quelques millivolts (8-10mV). Cette hyperpolarisation à long-terme (>30min) appelée SSI (Slow Self-Inhibition), est bloquée par l'application d'un antagoniste des récepteurs CB1, l'AM251. La substitution des ions calcium extracellulaires par le cadmium (Cd^{2+}) ou la dialyse intracellulaire de BAPTA, un puissant chélateur du Ca^{2+} , montrent l'implication de l'augmentation intracellulaire du calcium dans l'initiation de ce phénomène autocrine initié par les endocannabinoïdes (Bacci et al., 2005). Quelques années après, Alberto Bacci continuera à disséquer ce phénomène et montrera le rôle prépondérant du 2-AG comme l'endocannabinoïde responsable du phénomène de SSI dans ces interneurones LTS du néocortex (Marinelli et al., 2008). Dans une étude suivante, Alberto Bacci et son équipe montreront que ce phénomène de SSI n'est pas restreint aux interneurones LTS puisqu'il peut



être observé dans 30% des cellules pyramidales de la couche 2/3 du néocortex (Marinelli et al., 2009). Bien que les propriétés de décharge neuronale soient semblables (décours temporel du PA, adaptation...) les cellules pyramidales exprimant la SSI (SSI+) présentent cependant une morphologie différentes des cellules pyramidales n'exprimant pas la SSI (SSI-). En effet, les neurones pyramidaux SSI+ présentent une arborisation apicale plus étendue et moins ramifiée. De plus, dans ces cellules SSI+, les autres formes de plasticités que nous avons décrites plus haut (DSI, i-LTD) sont très majoritairement exprimées.

3.10 Plasticité du compartiment glial

Les endocannabinoïdes interagissent aussi avec d'autres types cellulaires que les différents types de neurones. Le groupe d'Alfonso Araque a montré que les endocannabinoïdes pouvaient être à l'origine d'une communication entre neurones voisins en passant par l'intermédiaire du compartiment glial, et plus précisément par les astrocytes (Navarrete and Araque, 2008). En effet, une production d'endocannabinoïdes par les neurones pyramidaux de la région CA1 de l'hippocampe mène à une activation de récepteurs CB1 astrocytaires. Cette activation des récepteurs CB1 astrocytaires va conduire en une cascade de signalisations qui sera responsable d'une élévation du calcium intracellulaire dans l'astrocyte et par conséquent d'une libération de glutamate par l'astrocyte. Dans leur étude de 2008, les auteurs montrent que ce glutamate sera à l'origine de courants excitateurs de type NMDA dans les neurones voisins, suggérant donc un potentiel rôle des astrocytes dans la communication inter-neuronale et dans des processus de synchronisation de populations neuronales dans l'hippocampe.

Dans une seconde étude, les mêmes auteurs iront plus loin dans la description et l'intérêt du rôle des endocannabinoïdes et des astrocytes dans les phénomènes de plasticité neuronale (Navarrete and Araque, 2010). Tandis que les endocannabinoïdes induisent des dépressions synaptiques, notamment par l'activation des récepteurs CB1 neuronaux pré-synaptiques, ils potentialisent également indirectement la transmission synaptique entre les collatérales de Schaffer (provenant des neurones CA3) et les neurones pyramidaux de CA1. En effet, les endocannabinoïdes produits par une cellule pyramidale vont activer les récepteurs CB1 astrocytaires, ayant pour conséquence une libération de glutamate par l'astrocyte et une activation des récepteurs métabotropiques du glutamate localisés au niveau des terminaisons axonales des collatérales de Schaffer. Cette communication via les

endocannabinoïdes et les astrocytes sera donc à l'origine d'une potentialisation de la transmission dans le circuit tri-synaptique de l'hippocampe.

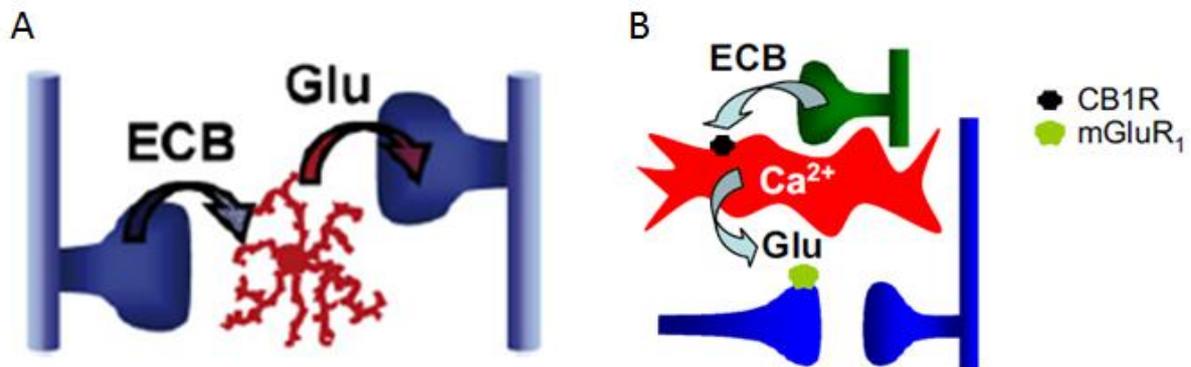


Figure I21. Rôle des endocannabinoïdes dans la communication neurone-astrocyte. **A**, Les endocannabinoïdes libérés par un neurone pyramidal va activer les récepteurs CB1 astrocytaires, élever le Ca^{2+} intracellulaire, et stimuler la libération de glutamate qui va se fixer sur les récepteurs NMDA des neurones pyramidaux voisins (Navarrete and Araque, 2008). **B**, Les endocannabinoïdes libérés par un neurone pyramidal va activer les récepteurs CB1 astrocytaires, élever le Ca^{2+} intracellulaire, et stimuler la libération de glutamate qui va augmenter la libération de neurotransmetteur par activation de mGluR pré-synaptique dans les synapses voisines (Navarrete and Araque, 2010).

4. Fidélité temporelle de la décharge neuronale

Les conductances voltage-dépendantes ne sont pas simplement impliqués dans la genèse des PA et la régulation de fréquence mais participent aussi à l'intégration des messages sensoriels (voir par exemple le rôle de INa sur l'amplification des PPSEs, Stuart and Sakmann, 1995). En conséquence, la précision avec laquelle un EPSP peut donner lieu à un potentiel d'action va dépendre de la présence de certaines conductances voltage-dépendantes, et peut rendre compte d'importantes différences de couplage Entrée/Sortie. Dans une étude du groupe de Miles, les auteurs ont montré que les conductances potassiques occasionnant des courants sortants dans les interneurones donnaient lieu à une précision temporelle bien meilleure que dans les cellules pyramidales où ces mêmes conductances avaient beaucoup moins d'influence dans le contrôle de l'amplification de l'EPSP responsable de l'occurrence d'un potentiel d'action (Fricker and Miles, 2000). D'autres études récentes ont également montré que le courant potassique I_D (Cudmore et al., 2010), ou encore le courant I_H activé par l'hyperpolarisation (Gastreïn et al., 2011), pouvaient jouer un rôle important dans la modulation de la fidélité temporelle du couplage EPSP-Spike. En jouant sur la vitesse de dépolarisation du potentiel de membrane, ces différentes conductances modulent la précision

temporelle en définissant la fenêtre de temps où le PA peut être émis. La compréhension du rôle respectif des conductances voltage-dépendantes dans la régulation de la décharge neuronale s'appuie sur la pharmacologie plus ou moins spécifique de ces canaux. Les interprétations faites alors par les différents auteurs s'appuient sur des données obtenues à partir de modèles numériques. Etant donné qu'*in vitro* même dans les systèmes les plus simples, la précision de la décharge n'est jamais parfaite pour un neurone donné, cela reflète le fait qu'il existe une composante stochastique non négligeable en ce qui concerne les paramètres biophysiques qui caractérisent les différents canaux ioniques.

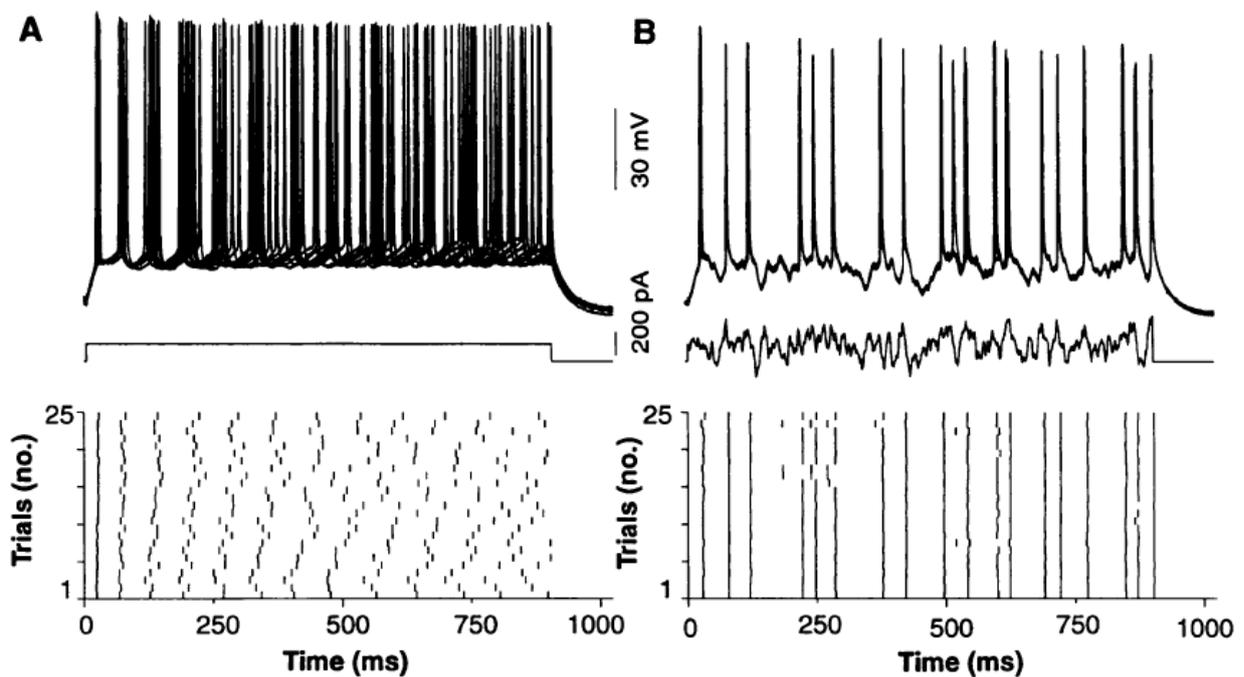


Figure I22. Reproductibilité d'un patron de décharge d'un neurone cortical après différents types de stimulation. A, Superposition de plusieurs décharges de potentiels d'action d'un neurone cortical suite à l'application d'un créneau de courant dépolarisant constant. B, Superposition de plusieurs décharges de potentiels d'action d'un neurone cortical suite à l'application d'une séquence de courant bruité et fluctuant (Mainen and Sejnowski, 1995).

Cependant, *in vivo*, les neurones corticaux, bombardés en permanence par une activité spontanée tonique, reçoivent un bruit électronique généralement considéré comme prenant l'ascendant sur celui des canaux voltage-dépendants (Destexhe et al., 2003). Les conséquences de cette source de bruit furent décrites en 1995 (Mainen and Sejnowski, 1995). Dans cet article, les auteurs montrèrent que la précision de la décharge d'un neurone en réponse à un échelon dépolarisant constant était moins bonne que si celui-ci était bruité. En

effet, dans ces conditions ou le bruit était reproduit à l'identique d'une stimulation à l'autre, le temps d'occurrence de chaque PA intervenait dans un intervalle de temps beaucoup plus précis (**Fig. I22**).

Le groupe de Miles a montré également dans une étude que la précision temporelle des potentiels d'actions, émis par un neurone pyramidal dans la région CA1 de l'hippocampe, initié par un stimulus comme un bruit blanc dépendait également de l'amplitude de ce dernier (Axmacher and Miles, 2004). En effet une haute variance du stimulus donnait lieu à une forte précision temporelle au cours de la décharge neuronale, tandis qu'une variance moins importante du stimulus induisait une reproductibilité du signal beaucoup moins bonne (**Fig. I23**).

La conclusion est que des fluctuations de courant membranaire provenant de l'intégration de l'activité tonique synaptique, même en ayant un profil purement aléatoire peuvent organiser la décharge neuronale d'une manière très précise. Comme dit plus haut, les canaux ioniques définissent le profil de décharge des neurones. Si la finalité est de comprendre comment s'articulent ces différents profils de décharge au sein des réseaux neuronaux, il est nécessaire de comparer les caractéristiques de décharge de différents types neuronaux qui constituent chaque réseau. Les travaux du groupe de Wilson (Bennett et al., 2000) ont mis en évidence que dans les interneurons cholinergiques du striatum, le CV

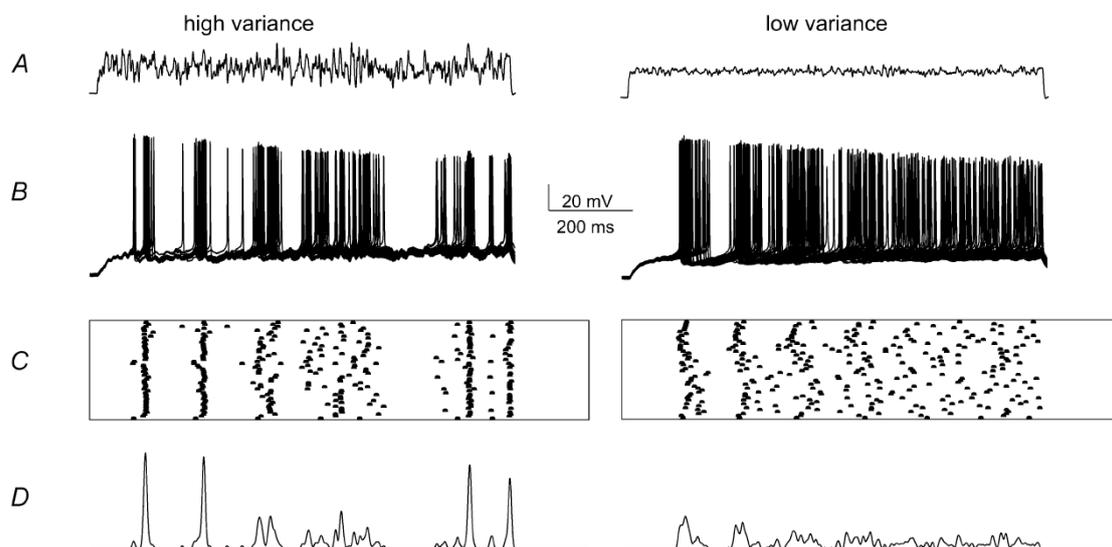


Figure I23. Précision temporelle de la décharge avec différentes variances de bruit. **A**, Signal excitateur appliqué au neurone avec une variance haute (à gauche) ou faible (à droite). **B**, Superposition des décharges neuronales du neurone en réponse au bruit excitateur à haute et faible variance. **C**, Raster Plots des différents essais indiquant la fidélité temporelle au cours de la décharge neuronale de la cellule pyramidale. **D**, Diagramme de probabilité de l'occurrence d'un potentiel d'action au cours de la décharge neuronale en réponse au bruit à haute et faible variance. (Axmacher and Miles, 2004).

(déviation standard / moyenne) de la période séparant chaque PA diminuait avec la fréquence. Par conséquent dans ces neurones, la précision est d'autant meilleure que la fréquence augmente. Les cellules pyramidales du néocortex obéissent également à cette règle (Caillard, 2011). De ces études il apparaît que les caractéristiques morphologiques et électrophysiologiques des neurones sont à prendre en compte pour évaluer la fidélité de leur décharge. Chez certains interneurons « fast spiking » (FS) par exemple, la présence d'autapses GABAergiques améliorent la fidélité de leur décharge (Bacci and Huguenard, 2006) car en hyperpolarisant le potentiel de membrane après l'émission d'un PA, les événements autaptiques augmenteraient l'excitabilité (probabilité de décharge) par une possible réduction de l'inactivation des canaux sodium.

5. Questions & Objectifs de la thèse

Au cours de la présente étude, nous avons tenté de répondre à différentes questions dans le but de comprendre par une approche expérimentale *in vitro*, quels pourraient être les mécanismes responsables du codage de l'information dans les processus de mémorisation et d'apprentissage.

Nous avons donc, après avoir caractérisé le phénomène de DSI dans nos conditions expérimentales, voulu savoir si l'activité des cellules de lieu, enregistrée lors de tests comportementaux, était capable d'induire une plasticité telle que la DSI qui avait été jusqu'alors démontré et observé uniquement *in vitro* et sans réelle signification fonctionnelle *in vivo* (Hampson et al., 2003).

Nous avons étudié ensuite le rôle que pouvait avoir la DSI dans la modulation de la précision temporelle de la décharge que l'on sait être perturbée par l'activité spontanée GABAergique dans les neurones de la couche II/III du néocortex (Caillard, 2011).

Pour finir, nous avons voulu comparer l'impact que pouvait avoir l'activité spontanée GABAergique d'une part, et l'activité inhibitrice antérograde (ou feed-forward inhibition) d'autre part, connue pour améliorer la précision temporelle de la décharge (Pouille and Scanziani, 2001), sur le couplage entrée/sortie des neurones pyramidaux de la région CA1 de l'hippocampe.

MATERIELS ET METHODES

1. Préparation des tranches de cerveau

Des rats Wistar (P14-P20) ont été sacrifiés après avoir été anesthésiés par une injection intra-péritonéale d'hydrate de chloral (400mg/kg). Après décapitation de l'animal, le cerveau a été rapidement prélevé puis arrosé constamment d'une solution de coupe (95% O₂, 5% CO₂) sans sodium composé de (en mM) : 280 sucrose, 26 NaHCO₃, 10 D-glucose, 1.3 KCl, 10 MgCl₂, 1 CaCl₂ et 1 kynurénate (bloquant des récepteurs ionotropiques au glutamate). Le cerveau a été sectionné en tranches coronales de 350µm d'épaisseur à l'aide d'un vibratome (*Leica VT 1000S*) dans des régions comprenant le cortex somato-sensoriel, le cortex visuel ou la région CA1 de l'hippocampe. Les tranches ont été ensuite placées pendant 1 heure dans une

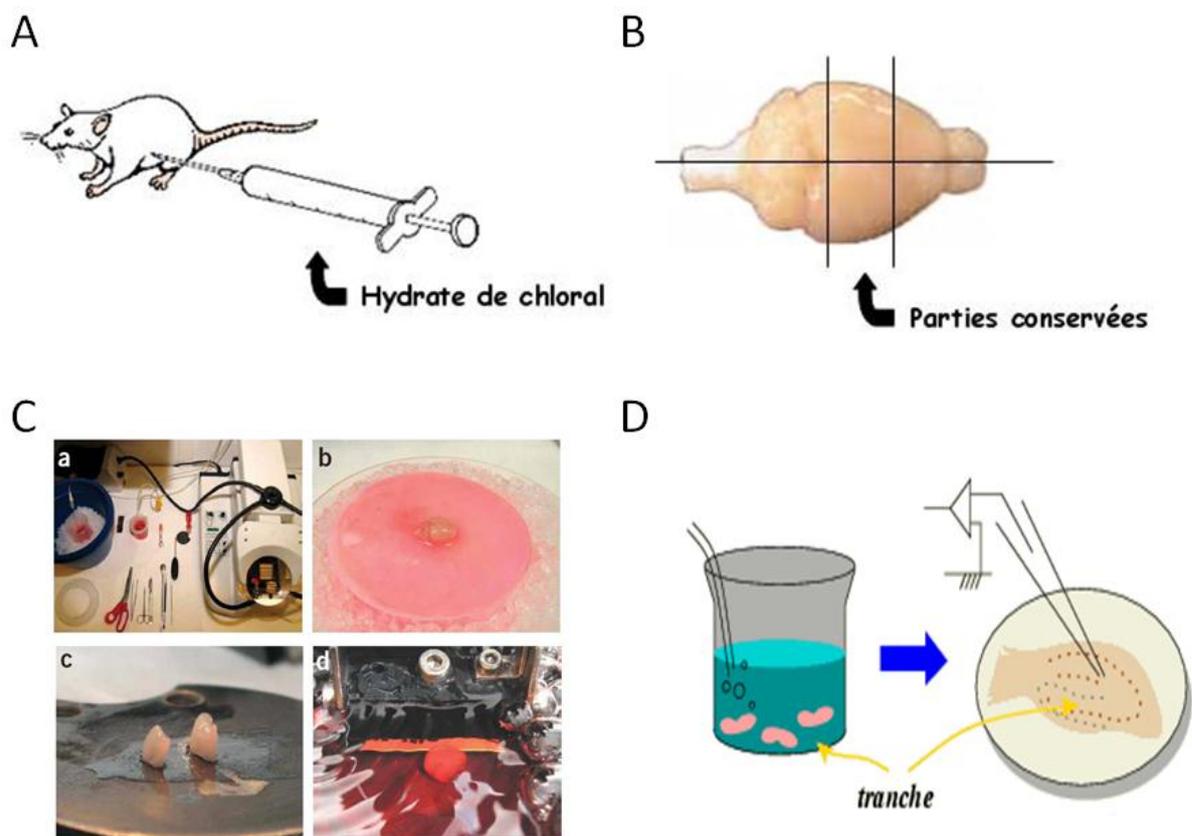


Figure M1. Dissection et préparation des tranches coronales. **A**, Anesthésie d'un rat Wistar (P15-P19) par injection intra-péritonéale d'hydrate de chloral (400mg/kg). **B**, Vue dorsale d'un cerveau de rat après dissection et parties conservées contenant les hippocampes bi-latéraux. **C**, (a) Vue générale du poste de dissection. (b) Vue du cerveau de rat après dissection. (c) Vue de 2 pièces d'hippocampe collées sur une plateforme avant transfert dans la chambre de coupe du vibratome. (d) Vue d'un hémisphère de cerveau de rat durant la coupe au vibratome (Debanne et al., 2008). **D**, Schéma illustrant la chambre où sont conservées les tranches coronales de 350µm d'épaisseur avant enregistrement.

solution oxygénée (95% O₂, 5% CO₂) de liquide céphalo-rachidien artificiel (ACSF) contenant (en mM) : 125 NaCl, 26 NaHCO₃, 1 NaH₂PO₄, 2,5 KCl, 3 CaCl₂, 2 MgCl₂, 10 D-glucose et enrichi en sérum de veau fœtal (SVF 4%). Après ce délai, les tranches ont été conservées dans une chambre contenant la solution ACSF sans SVF avant d'être placées dans la chambre d'enregistrement (**Fig. M1**).

2. Enregistrements électrophysiologiques

Les enregistrements électrophysiologiques ont été réalisés dans une chambre thermostatée à 34°C, sous l'objectif 60X d'un microscope droit à contraste de phase (Olympus BX 51W1, DIC), perfusée par de l'ACSF oxygéné pendant toute la durée des enregistrements et en présence de kynurénate (2 mM) pour bloquer l'activité glutamatergique excitatrice. La tranche coronale a été immergée et maintenue au fond de la chambre à l'aide d'un treillis de nylon sur un support en « U » de platine. Les cellules pyramidales de la région CA1 de l'hippocampe ont été identifiées par vidéomicroscopie infrarouge selon leur localisation, la forme caractéristique de leur corps cellulaire et l'orientation de leur dendrite apicale.

Les pipettes de patch, avec une résistance variant entre 4-8MΩ, ont été élaborées avec une étireuse verticale (Narishige, model PB-7) puis remplies avec des solutions de patch différentes selon les protocoles expérimentaux, contenant (en mM) soit: 140 KCl ; 5 HEPES ; 2 EGTA ; 2 MgCl₂ ; 2 Na₂ATP ; 0.3 NaGTP pour la solution « KCl », sinon : 140 KGluconate ; 2 EGTA ; 10 HEPES ; 2 MgCl₂ ; 2 Na₂ATP ; 0.3 NaGTP ; 10 Phosphocréatine pour la solution « Low Cl ». Avec la solution KCl, le potentiel d'inversion du GABA (E_{GABA}) calculé après une éjection locale d'isoguvacine (0.5mM, agoniste GABA_A) à différents potentiels de membrane était de 3.7±2.9mV (n=4). Avec la solution Low Cl, le potentiel d'inversion du GABA (E_{GABA}) calculé était de -73.7±1.7mV (n=9) (**Fig. M2**).

Les signaux analogiques codant pour les variations de courant et de potentiel au cours du temps ont été émis via l'amplificateur MultiClamp 700B (Axon Instruments). Lors de chaque protocole expérimental, une fois la configuration cellule entière obtenue, la qualité de l'enregistrement a été estimée au début de l'enregistrement grâce à la mesure des résistances en série (R_s) ainsi que des propriétés passives du neurone comme la capacitance (C_m) et la résistance membranaire (R_m). L'enregistrement était interrompu si : la résistance membranaire était inférieure à 50MΩ; les résistances en série étaient supérieures à 40MΩ ; ou si ces paramètres variaient de plus de 10% au cours de l'expérience. Les

enregistrements électrophysiologiques ont été réalisés en mode voltage-imposé ou en courant-imposé selon les besoins pour analyser l'activité spontanée GABAergique et/ou le comportement de décharge des neurones pyramidaux.

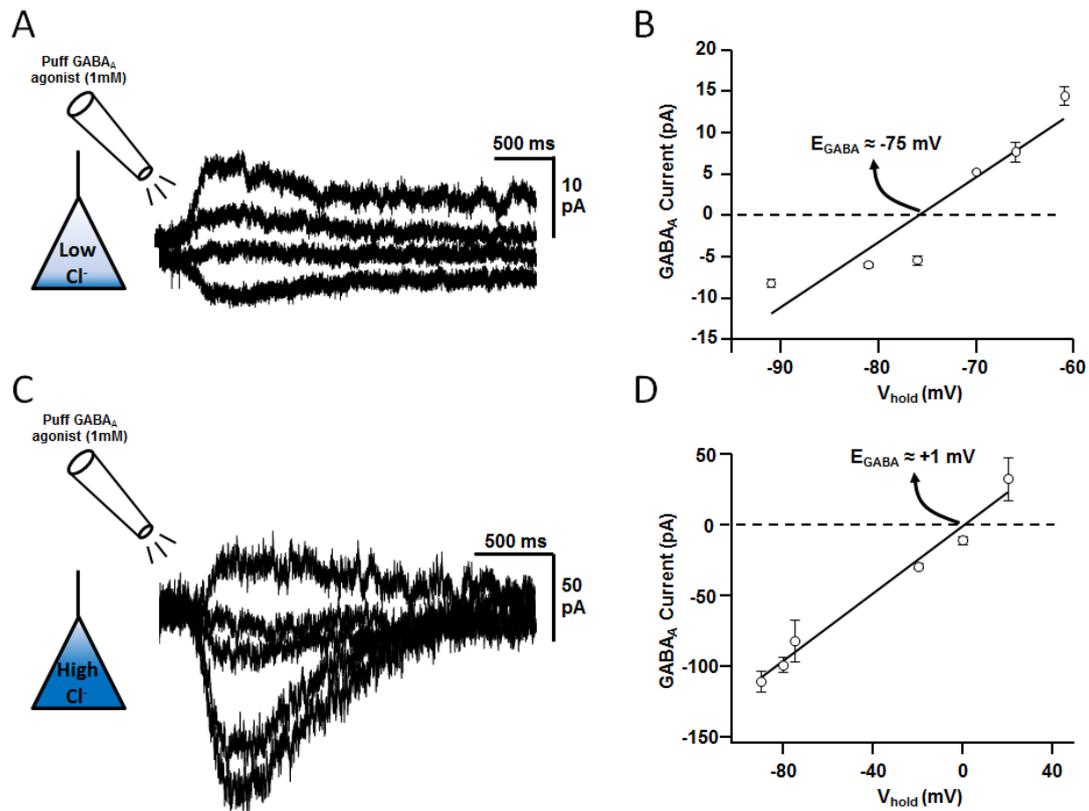


Figure M2. Potentiel d'inversion des réponses GABAergiques. **A**, Superposition de courants GABA_A en réponse à une brève éjection (20ms) d'isoguvacine, à différents niveaux de potentiel de membrane, et enregistrés en mode voltage-imposé en présence de la solution intracellulaire Low Cl⁻. **B**, Analyse des courants GABA_A générés après éjection de l'isoguvacine à différents potentiels de membrane avec la solution intracellulaire Low Cl⁻. **C** et **D**, Même chose qu'en A et B mais avec la solution KCl riche en ions chlorures.

3. Pharmacologie

Lors de différentes expériences, certaines drogues ont été appliquées en plus du kynurénate, comme la picrotoxine (PTX, 100μM) bloquant les récepteurs ionotropiques de type GABA_A, le WIN55,212-2 (WIN, 5μM) ou l'AM251 (5μM) qui sont respectivement l'agoniste et l'antagoniste des récepteurs aux endocannabinoïdes de type 1 (CB1). Il a été aussi appliqué aussi bien en intracellulaire qu'en extracellulaire de la tétrahydrolipstatine (THL, 1μM intra ou 10μM extra), un inhibiteur de l'enzyme de biosynthèse du 2-AG, la diacylglycérol lipase (DGL). La plupart des drogues ont été dissoutes dans le DMSO, notamment au cours des expériences utilisant l'AM251 ou le THL pour bloquer le phénomène

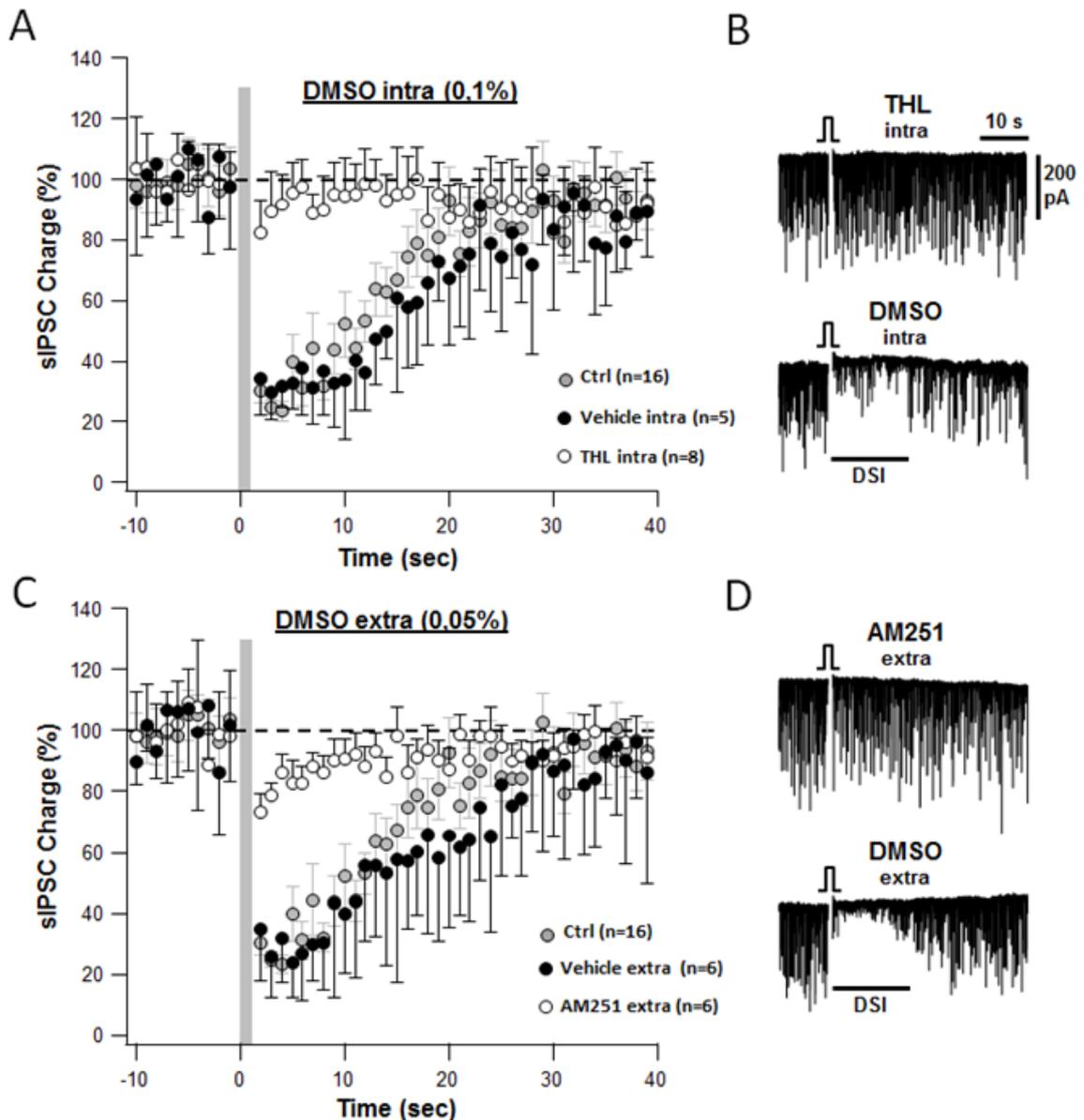


Fig. M3. Le DMSO n'affecte pas l'induction de la DSI. **A**, Analyse de la variation de charge des évènements spontanés inhibiteurs suite à une dépolarisation en mode voltage imposé (pulse à 0mV pendant 1s) en condition contrôle sans DMSO intracellulaire (gris), avec du DMSO à 0,1% en intracellulaire (noir), et en présence de THL, inhibiteur de la DGL, dissout dans du DMSO à 0,1% en intracellulaire (blanc). **B**, Enregistrements électrophysiologiques en mode voltage montrant les variations de courants post-synaptiques inhibiteurs spontanés (sIPSCs) suite à une dépolarisation neuronale (pulse à 0mV pendant 1s) en présence de THL+DMSO intracellulaire (haut) ou en présence de DMSO intracellulaire seul (bas). **C**, Analyse de la variation de charge des évènements spontanés GABAergiques suite à une dépolarisation en mode voltage imposé (pulse à 0mV pendant 1s) en condition contrôle sans DMSO extracellulaire (gris), avec du DMSO à 0,05% en intracellulaire (noir), et en présence d'AM251, antagoniste des récepteurs CB1, dissout dans du DMSO à 0,5% en extracellulaire (blanc). **D**, Enregistrements électrophysiologiques en mode voltage montrant les variations de courants post-synaptiques inhibiteurs spontanés (sIPSCs) suite à une dépolarisation neuronale (pulse à 0mV pendant 1s) en présence d'AM251+DMSO extracellulaire (haut) ou en présence de DMSO extracellulaire seul (bas).

de DSI. Les concentrations finales de DMSO furent de 0,05% et 0,1% respectivement dans les solutions extracellulaire et intracellulaire. A ces concentrations, la DSI n'apparaît pas être affectée par le DMSO. La DSI induite par une dépolarisation neuronale (pulse à 0mV pendant 1s) montre une baisse de l'activité GABAergique d'environ 83% dans les 4s suivant la dépolarisation neuronale (**Fig. M3**, 27.0 ± 4.5 % de la charge GABAergique contrôle restante, $n=16$). La DSI induite en présence de DMSO extracellulaire (0.05%) ou intracellulaire (0.1%), a une amplitude comparable à celle quantifiée en absence de DMSO (**Fig. M3**, 32.1 ± 2.7 %, $n=5$, $p=0.069$ pour le DMSO extracellulaire ; $28.5 \pm 5.2\%$, $n=6$, $p=0.303$ pour le DMSO intracellulaire).

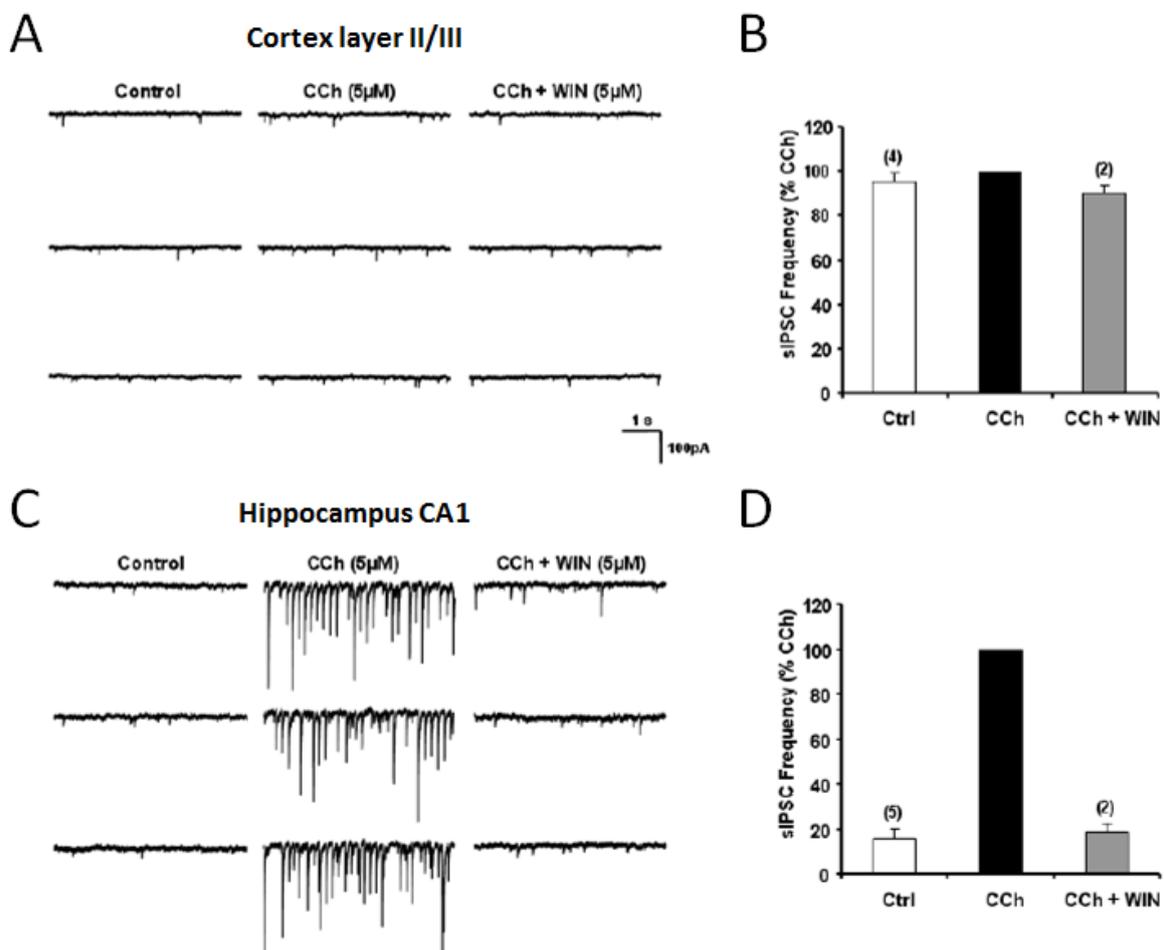


Figure M4. Effet du carbachol (CCh) et du WIN55,212-2 (WIN) sur l'activité spontanée GABAergique des neurones pyramidaux. **A**, Activité spontanée GABA_A mesurée en condition contrôle, en CCh (5 μ M), et en CCh + WIN (5 μ M) sur des tranches de cortex somato-sensoriel dans la couche 2/3. **B**, Groupe de données illustrant les modifications de fréquence d'évènements lors de l'application de CCh et CCh + WIN sur des tranches de cortex somato-sensoriel dans la couche 2/3. **C**, Activité spontanée GABA_A mesurée en condition contrôle, en CCh (5 μ M), et en CCh + WIN (5 μ M) sur des tranches d'hippocampe dans la région CA1. **D**, Groupe de données illustrant les modifications de fréquence d'évènements lors de l'application de CCh et CCh + WIN sur des tranches d'hippocampe de la région CA1. Les données sont normalisées par rapport au CCh.

Il a été également ajouté à l'ACSF, dans la plupart des expériences, du carbachol (CCh, 5 μ M), un agoniste des récepteurs muscariniques, dans le but d'augmenter l'activité spontanée GABAergique qui se trouve être très faible *in vitro*. A noter que l'augmentation de l'activité spontanée GABAergique par l'application extracellulaire de carbachol n'a été observée que dans les tranches d'hippocampe et non dans le cortex, ce qui explique en partie la région d'étude choisie durant la thèse (**Fig. M4**).

4. Imagerie par Fluorescence du calcium

Les variations de calcium ont été mesurées par l'intermédiaire d'une sonde (Oregon Green 488, 20 μ M), dont la fluorescence est dépendante du calcium. Celle-ci, ajoutée au contenu de la solution de pipette de patch pouvait diffuser librement dans le cytosol une fois la configuration cellule-entière obtenue, L'excitation de la sonde était fournie par épifluorescence et la longueur d'onde contrôlée par un monochromateur (PolyV, Till Photonics). La réception des signaux de fluorescence se faisait grâce à une caméra numérique (CoolSnapHQ2, Roper Scientific). Le logiciel Igor Pro (Wavemetrics) était utilisé pour contrôler les paramètres d'excitation photonique et les synchroniser avec les enregistrements électrophysiologiques. L'acquisition des données de Fluorescence était pilotée par le logiciel MetaVue (Molecular Devices). Pour limiter au maximum la perte du signal au cours de l'enregistrement et la photo-toxicité associée à l'excitation des différentes sondes fluorescentes, l'excitation ne fut pas faite en continu mais pour des temps d'exposition bien définis, en faisant en sorte d'avoir une fréquence d'échantillonnage plus importante quand les variations de fluorescence attendues étaient les plus grandes. Ainsi lorsque les mesures de fluorescence étaient couplées à l'enregistrement de salves de PA évoqués par l'injection d'un courant dépolarisant, la période entre 2 images était minimale depuis le début de l'acquisition jusqu'à la fin de la dépolarisation, pour ensuite augmenter de 20% après chaque image. Ainsi, sans perdre d'information sur le déroulement temporel de la variation de calcium libre intracellulaire, l'illumination pouvait être réduite de 30% pour une acquisition de 15 secondes, et de 75% pour une acquisition de 40 secondes.

5. Stimuli

L'ensemble des stimuli nécessaires à la réalisation des expériences d'électrophysiologie furent réalisés à l'aide du logiciel Igor Pro. Dans certaines expériences le mode d'enregistrement (Courant-Imposé vs Voltage-imposé) était sous contrôle du logiciel

Igor Pro. Cela permettait ainsi de basculer rapidement et à des temps prédéterminés d'un mode à l'autre en fonction des protocoles expérimentaux.

Les patrons de décharge *in vivo* rejoués *in vitro* présentés dans les figures R5, R6 et R9 sont extraites de données expérimentales issues d'une étude de David Dupret (Dupret et al., 2010). Ces patrons correspondent à 3 séquences d'apprentissage successives durant lesquels le rat devait retrouver de la nourriture cachée en récompense sur un labyrinthe percé de trous, avant de retourner dans la boîte de départ (start box) où une 4^{ème} récompense l'attendait (**Fig. R5**). Le champ récepteur de la cellule de lieu sélectionné était situé sur le chemin emprunté par l'animal entre la start box et la première localisation où il y avait la nourriture. Ces patrons de décharges enregistrés *in vivo* ont été rejoués *in vitro* sur des neurones pyramidaux de la région CA1 de l'hippocampe, en tranche aigüe, en délivrant des séquences de brèves dépolarisations (2 ou 3nA pendant 1.25ms) suivi de brèves hyperpolarisations (2 ou 3nA pendant 1.25ms) dans le but de reproduire chaque potentiel d'action à des temps spécifiques (**Fig. R5, R6 et R9**).

6. Modélisation neuronale et synaptique

Les évènements synaptiques GABAergiques et glutamatergiques ont été modélisés comme une conductance avec une exponentielle de la forme $(1 - \exp(-t/\tau_{\text{rise}})) \cdot \exp(-t/\tau_{\text{decay}})$ ou $\tau_{\text{rise/decay}}$ est constant. L'activité spontanée a été créée par convolution d'un modèle d'évènement synaptique avec un train d'occurrence de Poisson des évènements spontanés.

τ_{rise} and τ_{decay} sont respectivement de 1ms et 5.5ms pour les conductances excitatrices post-synaptiques (EPSPs) et de 1.5ms et 14.7ms pour les conductances inhibitrices post-synaptiques (IPSPs) (Caillard, 2011). L'amplitude des IPSPs a varié selon une distribution binomiale avec $n=5$ et $p=0.2$. Les IPSPs feed-forward (FF-IPSPs) étaient envoyés avec un délai de 2ms après les EPSPs (Pouille and Scanziani, 2001). L'instruction de la conductance a été ensuite convertie en un signal analogique pour instruire l'amplificateur de courant dynamique (voir plus bas) ou injecté dans le modèle computationnel. Ce dernier était basé sur le modèle LIF (leaky integrate and fire) à seuil d'émission de potentiel d'action aléatoire (Manwani et al., 2002; Caillard, 2011) : $C_m \cdot dV_i/dt = \sum_i g_i \cdot (V_o - V_i) + \sum_i I_i$ with $C_m = 400\text{pF}$; $V_o = -65\text{mV}$. Un PA est généré quand V_i atteint le seuil d'émission des potentiels d'action ($-45 \pm 1\text{mV}$). La résistance membranaire est fixée à $200\text{M}\Omega$. Les évènements GABAergiques et glutamatergiques, affectant à la fois la conductance g et le courant I quand

présent, sont inclus selon l'équation $I_{GABA}=g_{GABA} \cdot (V_m - E_{GABA})$ and $I_{GLU}=g_{GLU} \cdot (V_m - E_{Glu})$. E_{GABA} et E_{Glu} sont respectivement fixés à -70mV et 0mV.

7. Courant imposé dynamique

Pour ajouter des IPSPs et EPSPs artificiels, nous avons utilisé un système de courant imposé dynamique rapide utilisant des cartes d'acquisition National Instruments (PCI 6052E ou PCI 6251) et NI-DAQmx 9.21, et contrôlé par QuB software (www.qub.buffalo.edu ; Milesco et al., 2008). Les expériences de courant imposé dynamique furent réalisées en présence de kynurénate (2mM) et de PTX (100 μ M). Pour les expériences de modélisation avec la feed-forward inhibition, le protocole suivant était réalisé : l'amplitude de l'EPSP a été choisie pour déclencher un PA avec une latence d'approximativement 5ms après le début de l'EPSP ; la plus grande amplitude du FF-IPSP fut définie dans le but d'empêcher l'émission du PA dans quelques séquences EPSP/IPSP. Une courbe préliminaire de probabilité de couplage EPSP-Spike a été calculée après avoir testé plusieurs fois différentes amplitudes d'IPSP. Ceci a permis de définir, pour une amplitude de FF-IPSP donnée, le nombre de séquence EPSP/IPSP qui devrait être injecté théoriquement à la cellule dans le but d'obtenir un couplage réussi, avec une probabilité limite de 0.05. Par la suite, les séquences EPSP/IPSP ont été injecté de façon aléatoire, tel que les latences du couplage EPSP-Spike aux faibles probabilités pourraient être collectées de manière homogène pour la gamme d'IPSP choisie.

8. Acquisitions et Analyse des enregistrements

L'acquisition des signaux électrophysiologiques a été faite à l'aide d'Igor Pro et/ou pCLAMP10 (Molecular Devices) en fonction des besoins expérimentaux. L'amplitude et la fréquence des événements spontanés GABAergiques furent mesurées après une détection semi-automatique à l'aide de MiniAnalysis (Synaptosoft, Georgia, USA). Les mesures de la charge GABAergique au cours du temps furent effectuées avec Igor Pro. Ces mesures nécessitaient de mesurer l'intégrale du courant enregistré en voltage-imposé au cours du temps, après soustraction du courant de maintien et des variations éventuelles de la ligne de base. La charge au cours du temps mesurée par période de 0,5 s représentait la variation de l'intégrale au cours de cette période. La plasticité à court-terme de la transmission GABAergique (DSI) était mesurée comme le changement moyen de charge observé dans les 4 secondes qui suivait la décharge de potentiels d'action ou une dépolarisation à 0mV.

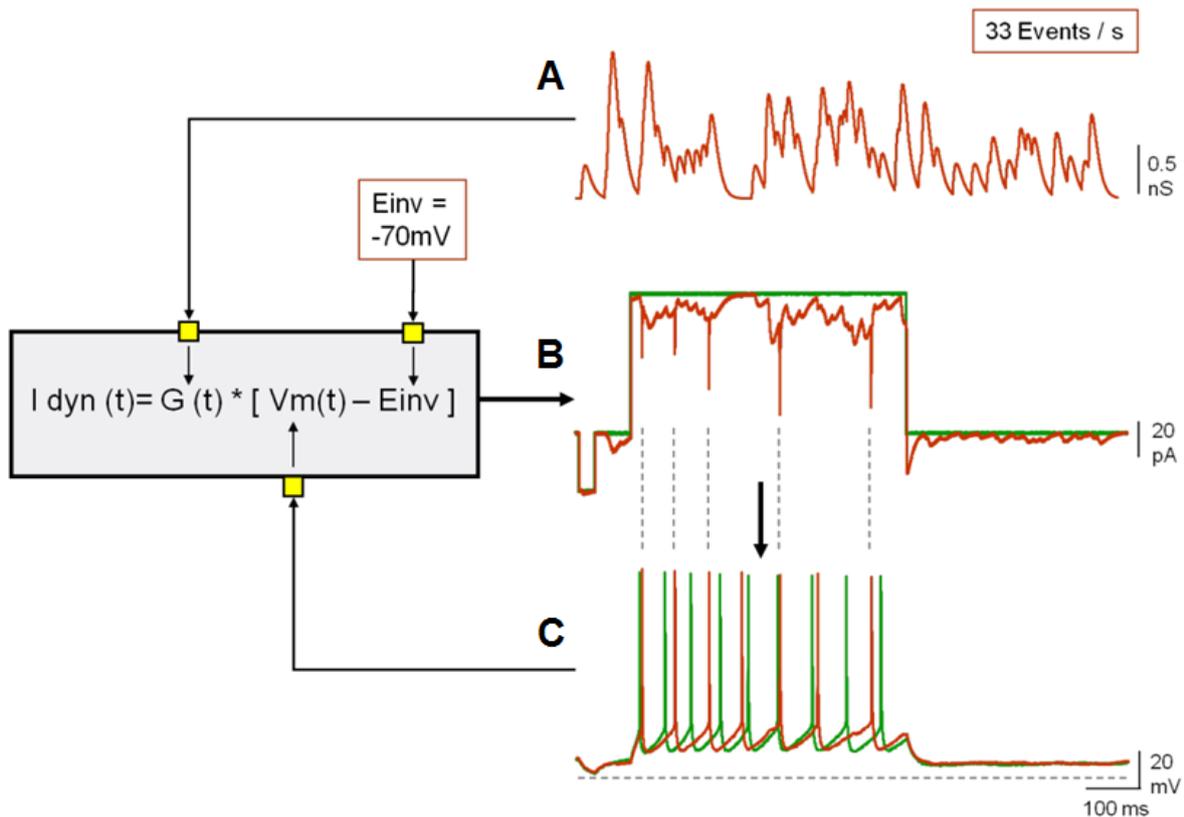


Figure M5. Genèse et injection des courants GABAergiques dynamiques. L'injection du courant dynamique GABAergique nécessite un amplificateur qui résout en temps réel l'équation $I_{GABA}(t) = g(t) * (V_m(t) - E_{invGABA})$. G et V_m correspondent respectivement à la conductance GABAergique et au potentiel membranaire de la cellule et varient au cours du temps. $E_{invGABA}$ correspond au potentiel d'inversion du GABA. **A**, Exemple d'un patron de conductance GABA. Dans cet exemple, la fréquence moyenne était fixée à 33 évènements par seconde. A cette fréquence et compte tenu des cinétiques du profil de conductance synaptique modèle, les évènements isolés sont très rares et on note de nombreuses superpositions d'évènements. **B**, Exemple de la somme de courants statiques et dynamiques injectés au neurone en courant imposé. La trace verte correspond à un courant statique contrôle injecté pour étudier les paramètres de décharge de la cellule pyramidale. La trace marron correspond à la somme de ce même courant statique + le courant dynamique GABAergique calculé selon l'équation de gauche et fonction de la conductance GABAergique présentée en A et du potentiel de membrane de la cellule pyramidale enregistrée en C. On note (pointillés gris) des variations importantes et brèves de courant dynamique lors de l'occurrence synchrone d'un évènement GABAergique et d'un potentiel d'action. Dans ces conditions, la force électromotrice est importante et le courant GABAergique calculé puis injecté sera en conséquence transitoirement augmenté.

Pour évaluer le comportement de décharge, des enregistrements en courant-imposé de la décharge de potentiels d'action furent effectués. Les protocoles consistaient à injecter des courants dépolarisants d'amplitude variable de 1 seconde, en alternant d'une stimulation à l'autre les amplitudes les plus faibles avec les plus fortes pour limiter au maximum des modifications activité-dépendante provoqués par la répétition trop fréquente de salves soutenues de PA (Cudmore and Turrigiano, 2004). Pour un même neurone, des courbes

représentant le nombre moyen de PA en fonction du courant (DC) injecté pouvaient alors être générées pour chaque condition expérimentale. A partir de ces valeurs, les changements d'excitabilité sont définis comme la moyenne des ratios de fréquence entre une condition test et une condition contrôle pour un DC donné.

Les mesures de fidélité nécessitaient tout d'abord de détecter le temps d'occurrence de l'ensemble des potentiels d'action. Après une détection rapide de valeurs de temps où le potentiel de membrane dépasse -20mV , le temps où la pente de dépolarisation dV/dt précédant ce seuil de -20mV et dépassant 10 mV/ms était défini comme le temps d'occurrence du PA. Pour chaque DC, l'analyse statistique de la période (ISI) entre le spike n et le spike $n+1$ est effectué entre le 2nd et l'avant dernier PA. On pouvait alors calculer la moyenne et la déviation standard de chaque période et donc obtenir une valeur de coefficient de variation de la période ($CV_{\text{ISI}} = SD_{\text{ISI}} / \text{Moyenne}_{\text{ISI}}$) pour chaque période. Alors pour chaque DC le CV_{ISI} moyen était calculé. Une fonction CV_{ISI} vs Fréquence obtenue par régression linéaire de ces valeurs pouvait être obtenue, afin d'estimer et comparer des valeurs de CV_{ISI} à fréquence égale. Avec cette méthode il était possible d'évaluer la capacité du neurone enregistré à reproduire à l'identique une salve de potentiels d'action dans une condition donnée, indépendamment des phénomènes d'adaptation qui peuvent survenir lors de décharges répétitives. Un minimum de 5 stimulations était effectué pour calculer le CV_{ISI} et la fréquence moyenne pour un DC et une condition donnée. Dans les figures représentant le CV en fonction de la fréquence, les barres d'erreur correspondent à des déviations standard. Pour le reste des figures les barres d'erreur représentent l'erreur standard. Dans le cadre des expériences où était évalué le couplage EPSP-spike, pour chaque condition la probabilité d'émettre un PA était calculée, et les latences entre le début de l'EPSP et le seuil du PA étaient collectées. Les variations de latence (jitter) correspondaient alors à la déviation standard de la moyenne des latences.

Le test statistique utilisé dans toutes les séries de données fut le test de Mann-Whitney. Les différences furent considérées significatives quand $p < 0.05$.

RESULTATS

Dans cette partie, il sera traité des principaux résultats obtenus pendant la thèse ainsi que de quelques résultats préliminaires qui visaient à caractériser le phénomène de DSI dans nos conditions expérimentales avant de définir les paramètres de la décharge neuronale requis pour induire la DSI et ses conséquences sur la précision temporelle de l'émission de potentiels d'action.

1. Résultats préliminaires : Caractérisation du phénomène de DSI

1.1 Diffusion des endocannabinoïdes

La DSI est un phénomène de plasticité de l'activité GABAergique à court-terme nécessitant la diffusion paracrine des endocannabinoïdes. Il est donc envisageable de penser qu'une telle diffusion est capable d'altérer l'activité spontanée GABAergique des cellules voisines de celle qui va produire les endocannabinoïdes dans une sphère de diffusion d'environ 20µm (Wilson and Nicoll, 2001) (**Fig. R1A**). Dans une série d'expérience, nous avons enregistré 2 neurones pyramidaux voisins dans la région CA1 de l'hippocampe (**Fig. R1B**). Les résultats ont montré qu'à la suite d'une dépolarisation à 0mV pendant 1s d'une cellule pyramidale, qui voyait son activité spontanée GABAergique alors diminuer de façon transitoire pendant quelques secondes (DSI), la cellule pyramidale voisine, non dépolarisée, voyait également son activité spontanée GABAergique de manière similaire à la cellule dépolarisée et dans une période qui coïncide avec la production d'endocannabinoïde de la cellule dépolarisée (**Fig. R1C et D**, n=3). Ces résultats suggèrent que la production d'endocannabinoïde par une cellule pyramidale donnée peut diminuer l'activité GABAergique des cellules voisines dans un périmètre donné et ainsi permettre d'augmenter la précision temporelle et la synchronisation de la décharge d'une population de neurones pyramidaux spatialement proches.

1.2 La DSI est un phénomène calcium-dépendant

Comme décrit dans la littérature, le calcium joue un rôle important dans la production des endocannabinoïdes et donc dans l'apparition du phénomène de DSI responsable de cette plasticité à court terme de l'activité GABAergique. En effet, il a été montré que lorsque l'on

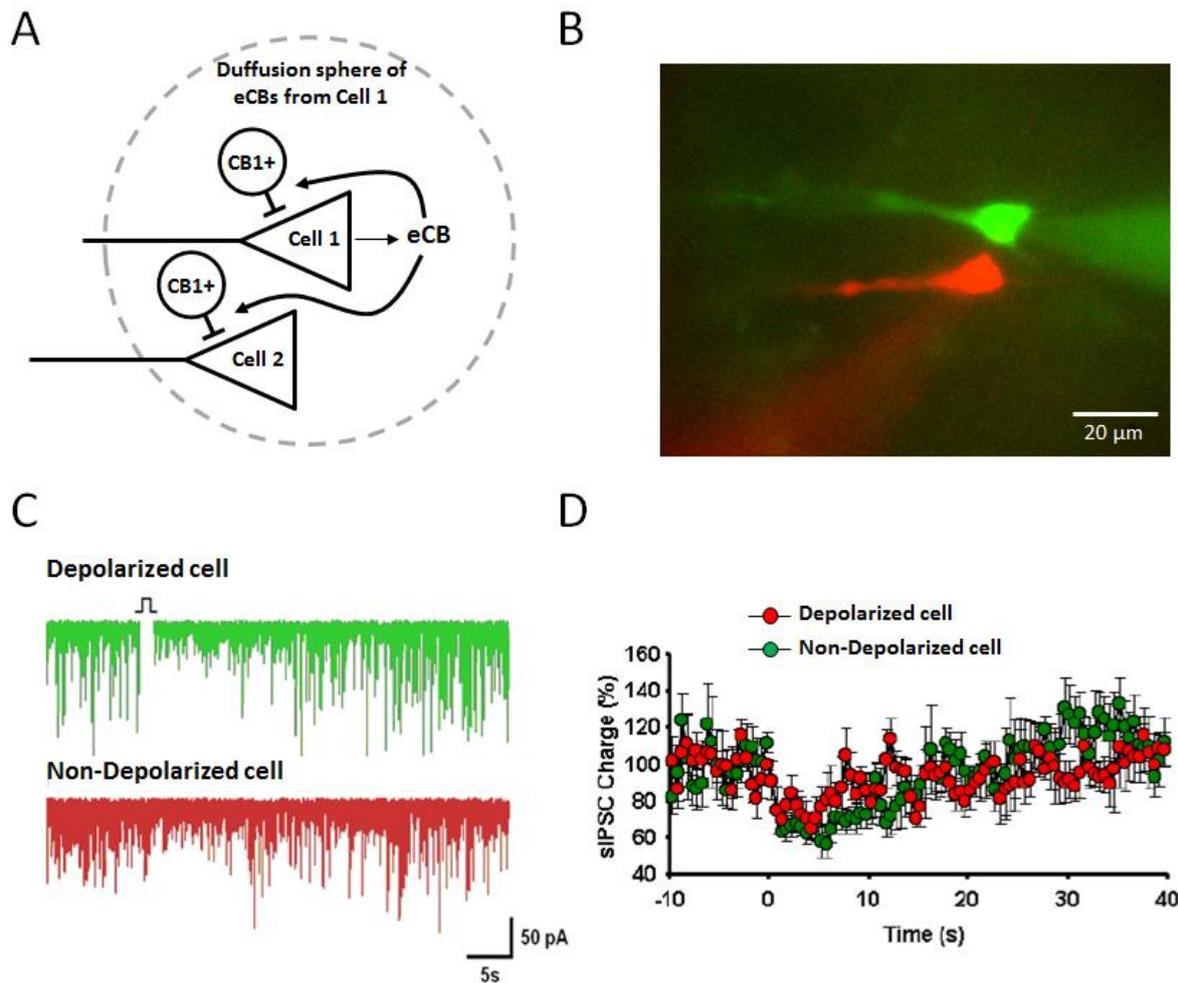


Fig. R1. Diffusion des endocannabinoïdes. **A**, Schéma hypothétique de la sphère de diffusion des endocannabinoïdes. La cellule 1 (cell 1) produisant des endocannabinoïdes peut dans une sphère d'environ 20µm (Wilson and Nicoll, 2001) activer les récepteurs CB1 des interneurons la contactant mais aussi ceux des interneurons contactant des cellules pyramidales voisines (cell 2). **B**, Image par microscopie fluorescente illustrant le protocole expérimental consistant à enregistrer 2 neurones pyramidaux de la région CA1 de l'hippocampe. Noter que les deux neurones sont visualisés à l'aide de 2 fluorophores différents que sont l'Alexa 488 (vert) et l'Alexa 568 (rouge). **C**, Enregistrements électrophysiologiques en mode voltage imposé montrant sur les 2 cellules pyramidales les variations de courants post-synaptiques inhibiteurs spontanés (sIPSCs) suite à la dépolarisation (pulse à 0mV pendant 1s) de la cellule verte. **D**, Analyse de la variation de charge des événements spontanés inhibiteurs sur l'ensemble des paires enregistrées (n=3).

chélate les variations de calcium intracellulaire avec de fortes concentrations en BAPTA (Pitler and Alger, 1994), l'apparition du phénomène de DSI était bloquée. De même la libération par photolyse de calcium cagé provoque l'apparition du phénomène de DSI (Wilson and Nicoll, 2001).

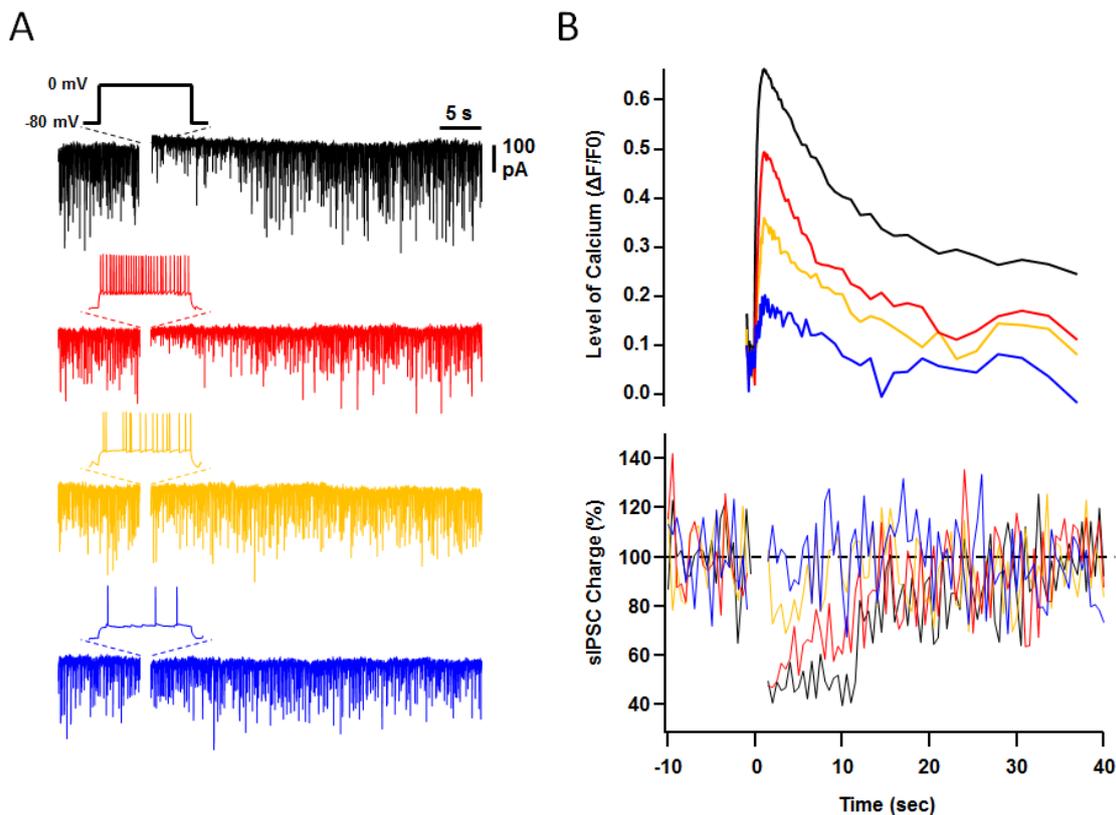


Fig. R2. La DSI est un phénomène calcium-dépendant. **A**, Enregistrements électrophysiologiques en mode voltage montrant les variations de courants post-synaptiques inhibiteurs spontanés (sIPSCs) suite à une dépolarisation neuronale (noir, pulse à 0mV pendant 1s) ou lors de brefs passage en mode courant imposé pour faire décharger le neurone à différentes fréquences (rouge, 32 PAs ; orange, 16 PAs ; bleu, 3 PAs). **B**, (Haut) Variations du calcium intracellulaire suite à une dépolarisation en mode voltage imposé (noir) ou lors de décharge de PAs en mode courant imposé (rouge, orange et bleu). (Bas) Analyse de la variation de charge des évènements spontanés inhibiteurs suite à une dépolarisation en mode voltage imposé (noir) ou lors de la décharge de PAs en mode courant imposé (rouge, orange et bleu).

Les expériences qui suivent ont consisté à coupler des enregistrements électrophysiologiques en mode voltage-imposé ou courant-imposé et en configuration cellule entière avec des techniques d'imagerie par fluorescence utilisant une sonde, l'Oregon Green 448 (20 μ M), dont la fluorescence est dépendante du calcium. Ce couplage des enregistrements électrophysiologiques avec des techniques d'imagerie du calcium nous a permis de pouvoir faire des corrélations entre la fréquence de décharge neuronale et la variation de calcium intracellulaire qu'elle peut occasionner. Ainsi plus on augmente la fréquence d'émission des potentiels d'action d'un neurone pyramidal hippocampique, plus la variation de calcium et donc l'augmentation de calcium intracellulaire est grande (**Fig. R2A et B**).

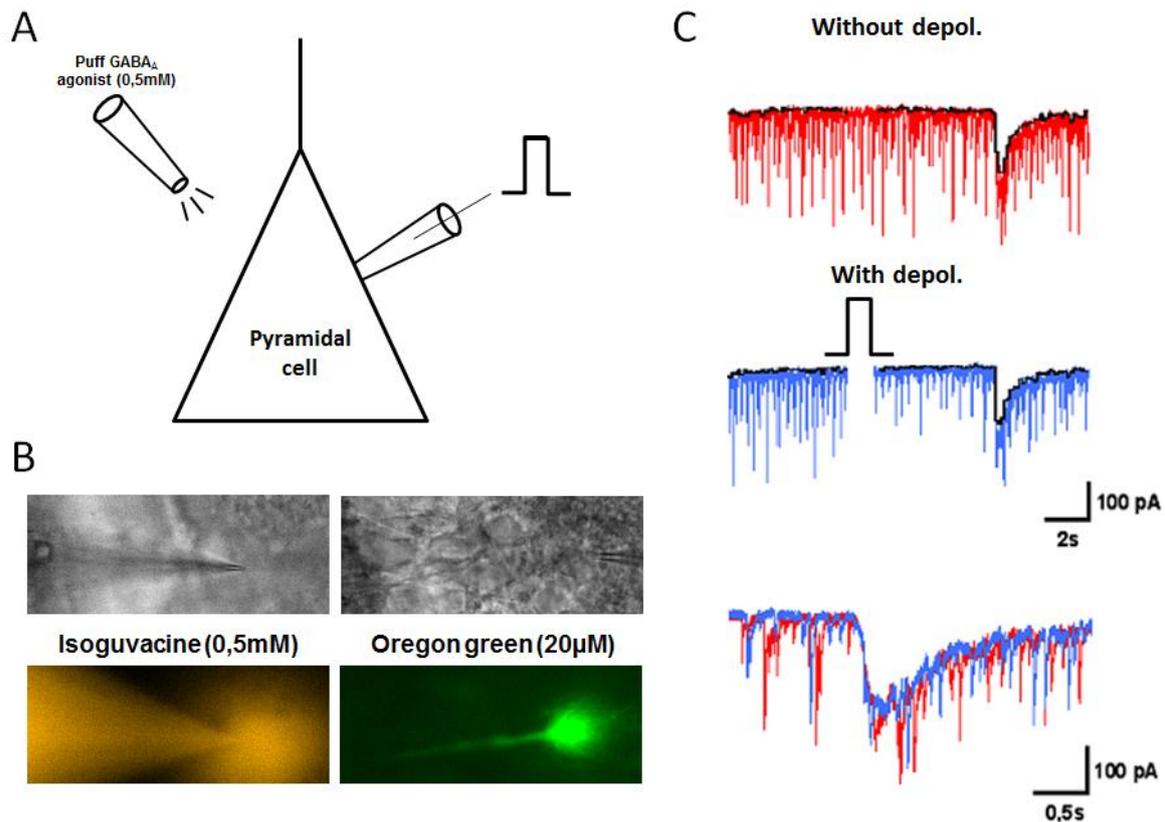


Fig. R3. La dépolarisation n'affecte pas la réponse des récepteurs GABA_A aux agonistes exogène. **A**, Schéma montrant le protocole expérimental qui consiste à enregistrer un neurone pyramidal de la région CA1 de l'hippocampe, et de placer en plus une autre pipette (puff) à proximité pour éjecter sous pression (7psi pendant 20ms) un agoniste des récepteurs ionotropiques GABA_A, l'isoguvacine (0,5mM). **B**, Images illustrant les pipettes de puff et d'enregistrement en monochrome (gauche) et en fluorescence (droite). **C**, Enregistrements électrophysiologiques en mode voltage-imposé de courants post-synaptiques inhibiteurs (IPSC) spontanés mais aussi produits par l'éjection de l'isoguvacine dans les conditions sans dépolarisation (trace rouge) et avec dépolarisation (traces bleue). Noter la superposition des IPSC dans les 2 conditions qui ne montre aucune variation dans la réponse des récepteurs GABA_A induite par l'éjection d'isoguvacine, alors qu'une DSI de l'activité spontanée est observée suite à la dépolarisation

1.3 Expression pré-synaptique de la DSI

Il nous a paru ensuite nécessaire de vérifier si la baisse de l'activité spontanée GABAergique induite par la dépolarisation, observée pendant le phénomène de DSI est bien la conséquence d'une modulation de la probabilité de libération de neurotransmetteurs par l'élément pré-synaptique (interneurone CB1+) et non la baisse de la réponse des récepteurs ionotropiques GABA_A induite par exemple par l'entrée de calcium suite à la dépolarisation. Nous avons donc testé si la réponse des récepteurs GABA_A était différente avant et après une dépolarisation d'un neurone pyramidal. Pour répondre à cette question, nous avons placé au-

dessus du neurone enregistré une seconde pipette de verre remplie d'isoguvacine (0.5mM), un agoniste des récepteurs GABA_A. L'agoniste pouvait alors être éjecté brièvement (20ms) sous pression (7psi), dans le but de générer un courant GABAergique dont l'amplitude et la durée ont été comparés avant et après une dépolarisation (**Fig. R3A**). Les résultats montrent que le courant GABAergique généré par application d'isoguvacine est similaire, autant dans l'amplitude que dans les cinétiques, avant ou après dépolarisation lorsque la DSI est maximale (**Fig. R3C**), suggérant donc que la réduction de l'activité GABAergique observée lors de la DSI n'est pas la conséquence d'une perte de sensibilité et/ou efficacité des récepteurs GABA_A post-synaptiques, mais plutôt la conséquence d'une diminution transitoire de la probabilité de libération de GABA.

1.4 La DSI est similaire sur l'activité spontanée et l'activité évoquée GABAergique

Dans le but de savoir si l'activité évoquée GABAergique et l'activité spontanée GABAergique répondent de la même manière à un protocole d'induction de la DSI (pulse à 0mV pendant 1s) nous avons réalisé des enregistrements à la fois de l'activité spontanée suite à l'application de carbachol (5μM) en extracellulaire mais aussi de l'activité évoquée GABAergique en plaçant une électrode de stimulation dans le stratum pyramidale à proximité de la cellule pyramidale enregistrée (**Fig. R4A**). Les résultats de cette série d'expérience ont montré que l'activité spontanée et l'activité évoquée GABAergique répondait de manière similaire et avaient la même cinétique suite à une dépolarisation neuronale de 1s à 0mV (**Fig. R4B, C et D**, n=6). Notons que le pic de DSI paraît plus important pour les courants évoqués (46.0%±10.3% de l'amplitude des courants évoqués GABAergiques contrôles, n=6) que pour les courants spontanées GABAergiques (62.8%±7,6% de l'activité spontanée GABAergique contrôle, n=6). Cela peut s'expliquer par l'analyse quantitative qui n'est pas exactement la même. En effet, la quantification de l'activité spontanée se fait par l'analyse des variations de charge des événements spontanée, c'est à dire par un calcul de l'intégrale des événements, alors que la quantification des événements évoqués se fait par une analyse de l'amplitude de ces derniers. Cependant ces résultats suggèrent que la DSI est comparable dans les deux types d'activités puisque les cinétiques de retour de l'activité GABAergique aux niveaux contrôles sont comparables. Une autre explication probable vient du fait que toutes les terminaisons GABAergiques n'expriment pas les récepteurs CB1 et ne sont donc pas sensibles aux endocannabinoïdes (Tsou et al., 1999). Un recrutement préférentiel de synapses CB1 positives

lors des stimulations évoquées dans le stratum pyramidale pourrait donc donner lieu à une plus grande sensibilité des réponses GABAergiques aux protocoles induisant la DSI. L'ensemble de ces résultats préliminaires nous ont confirmé quelques caractéristiques reportées dans la littérature depuis que le phénomène de DSI a été découvert et observé dans l'hippocampe. Les résultats qui suivent ont fait l'objet d'un article soumis et posent la question du rôle fonctionnel que pourrait avoir la DSI dans la précision temporelle de la décharge des cellules pyramidales de la région CA1 de l'hippocampe appelées également « cellules de lieu ».

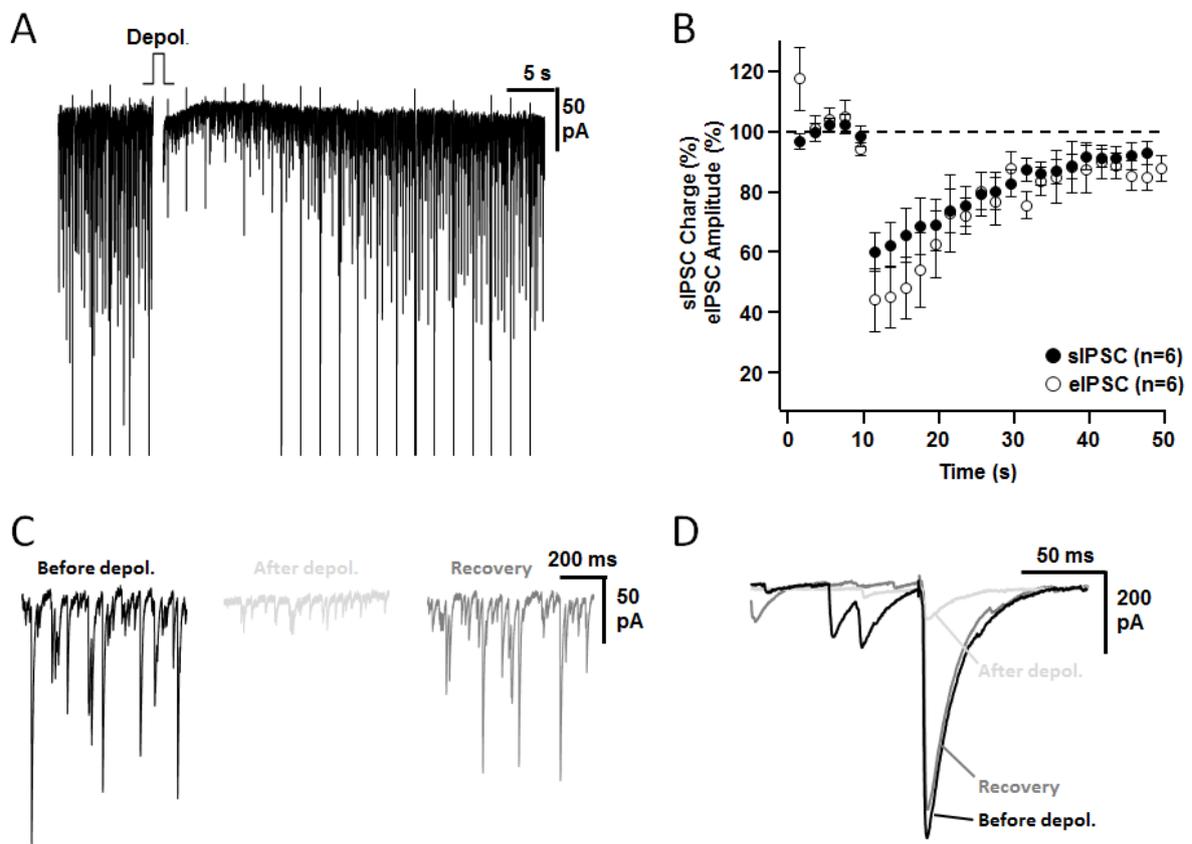


Fig. R4. La DSI est comparable pour l'activité spontanée et l'activité évoquée GABAergique. **A**, Enregistrement électrophysiologique en mode voltage imposé montrant des variations de courants spontanés et évoqués GABAergiques suite à une dépolarisation (pulse à 0mV pendant 1s). **B**, Analyse de la variation de charge des événements spontanés et de l'amplitude des courants évoqués inhibiteurs suite à une dépolarisation en mode voltage imposé (n=6). **C**, Enregistrements électrophysiologiques des courants spontanés inhibiteurs avant la dépolarisation (noir), après la dépolarisation (gris clair), et quelques dizaines de secondes après la dépolarisation (gris foncé). Zoom de la trace illustrée en **A**. **D**, Superposition des courants évoqués inhibiteurs avant la dépolarisation (noir), après la dépolarisation (gris clair), et quelques dizaines de secondes après la dépolarisation (gris foncé). Zoom de la trace illustrée en **A**.

2. Résultats principaux : Rôle de la DSI dans la précision temporelle

2.1 Induction de la DSI par des patrons de décharges de cellules de lieu

Pour déterminer si des patrons de décharge de cellules de lieu peuvent induire le phénomène de DSI (Depolarization-induced Suppression of Inhibition), des patrons de décharges *in vivo* furent rejoués *in vitro* tout en enregistrant l'activité GABAergique spontanée au cours du temps dans des neurones pyramidaux de la région CA1 de l'hippocampe sur tranches aigües. Les patrons de décharges *in vivo* ont été obtenus par des techniques d'électrophysiologie extracellulaire avec des électrodes multi-canaux placées dans l'hippocampe de rats lors d'exploration spatiale (voir méthodes et Dupret et al. 2010), et convertis en de brefs courants dépolarisant (2nA ou 3nA pendant 1,25ms) pour rejouer la séquence exacte de potentiels d'action et ainsi mesurer des variations de l'activité GABAergique spontanée au cours du temps. Dans le but de quantifier seulement l'activité GABAergique spontanée, les enregistrements sont effectués en présence de kynurénate (2mM), un antagoniste des récepteurs ionotropiques au glutamate (NMDA et non-NMDA). L'activité GABAergique étant très faible sur tranches aigües, une application extracellulaire de carbachol (5µM) a été réalisée dans le but d'augmenter la fréquence de l'activité GABAergique et d'améliorer la qualité des mesures de variation de l'activité GABAergique spontanée au cours du temps. De plus, l'activité GABAergique mesurée était une activité GABAergique dépolarisante puisque pour des raisons techniques, nous avons réalisé cette série d'expérience avec une solution intracellulaire riche en ions chlorures ($E_{GABA} \approx 0mV$), dans le but de faciliter la détection des événements $GABA_A$ et leur quantification au cours de l'enregistrement. La figure R5 illustre le genre de patron de décharge d'une cellule de lieu qui a été appliqué *in vitro*. Les résultats de cette première série d'expériences montrent qu'à la suite de l'exécution successive de 3 patrons de décharge *in vivo* d'une cellule de lieu (29, 20 et 22 PAs), il apparaît clairement des variations transitoires et significatives de l'activité GABAergique spontanée reçue par le neurone pyramidal enregistré *in vitro* (**Fig. R5C et E**; $30.9 \pm 3.8\%$, $45.2 \pm 5.3\%$ et $36.3 \pm 3.4\%$ d'activité GABAergique restante 4s après la stimulation par rapport à l'activité GABAergique mesuré dans les secondes précédant la stimulation; $n=4$; $p<0.05$). Plusieurs études ont montré l'implication du 2-AG, l'un des principaux endocannabinoïdes dans le SNC, dans les phénomènes de plasticité à court-terme de la transmission GABAergique, notamment pendant le phénomène de DSI. Dans le but de confirmer cette hypothèse, nous avons appliqué dans la solution intracellulaire de la tétrahydrolipstatine (THL, 1µM), un inhibiteur de la

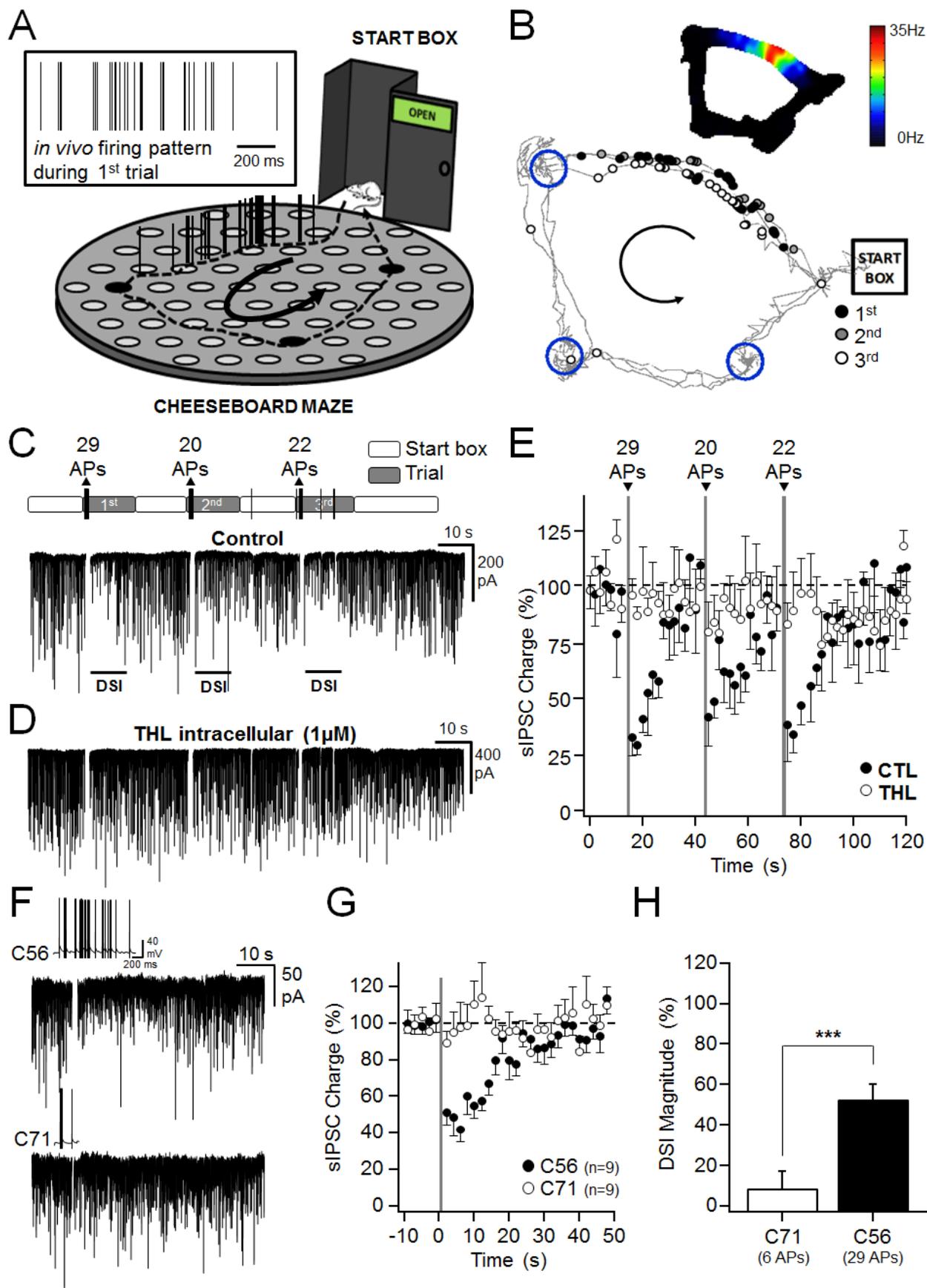


Fig. R5. Induction *in vitro* de la DSI par des patrons de décharge de cellules de lieu.

A, Schéma représentant le test comportemental réalisé par l'animal pour évaluer la mémoire spatiale (Dupret et al., 2010). Durant l'apprentissage, l'animal doit trouver et mémoriser des localisations différentes de 3 récompenses (nourriture). **B**, Position de la tête de l'animal lorsque des potentiels d'action sont émis par une cellule de lieu lors de 3 essais consécutifs. Chaque point représente la localisation précise d'un PA individuel au cours du trajet de l'animal. En encart est représenté le champ d'activité de la cellule de lieu considérée lors des 20 derniers essais. **C**, Enregistrements électrophysiologiques en mode voltage-imposé de l'activité spontanée GABAergique interrompus par des passages transitoires en mode courant-imposé où de brèves injections de courant dépolarisant sont réalisées dans le but de faire émettre au neurone enregistré un patron de décharge de cellule de lieu enregistrée *in vivo*. Ceci inclue aussi le temps passé dans la startbox entre 2 essais. **D**, Mêmes expériences qu'en C mais en présence d'un inhibiteur de l'enzyme de biosynthèse du 2-AG, le THL (1 μ M). **E**, Variation au cours du temps de l'activité GABAergique durant la séquence entière de patrons de décharge *in vivo* illustré en B et C en condition contrôle (noir, n=4) et en THL (blanc, n=4). Les barres verticales grises représentent la décharge *in vivo* lors du passage de l'animal dans le champ récepteur de la cellule de lieu considérée. **F**, Enregistrements électrophysiologiques en mode voltage-imposé de l'activité spontanée GABAergique interrompus par des passages transitoires en mode courant-imposé où de brèves injections de courant dépolarisant sont réalisées dans le but de faire émettre au neurone enregistré un patron de décharge de 2 cellules de lieu différentes enregistrées *in vivo* (C56 et C71). **G**, Variation au cours du temps de l'activité GABAergique avant et après l'exécution de différents patrons de décharge *in vivo* montrés en F (C56 et C71, n=9). **H**, Amplitude de la DSI mesurée dans les 4 secondes suivant l'exécution des patrons de décharge *in vivo* montrés en F.

diacylglycèreol lipase qui est une des enzymes de biosynthèse du 2-AG. Dans cette condition expérimentale, les patrons de décharges *in vivo* n'induisent plus les baisses transitoires significatives de l'activité GABAergique spontanée reçue par les neurones *in vitro* (**Fig. R5D et E**; 91.3 \pm 6.2%, 81.6 \pm 3.4% et 86 \pm 2.6% d'activité GABAergique restante 4s après la stimulation par rapport à l'activité GABAergique mesuré dans les secondes précédant la stimulation; n=4; p>0.05). L'ensemble de ces résultats montrent que l'activité d'une cellule de lieu est suffisante pour induire des phénomènes de DSI et que cela fait intervenir le 2-AG.

Cependant, des expériences complémentaires (**Fig. R5F, G et H**) montrent que l'amplitude de la DSI dépend de la séquence de la cellule de lieu jouée et notamment du nombre de potentiels d'action qu'elle a émis. En effet, la cellule de lieu C56 (29 PAs) montre une DSI significative dans les 4s suivant la stimulation au contraire de la cellule de lieu C71 (6 PAs) qui ne montre guère d'effet ou de variation significative sur l'activité spontanée GABAergique que reçoit la cellule pyramidale enregistrés *in vitro* (**Fig. R5F, G et H**; 91.5 \pm 6.1% d'activité GABAergique restante 4s après la stimulation par rapport à l'activité GABAergique mesuré dans les secondes précédant la stimulation, n=9, p=0.346). Pour évaluer de façon plus précise le taux d'activité requis pour induire une DSI significative, nous

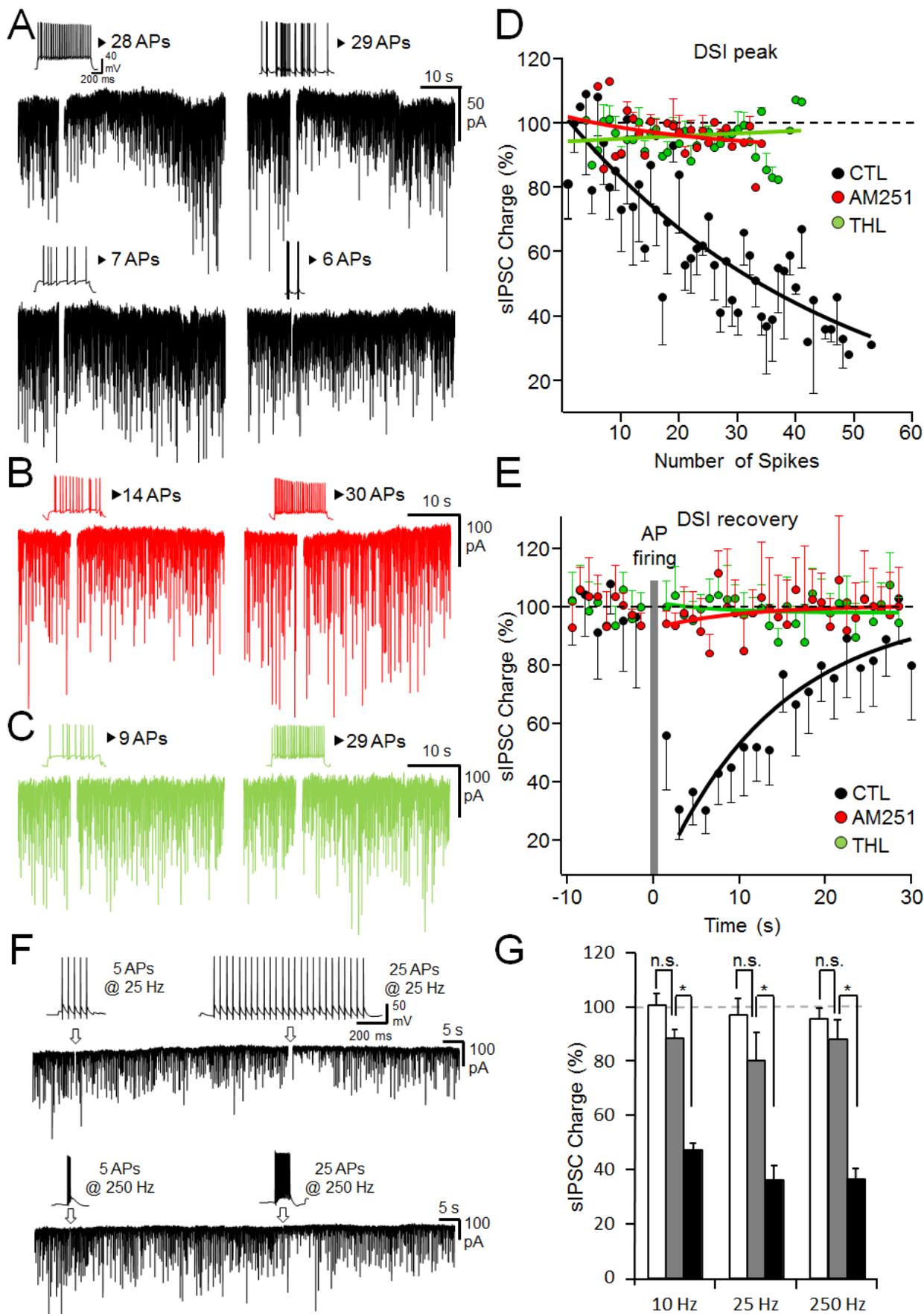


Fig. R6. La décharge des cellules pyramidales induit une DSI 2AG-dépendante et nombre de PA-dépendant.

A, Enregistrements électrophysiologiques en mode voltage-imposé de l'activité spontanée GABAergique ($V_m = -80\text{mV}$). Après une période contrôle, l'enregistrement de la cellule est transitoirement basculé en mode courant-imposé dans le but de faire émettre au neurone un ou plusieurs potentiels d'action après l'application d'un créneau de courant dépolarisant de 1 seconde (gauche) ou après de brèves applications de courants mimant la séquence de potentiels d'action de cellules de lieu (droite). A noter que ce sont les mêmes patrons de décharges que ceux exécutés dans la figure 1. **B**, Même expérience qu'en A (gauche) mais en présence d'AM251 en extracellulaire, l'antagoniste des récepteurs CB1. **C**, Même expérience qu'en A (gauche) mais en présence de THL en intracellulaire, l'inhibiteur de l'enzyme de biosynthèse du 2-AG. **D**, Analyse quantitative du pic de DSI en fonction du nombre de PAs émis par les neurones pendant un créneau de courant dépolarisant de 1s en condition contrôle (noir, $n=20$), AM251 ($5\mu\text{M}$, rouge, $n=8$), et THL ($1\mu\text{M}$, vert, $n=3$). A noter que le pic de DSI est mesuré sur les 4 secondes qui suivent la fin de la stimulation. **E**, Variations au cours du temps de l'activité GABAergique suite à une décharge d'une trentaine de PAs en condition contrôle (noir, $n=5$), en présence d'AM251 (rouge, $n=5$), ou en présence de THL (vert, $n=5$). **F**, Enregistrement électrophysiologiques en mode voltage-imposé de l'activité spontanée GABAergique et interrompues par des passages en mode courant-imposé où le neurone recevait de brèves injection de courant dépolarisant pour induire une décharge de potentiel d'action à des fréquences, des durées, et des nombres de PAs différents. **G**, Analyse quantitative des variations de l'activité GABAergique à différentes fréquences pour un nombre de PA donné (blanc = 1 PA, gris = 5 PAs, noir = 30PAs).

avons fait décharger des neurones pyramidaux à différentes fréquences pendant l'application d'un créneau de courant dépolarisant de 1s. Dans la figure R6, une gamme de stimulation allant de 3 à 55 PAs montre que la DSI est dépendante du nombre de potentiels d'action émis par le neurone enregistré (**Fig. R6A et D**). De plus, que ce soit par l'application de créneau de courant dépolarisant (dépolarisation constante de 1s) ou par de brèves applications de courant dépolarisant pour reproduire une séquence de décharge de cellule de lieu (dépolarisation de 1.25ms à 2/3nA suivi d'hyperpolarisation de 1.25ms à 2/3nA), les niveaux de DSI atteints sont comparables d'un genre de stimulation à l'autre. Cependant, on retrouve toujours la dépendance du phénomène de DSI au nombre de PAs émis. En effet, 6 PAs émis suite au créneau dépolarisant de 1s n'induisent pas de DSI significative ($107.9\pm 11.6\%$ de l'activité GABAergique contrôle quand celle-ci est mesurée 4s après la stimulation, $n=4$, $p=0.557$) mais similaire à celle induite par la décharge *in vivo* de la cellule de lieu (6 PAs) avec des stimulations brèves (**Fig. R6A**, $p=0.14$). Cette dépendance de la DSI au nombre de PAs émis par un neurone pyramidal est cependant bloquée par l'application extracellulaire d'un antagoniste des récepteurs CB1, l'AM251 ($5\mu\text{M}$). En effet, alors qu'une décharge de 30 PAs en condition contrôle induit une baisse transitoire et significative de l'activité GABAergique

spontanée d'environ 60% (**Fig. R6E**, $40.4 \pm 10.5\%$ de l'activité GABAergique contrôle après stimulation, $n=5$, $p < 0.001$), une décharge équivalente en terme de nombre de PAs mais en présence d'AM251 n'induit plus de DSI significative (**Fig. R6E**, $99.9 \pm 3.2\%$ de l'activité GABAergique contrôle après stimulation; $n=5$, $p=0.34$). Il en va de même quand l'expérience est réalisée avec l'inhibiteur de la DGL, le THL ($1\mu\text{M}$), qui ne montre aucune variation significative de l'activité GABAergique spontanée après une stimulation d'une trentaine de PAs (**Fig. R6E**, $98.9 \pm 3.1\%$ de l'activité GABAergique restante après stimulation; $n=3$, $p=0.35$).

Pour finir, il nous a semblé utile de confronter 2 paramètres importants dans l'induction et l'expression de la DSI : la fréquence de décharge (en Hz) et le nombre de PAs au cours de la décharge (**Fig. R6F et G**). Jusqu'à présent, la plupart des stimulations (hormis celles issues des patrons de décharge *in vivo*) était faites avec des dépolarisations de 1s. Il était donc difficile de savoir si la fréquence ou le nombre de PAs était le facteur déterminant l'amplitude de la DSI car les valeurs étaient toutes les deux similaires (ex : une décharge de 1s à 20 Hz est aussi une décharge à 20 PAs). Ainsi, dans une gamme de fréquence allant de 10 à 250 Hz, nous avons fait émettre 1, 5 ou 25 PAs par le neurone pyramidal enregistré, et les résultats montrent que quel que soit la fréquence de décharge, l'amplitude de la DSI dépendra principalement du nombre de PAs émis par la cellule pyramidale de la région CA1 de l'hippocampe (**Fig. R6G**).

L'ensemble de ces résultats montrent donc qu'une cellule de lieu peut par son activité, et si le nombre de PAs émis est suffisant, induire le phénomène de DSI et que cette baisse transitoire de l'activité GABAergique fait intervenir le 2-AG comme messager rétrograde.

2.2 Blocage de la DSI par le THL et non par le RHC-80267

Suite à la controverse pharmacologique sur le blocage de la DSI, à savoir est-ce que le 2-AG ou l'anandamide est l'endocannabinoïde responsable du phénomène de la DSI dans la région CA1 de l'hippocampe, nous avons voulu vérifier si l'application de deux inhibiteurs de la diacyl glycérol lipase (DGL), enzyme de biosynthèse du 2-AG, pouvait être à l'origine d'un blocage du phénomène de DSI suite à une dépolarisation neuronale. Les deux inhibiteurs testés furent le THL et le RHC-80267.

Dans une première série d'expérience, nous avons appliqué en intracellulaire le RHC-80267 et le THL, respectivement à la concentration de $50\mu\text{M}$ et $1\mu\text{M}$ (**Fig. R7A et C**). Les résultats montrent effectivement un blocage de la DSI par le THL ($1\mu\text{M}$) en intracellulaire

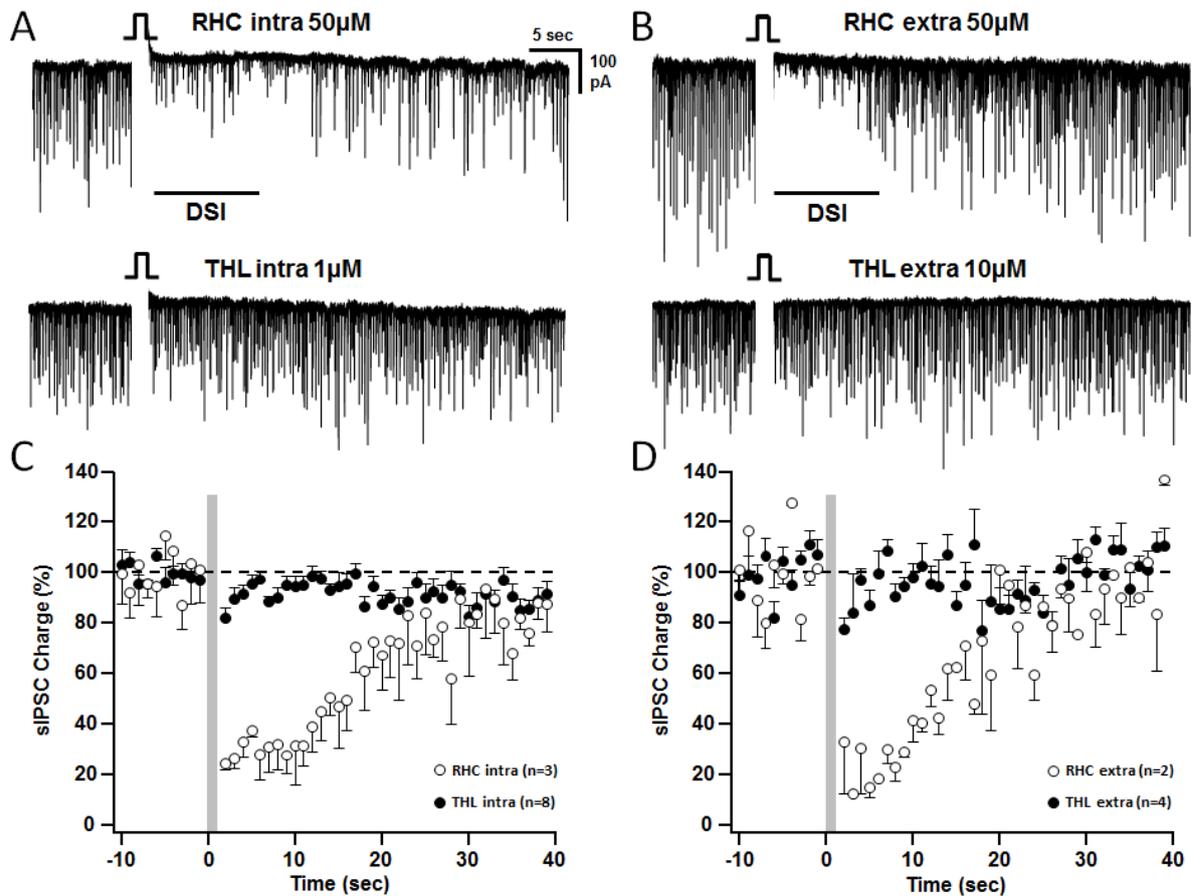


Fig. R7. Controverse pharmacologique du blocage de la DSI par différents inhibiteurs de la DGL. **A**, Enregistrements électrophysiologiques en mode voltage imposé des variations de l'activité spontanée GABAergique suite à une dépolarisation neuronale (pulse à 0mV pendant 1s) en présence d'un inhibiteur de la DGL, le RHC-80267 (50µM, en haut), ou le THL (1µM, en bas) en intracellulaire. **B**, Enregistrements électrophysiologiques en mode voltage imposé des variations de l'activité spontanée GABAergique suite à une dépolarisation neuronale (pulse à 0mV pendant 1s) en présence d'un inhibiteur de la DGL, le RHC-80267 (50µM, en haut), ou le THL (10µM, en bas) en extracellulaire. **C**, Variations de l'activité GABAergique suite à l'application des inhibiteurs de la DGL en intracellulaire (RHC, blanc, n=3 ; THL, noir, n=8) au cours du temps. **D**, Variations de l'activité GABAergique suite à l'application des inhibiteurs de la DGL en extracellulaire (RHC, blanc, n=2 ; THL, noir, n=4) au cours du temps.

(82.7±3.9% de l'activité GABAergique contrôle restante après la dépolarisation, n=8), mais un blocage inefficace de la DSI en présence du RHC-80267 (50µM) en intracellulaire (30.9±3.7% de l'activité GABAergique contrôle restante après la dépolarisation, n=3). Les résultats sont similaires après l'application des mêmes inhibiteurs, le RHC-80267 et le THL, en extracellulaire, respectivement à la concentration de 50µM et 10µM (**Fig. R7B et D**). En effet, suite à l'application en extracellulaire du THL (10µM) en extracellulaire, on peut observer un blocage de la DSI (86.6±7.5% de l'activité GABAergique contrôle restante après

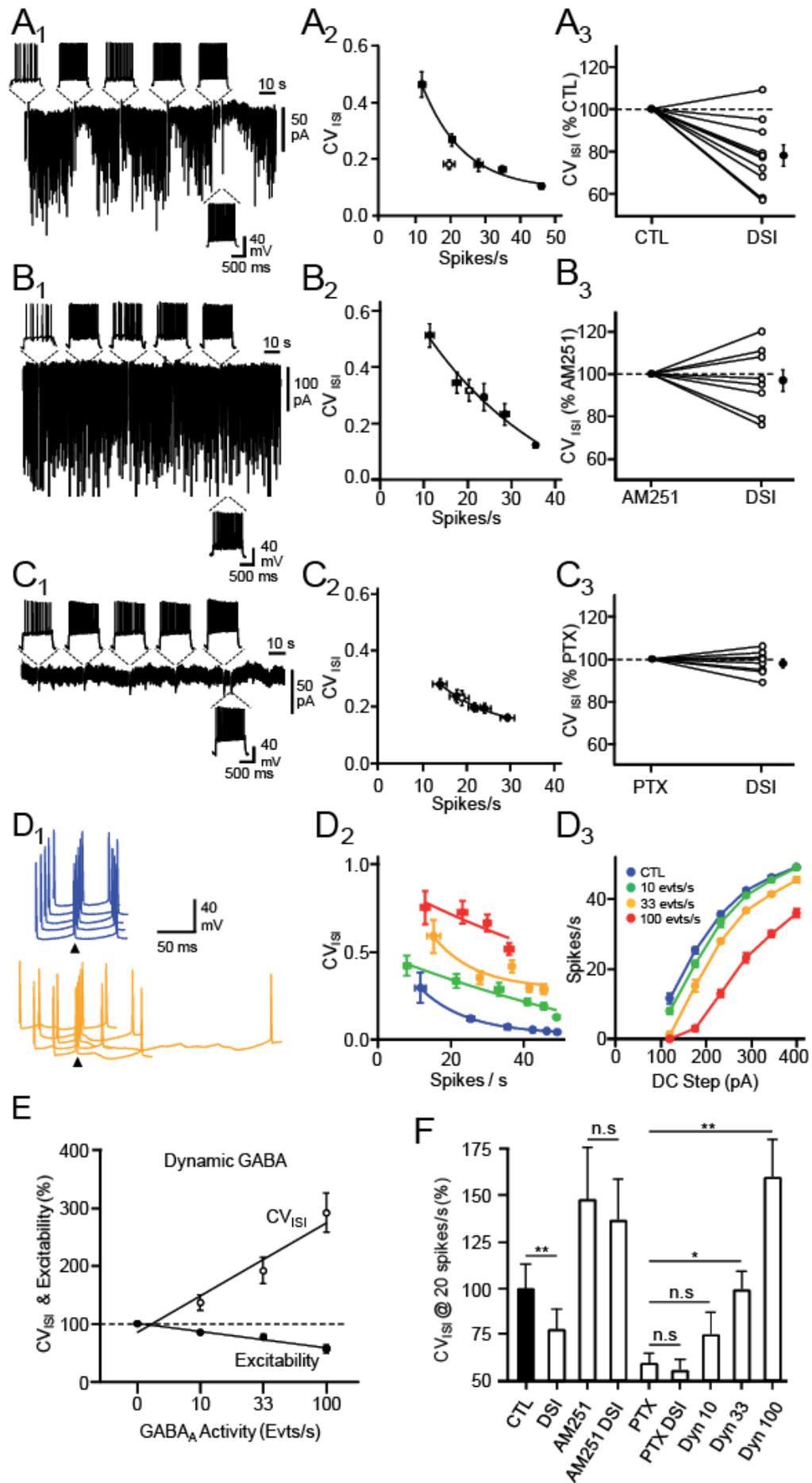


Fig. R8. Les endocannabinoïdes modulent la précision temporelle de la décharge neuronale.

A1, Enregistrements électrophysiologiques en mode voltage-imposé de l'activité spontanée GABAergique interrompues par des passages transitoires en mode courant-imposé (toutes les 30s) où des créneaux de courant dépolarisant continu de 1s sont réalisés dans le but de faire émettre au neurone enregistré une décharge de PAs à différentes fréquences. La dernière stimulation est réalisée 4s après la précédente (5^{ème}) dans le but d'évaluer la précision temporelle durant la DSI. **A2**, Analyse du coefficient de variation de l'intervalle inter-spike (CV_{ISI}) en fonction de la fréquence de décharge du neurone pyramidal en condition contrôle (noir) et durant la DSI (blanc). **A3**, Résumé des changements de CV_{ISI} pour une fréquence de décharge donnée pendant la DSI par rapport au CV_{ISI} normalisé en condition contrôle pour la même fréquence de décharge (n=10). **B**, Mêmes expériences qu'en A mais en présence d'un antagoniste des récepteurs CB1, l'AM251 en extracellulaire (5 μ M, n=8). **C**, Mêmes expériences qu'en A mais en présence d'un antagoniste des récepteurs GABA_A, la PTX en extracellulaire (100 μ M, n=8). **D1**, Fluctuations du potentiel de membrane (à gauche) en réponse à un créneau de courant dépolarisant continu (150pA, 1s) en présence de PTX (100 μ M) en contrôle (bleu) et quand des conductances spontanées GABAergiques dynamiques sont injectées à une fréquence de 33 évènement par seconde (orange). A droite un zoom de la fluctuation de membrane entre le 4^{ème} et le 6^{ème} PA avec comme référence le 5^{ème} PA. **D2**, CV_{ISI} en fonction de la fréquence de décharge et **D3**, Fréquence de décharge en fonction du créneau de courant dépolarisant continu appliqué en condition contrôle sans activité GABA dynamique (bleu), en présence d'une activité GABAergique dynamique de 10 évènements/s (vert), 33 évènements/s (orange), et 100 évènements/s (rouge). **E**, Changement de l'excitabilité (noir) et du CV_{ISI} (blanc) quand les neurones reçoivent différentes fréquences d'activité GABAergique dynamique. **F**, Résumé des changements de CV_{ISI} pour une fréquence de décharge moyenne d'environ 20Hz en condition contrôle (CTL, n=10), après DSI, en présence d'AM251 (5 μ M, n=8) avant et après une fréquence de décharge soutenue, en présence de PTX (100 μ M, n=8) avant et après une fréquence de décharge soutenue, et en présence de PTX et d'activité GABAergique dynamique (Dyn, n=5) à 10, 33 et 100 évènements par seconde.

la dépolarisation, n=4), alors qu'en présence de RHC-80267 (50 μ M) appliqué en extracellulaire, il n'y a toujours pas de blocage de la DSI (22.8 \pm 10.9% de l'activité GABAergique contrôle après la dépolarisation, n=2). L'ensemble de ces résultats montrent qu'en fonction de l'inhibiteur de la DGL choisi, que ce soit en intracellulaire ou extracellulaire, on peut observer (par le THL) ou non (par le RHC-80267) un blocage de la DSI. Avec les expériences menées avec le THL, nos résultats suggèrent donc que l'endocannabinoïde synthétisé lors de l'induction de la DSI serait le 2-AG. Si le 2-AG est bel et bien l'endocannabinoïde responsable de la DSI, alors les résultats obtenus avec le RHC-80267 soulèvent quelques doutes quant à la spécificité d'action de cet agent pharmacologique comme inhibiteur de la DGL.

2.3 Modulation de la fidélité temporelle de décharge neuronale par les endocannabinoïdes

Après avoir démontré le rôle des endocannabinoïdes dans cette baisse transitoire de l'activité GABAergique spontanée, nous avons voulu déterminer les conséquences que cela pouvait avoir sur la fidélité temporelle de la décharge des neurones pyramidaux de la région CA1 de l'hippocampe. Dans la série d'expériences suivantes, nous avons évoqué, par des créneaux de courant dépolarisant de 1s, des décharges de PAs à différentes fréquences toutes les 30s pour que chaque décharge soit évoquée en présence d'une activité GABAergique spontanée soutenue (**Fig. R8A₁**). La 5^{ème} décharge, la plus soutenue, avait pour rôle d'induire la DSI de manière certaine, et une décharge suivante (6^{ème} décharge) était ensuite réalisée 5 secondes après la décharge soutenue dans le but de quantifier la fidélité temporelle de la décharge neuronale pendant une période de DSI, c'est à dire lorsque l'activité spontanée GABAergique est fortement réduite. Après avoir répété cette séquence plusieurs fois (4 à 7 fois), nous étions en mesure de quantifier la fidélité temporelle de la décharge en calculant le coefficient de variation de l'intervalle inter-spike (CV_{ISI}) de chaque décharge. L'analyse du CV_{ISI} sur les 5 premières décharges (faites en présence d'activité GABAergique) montre que le CV_{ISI} diminue en fonction de la fréquence de décharge (**Fig. R8A₂**). Cependant, si on mesure le CV_{ISI} de la 6^{ème} décharge, celle réalisée pendant la DSI et donc en présence d'une activité GABAergique réduite, on remarque que le CV_{ISI} est plus faible (environ 20%) que le CV_{ISI} interpolé pour une fréquence de décharge contrôle comparable en présence d'une activité GABAergique soutenue (**Fig. R8A₃**, $78.2 \pm 5.1\%$ du CV_{ISI} contrôle pour une décharge équivalente, $n=10$, $p<0.01$).

Afin de vérifier si le système des endocannabinoïdes est bien impliqué dans cette modulation de la fidélité temporelle de la décharge, nous avons reproduit les mêmes séquences que précédemment mais en présence cette fois-ci de l'antagoniste des récepteurs CB1, l'AM251 (5 μ M), appliqué en extracellulaire (**Fig. R8B**). Dans cette condition, les premières observations furent une augmentation moyenne d'environ 150% de l'activité GABAergique spontanée reçu par les neurones pyramidaux enregistrés (**Fig. R8B₁**), suggérant qu'une libération tonique d'endocannabinoïdes contrôle la libération de GABA à l'état basal. Pour ce qui est de la fidélité temporelle de la décharge, l'analyse du CV_{ISI} de la 6^{ème} stimulation faite quelques secondes après une décharge soutenue qui ne produit pas de DSI (car présence d'AM251) ne montre pas de variation significative par rapport au CV_{ISI}

interpolé pour une fréquence de décharge contrôle comparable (**Fig. R8B₂ et 8B₃**, $107.3 \pm 5.4\%$ du CV_{ISI} mesuré en AM251, $n=8$, $p=0.2$).

Enfin pour vérifier que le faible niveau d'activité GABAergique reçu pendant la DSI est bien le facteur responsable de l'amélioration de la fidélité temporelle et non la décharge soutenue utilisée pour induire la DSI, nous avons reproduit l'expérience en présence d'un antagoniste des récepteur GABA_A, la picrotoxine (PTX, 100 μ M). Par rapport à la condition contrôle (sans PTX) le CV_{ISI} était diminué d'environ 40% ($57.3 \pm 5.3\%$ du CV_{ISI} mesuré en condition contrôle pour une décharge de 20Hz, **Fig. R8H**) Dans cette condition l'activité GABAergique est supprimée et il n'y a aucune variation significative du CV_{ISI} de la 6^{ème} stimulation faite quelques secondes après la décharge soutenue nécessaire à l'induction de la DSI en condition contrôle (**Fig. R8C₃**, $98.2 \pm 1.9\%$ du CV_{ISI} mesuré en PTX, $n=8$, $p=0.5$).

L'ensemble de ces résultats suggère donc que la fidélité temporelle de la décharge neuronale est définie par le niveau d'activité GABAergique que reçoivent les neurones pyramidaux, et qu'une modulation par les endocannabinoïdes diminuant cette activité inhibitrice spontanée peut être à l'origine d'une amélioration de la fidélité temporelle.

Cette interprétation est confirmée par des expériences de courant imposé dynamique dont le but est de vérifier que différent niveau d'activité GABAergique affecte de manière croissante la fidélité temporelle de la décharge (**Fig. R8D**). Pour cela, nous avons injecté au neurone une activité spontanée GABAergique dynamique à différentes fréquences (0 événements/s à 100 événements /s) et ce en présence de kynurénate (2mM) et de PTX (100 μ M) afin d'isoler le neurone de toute activité synaptique endogène. En effet, de manière visuelle, on peut voir assez facilement qu'une activité GABAergique à 33 événements par seconde va perturber la reproductibilité d'une décharge neuronale suite à l'application d'un même courant dépolarisant par rapport à la condition contrôle sans activité GABAergique injectée (**Fig. R8D₁**). De manière plus générale, le CV_{ISI} à différentes fréquences de décharge augmente lorsque la fréquence des événements spontanés GABA_A augmente, confirmant alors le rôle perturbateur de la fidélité temporelle de la décharge qu'à l'activité GABAergique spontanée (**Fig. R8D₂**). Ces expériences de courant imposé dynamique ont aussi montré que le niveau d'activité GABAergique pouvait déterminer à la fois l'excitabilité (nombre de PAs émis pour une stimulation donné) et la fidélité temporelle de la décharge, mais que cette dernière était affectée de manière plus importante que l'excitabilité (**Fig. R8E**).

Pour finir, nous avons donc aussi vérifié si la DSI pouvait améliorer l'excitabilité et la fidélité temporelle dans des conditions plus physiologiques (**Fig. R9**) que précédemment, à savoir avec un GABA hyperpolarisant en utilisant une solution intracellulaire pauvre en ions

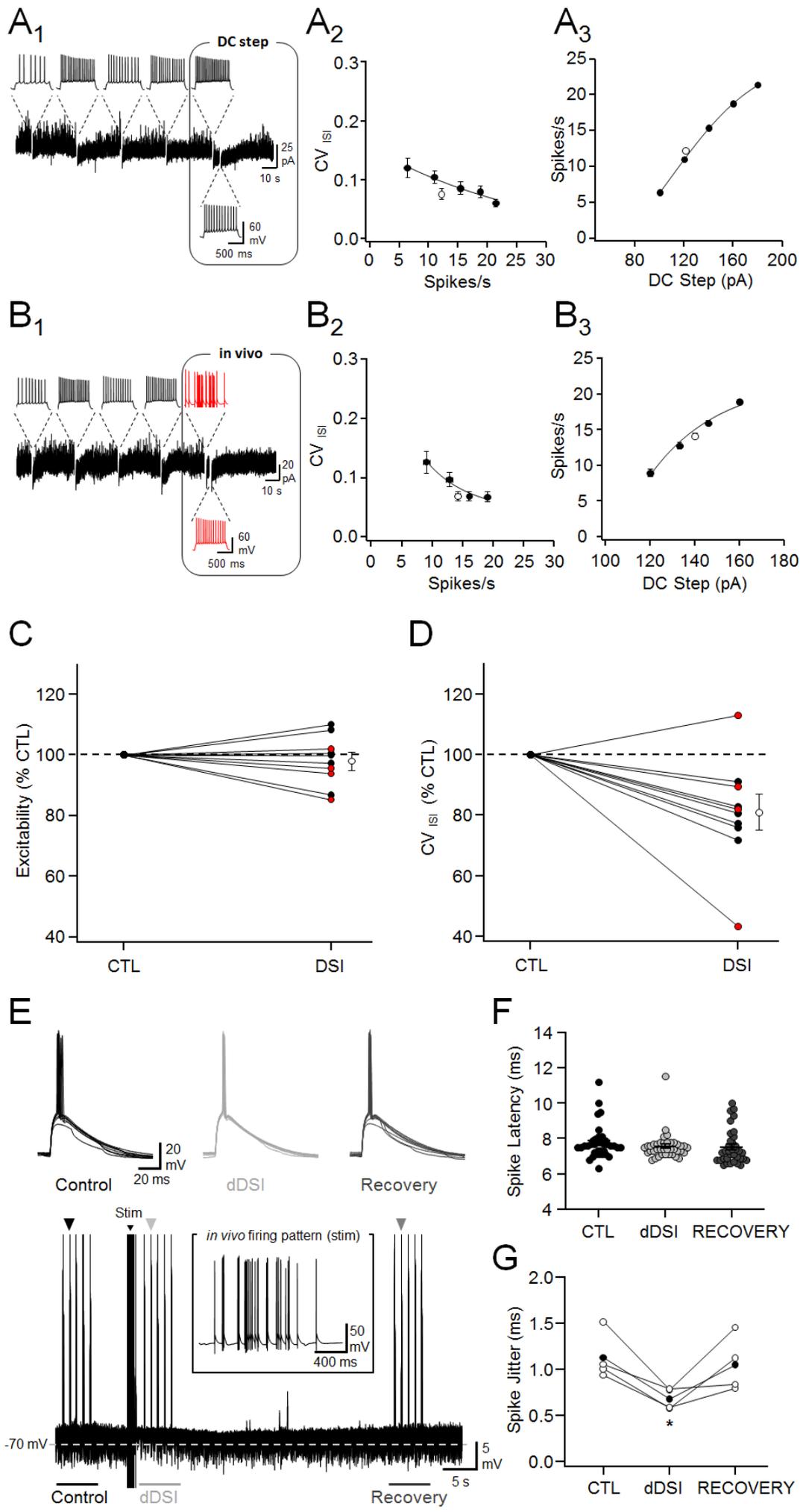


Fig. R9. La décharge des cellules pyramidales contrôle la précision temporelle dans les neurones pyramidaux de CA1.

A1, Enregistrements électrophysiologiques en mode voltage-imposé de l'activité spontanée GABAergique interrompues par des passages transitoires en mode courant-imposé (toutes les 30s) où des créneaux de courant dépolarisant continu de 1s sont réalisées dans le but de faire émettre au neurone enregistré une décharge de PAs à différentes fréquences. La dernière stimulation est réalisée 4s après la précédente (5^{ème}) dans le but d'évaluer la précision temporelle durant la DSI. **A2**, Fréquence de décharge en fonction du créneau de courant dépolarisant en continu injecté au neurone pyramidal montré en A1, en condition contrôle (noir) et durant la DSI (blanc). **A3**, Analyse du coefficient de variation de l'intervalle inter-spike (CV_{ISI}) en fonction de la fréquence de décharge du neurone pyramidal en condition contrôle (noir) et durant la DSI (blanc). **B**, Mêmes expériences qu'en A mais la stimulation durant la DSI est faite 4s après une induction de la DSI réalisée à l'aide de patron de décharge *in vivo*. **C**, Changements normalisés dans l'excitabilité observée durant la DSI (n=6). **D**, Changements normalisés dans le CV_{ISI} observée durant la DSI. Le CV_{ISI} contrôle a été interpolé à la fréquence de décharge de la stimulation faite pendant la DSI (n=6). **E**, Superpositions de 5 fluctuations membranaires en réponse à une conductance excitatrice (EPSP) et en présence d'activité spontanée GABAergique dynamique, en condition contrôle, durant la DSI, et quand le neurone récupère une certaine quantité d'activité GABAergique quelques dizaines de seconde après l'induction de la DSI (recovery) induite par un patron de décharge *in vivo*. La trace du bas représente les fluctuations membranaires au cours du temps quand la cellule reçoit des entrées dynamiques GABAergique. **F**, Latence de couplage EPSP-Spike de la cellule montré en F, en condition contrôle, durant la DSI et pendant la recovery. **G**, Jitter du couplage EPSP-Spike mesuré dans différentes cellules ayant subi le même protocole montré en F (n=4). Les cercles pleins (noir) représentent la moyenne des cellules.

chlorures ($E_{GABA} \approx -74mV$). Que ce soit avec une DSI induite par une décharge réalisée avec un créneau de courant dépolarisant (**Fig. R9A**) ou réalisée en mimant une patron de décharge d'une cellule de lieu (**Fig. R9B**) comme dans la figure R5 et R6, les résultats montrent une diminution significative du CV_{ISI} d'environ 20% (**Fig. R9E**, $80.7 \pm 5.5\%$ du CV_{ISI} contrôle, n=10, $p < 0.05$) mais sans changement d'excitabilité (**Fig. R9D**, $98.0 \pm 2.6\%$ de l'excitabilité contrôle, n=10, $p = 0.224$).

2.4 Modulation du couplage EPSP-Spike par la DSI

Dans les séries d'expériences qui vont suivre, nous nous sommes intéressés à la modulation du couplage entre un EPSP et sa conséquence au niveau de la genèse d'un potentiel d'action : le couplage EPSP-Spike qui est un phénomène synaptique plus physiologique que la simple décharge de PAs induite par l'application de créneau de courant dépolarisant comme dans les expériences précédentes. L'indice de fidélité quantifié sera alors le jitter (en ms) et non plus le CV_{ISI} . Toujours en présence de kynurénate et de PTX, nous

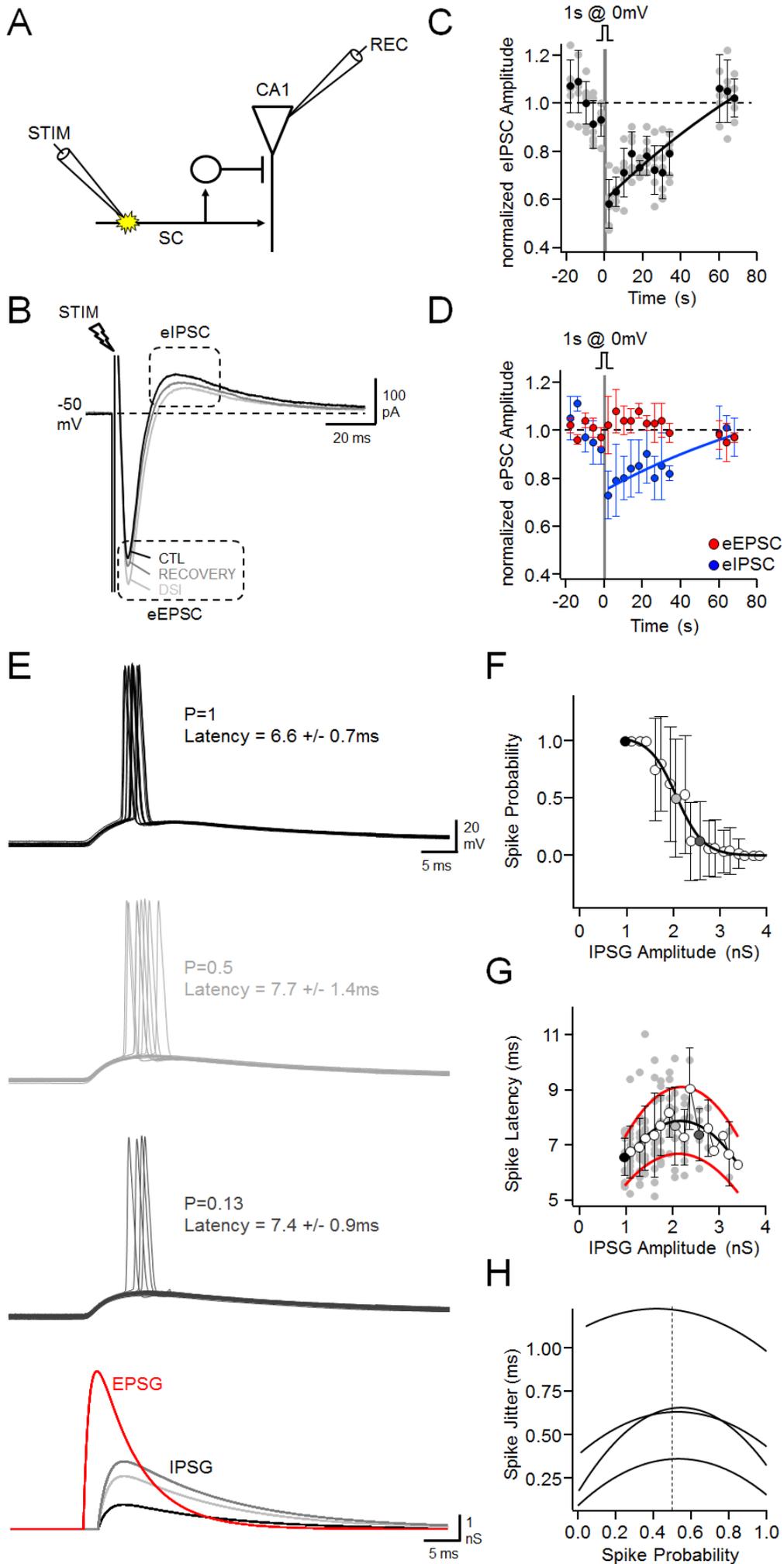


Fig. R10. Modulation bi-phasique de la précision temporelle du couplage EPSP-Spike par la feed-forward inhibition.

A, Schéma expérimental de la configuration d'enregistrement et de stimulation pour évoquer la feed-forward inhibition dans un neurone pyramidal de la région CA1. **B**, Superposition des traces de courant en mode voltage-imposé pendant la stimulation des collatérales de Schaffer 1s avant la dépolarisation neuronale (0mV pendant 1s), et 1 et 30s après. **C**, Fluctuations de l'IPSC évoqué (eIPSC) au cours du temps avant et après le protocole d'induction de la DSI. A noter que les cercles gris représentent les séquences d'acquisitions indépendamment, et les cercles noirs la moyenne des séquences d'acquisition de la cellule montré en B. **D**, Analyse des fluctuations normalisées à la fois de l'eEPSC (rouge) et de l'eIPSC (bleu) sur l'ensemble des cellules (n=4) avant et après le protocole d'induction de la DSI. **E**, De haut en bas, superpositions de fluctuations membranaire en réponse à un EPSG (6,25nS) suivi 2ms après par un IPSP à différentes amplitudes (noir, 1nS ; gris clair, 2nS ; gris foncé, 2,5nS). Les fluctuations membranaires avec l'échec dans l'émission de PA sont également montrées. **F**, Probabilité du couplage EPSP-Spike en fonction de l'amplitude de l'IPSP feed-forward. Les cercles noirs, gris clair et gris foncé correspondent aux probabilités mesurées pour les 3 des conditions présentées en E. **G**, Latence du couplage EPSP-Spike en fonction de l'amplitude de l'IPSP feed-forward. **H**, Jitter du couplage EPSP-Spike en fonction de la probabilité du couplage EPSP-Spike dans différentes cellules (n=4).

avons injecté au neurone une série d'EPSP dynamiques en présence d'une activité GABAergique dynamique (E_{GABA} dynamique = -75mV) à une fréquence de 30 évènements/sec (**Fig. R9E**). La DSI était également induite de façon dynamique (dDSI) en baissant le niveau d'activité GABAergique dynamique envoyé au neurone à 10% de l'activité GABAergique dynamique initiale (contrôle), puis remonté à 80% après quelques dizaines de secondes (recovery) selon une cinétique de récupération exponentielle avec une constante de temps de 30s. Les résultats montrent que pendant la DSI dynamique (dDSI) le temps de latence dans le couplage EPSP-Spike ne change pas de manière significative (**Fig. R9F et G**, $92.4 \pm 1.1\%$ de la latence en condition contrôle, n=4, p=0.171) contrairement au jitter qui diminue de manière significative (**Fig. R9F et G**, $61.3 \pm 5.0\%$ du jitter en condition contrôle, n=4, p<0.05).

L'ensemble de ces résultats montre que l'activité spontanée GABAergique affecte la fidélité temporelle du couplage EPSP-Spike et qu'une modulation de cette activité spontanée GABAergique par les endocannabinoïdes responsable du phénomène de DSI peut être à l'origine d'une amélioration de la précision temporelle du potentiel d'action émis par les neurones pyramidaux de la région CA1 de l'hippocampe.

2.5 La Feed-Forward inhibition affecte le couplage EPSP-Spike d'une manière bi-phasique

D'après les travaux du groupe de Scanziani, la feed-forward inhibition est nécessaire pour renforcer la précision temporelle du couplage EPSP-Spike en réduisant la fenêtre de temps avec laquelle un PA peut être émis (Pouille and Scanziani, 2001). D'autre part la feed-forward inhibition est partiellement exercée par des neurones CB1+ (Glickfeld and Scanziani, 2006).

Jusqu'à présent, nos résultats portant sur l'activité GABAergique spontanée, c'est à dire non corrélée dans le temps avec l'entrée synaptique excitatrice qu'est l'EPSP, montrent que la réduction de cette activité spontanée GABAergique permet d'améliorer le couplage EPSP-Spike en termes de précision temporelle. Nous avons donc étudié dans un premier temps la feed-forward inhibition exprimait une DSI et dans un second temps la conséquence fonctionnelle que celle-ci pouvait avoir sur la précision temporelle du couplage EPSP-Spike. Pour cela, nous avons placé une électrode de stimulation dans le stratum radiatum à environ 200-400 μ m du neurone pyramidal enregistré, dans le but de générer une séquence EPSP-IPSP caractéristique de la feed-forward inhibition (**Fig. R10A**). Notre enregistrement en voltage-imposé consistait à faire des stimulations évoqués toutes les 4 secondes et de faire ensuite un protocole de DSI classique (dépolarisation à 0mV pendant 1s) afin de quantifier des variations de l'EPSP mono-synaptique (eEPSP) et de l'IPSP di-synaptique (eIPSP) résultant de la feed-forward inhibition (**Fig. R10B**). La dépolarisation à 0mV réduit l'IPSP di-synaptique de manière significative (**Fig. R10C**) dans les 5 secondes suivant la dépolarisation neuronale (**Fig. R10D**, $75.9 \pm 2.2\%$ de l'amplitude de l'IPSP précédent la dépolarisation, $n=4$, $p < 0.05$), alors que l'amplitude de l'EPSP reste inchangée (**Fig. R10D**, $104.8 \pm 6.2\%$, $n=4$, $p=0.34$).

Comme nos résultats ne montrent pas de variation de l'EPSP, nous avons ensuite travaillé avec des séquences EPSP-IPSP dynamique injecté dans un neurone pyramidal enregistré *in vitro*, où uniquement l'amplitude de l'IPSP di-synaptique était modulé. Le but des expériences était de quantifier les effets de changements d'un IPSP di-synaptique sur les paramètres de couplage EPSP/spike. La séquence EPSP-IPSP injectée respectait les temps de latence de l'IPSP di-synaptique par rapport à l'EPSP mono-synaptique, à savoir un délai de 2ms comme dans l'étude de Pouille et Scanziani (**Fig. R10E**). Avec un EPSP constant, l'augmentation de l'IPSP di-synaptique réduit la probabilité du couplage EPSP-Spike (**Fig. R10E et F**). Cependant, il apparaît un effet bi-phasique concernant la latence avec laquelle le PA est émis (**Fig. R10G**). Nous avons remarqué que cet effet bi-phasique se retrouvait sur

l'ensemble des neurones ayant subi ces protocoles (**Fig. R10H**). En effet, lorsque l'IPSP di-synaptique est de faible amplitude, il affecte peu la probabilité du couplage EPSP-Spike et la précision avec laquelle le PA est émis est forte. Lorsque l'IPSP di-synaptique est de plus grande amplitude, celui-ci commence à affecter la probabilité de couplage EPSP-Spike et montre une perturbation de la fidélité temporelle maximale pour un couplage EPSP-Spike de 0.5 (**Fig. R10H**, 0.50 ± 0.06 , $n=4$). A partir d'un couplage EPSP-Spike de 0.5 et si l'amplitude de l'IPSP di-synaptique augmente encore, le couplage EPSP-Spike va encore diminuer mais il sera associé à une amélioration de la fidélité temporelle de la décharge (**Fig. R10G et H**).

Ces résultats montrent que contrairement à l'inhibition spontanée dite « non corrélée » dans le temps avec l'EPSP, qui perturbe la précision temporelle du couplage EPSP-Spike, la feed-forward inhibition dite « corrélée » dans le temps, va elle voir un effet améliorateur ou perturbateur de la précision temporelle du couplage EPSP-Spike en fonction de la probabilité du couplage initial entre l'EPSP et l'émission de potentiel d'action.

2.6 Contribution théorique de l'activité spontanée inhibitrice et la feed-forward inhibition sur la modulation de la fidélité temporelle du couplage EPSP-Spike

Dans le but d'évaluer la contribution relative des deux sources d'inhibition que sont l'activité spontanée d'une part et la feed-forward inhibition d'autre part dans la précision temporelle du couplage EPSP-Spike, nous avons fait des simulations à l'aide d'un modèle simple "Leaky Integrate and Fire" avec un seuil d'émission de potentiel d'action aléatoire (RT-LIF, Caillard, 2011). Dans une première série de stimulations, le modèle reçoit une gamme de conductances excitatrices (EPSPGs) de différentes amplitudes (0 à 100nS), combiné ou non avec des patrons de conductances inhibitrices spontanées (SP-IPSPGs) dans une gamme allant de 0 à 250 événements par seconde (**Fig. R11A-D**). En absence d'inhibition spontanée, seule l'amplitude de l'EPSPG va déterminer à la fois la probabilité du couplage EPSP-Spike et sa précision temporelle. Quand l'inhibition spontanée est couplée à un EPSPG constant, la latence du potentiel d'action et sa variabilité associée, le jitter (SD de la latence), augmentent et ce de manière proportionnelle à la fréquence des SP-IPSPGs. Dans une seconde série de simulations, la même gamme d'EPSPGs est couplée cette fois-ci avec de l'inhibition feed-forward (FF-IPSPGs), c'est à dire corrélée dans le temps avec un délai de 2ms après le début de l'EPSPG, et dans une gamme d'amplitude allant de 0 à 100nS (**Fig. R11E-H**). Dans ce cas-là,

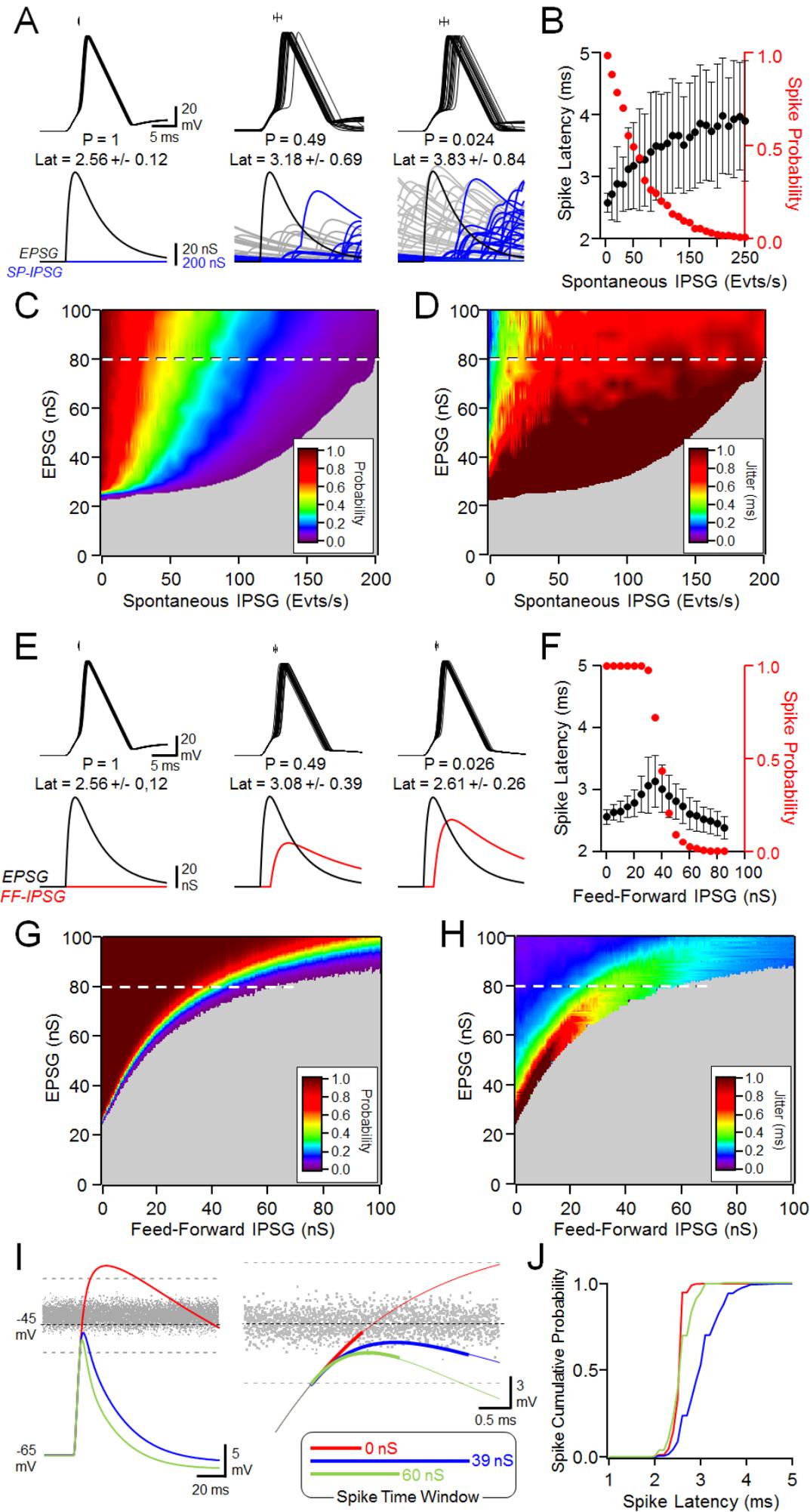


Fig. R11. Simulation de la modulation du couplage EPSP-Spike par l'activité spontanée et la feed-forward inhibition.

A, De gauche à droite, superpositions de 25 fluctuations membranaires en réponse à un EPSP constant (80nS) et en absence d'activité spontanée GABAergique, ou en présence d'activité spontanée GABAergique à 50 et 200 événements/s. Pour chaque groupe de trace est représenté la probabilité du couplage ainsi que la latence moyenne et son jitter associé. **B**, Probabilité (rouge) et latence \pm jitter (noir) du couplage EPSP-Spike en fonction de la fréquence des événements GABA_A spontanées (n=250). **C**, Probabilité du couplage EPSP-Spike (en couleur) pour un EPSP donné et une fréquence d'activité spontanée donnée. **D**, Jitter du couplage EPSP-Spike (en couleur) pour un EPSP donné et une fréquence d'activité spontanée donnée. Les lignes en pointillés correspondent à la simulation montrée en **A**. **E, F, G, H**, Mêmes simulations qu'en **A, B, C** et **D** sauf que l'activité GABAergique mise en jeu est cette fois-ci la feed-forward inhibition intervenant avec un délai de 2ms après l'EPSP. **I**, Fluctuations membranaires du neurone simulé en réponse à un EPSP constant (80nS) et en absence (rouge) ou présence d'un IPSP feed-forward de 39nS (bleu) ou 60nS (vert). En gris est représenté le seuil d'émission de PA fluctuant (1mV de bruit sur le seuil d'émission des PAs). L'émission du PA a été annulée pour pouvoir observer les cinétiques du potentiel de membrane dans chaque condition et pour pouvoir quantifier la fenêtre de temps théorique pendant laquelle un PA pourrait être émis. **J**, Histogramme cumulatif pour le délai d'un PA dans les 3 conditions décrites en **I**.

on retrouve les mêmes résultats que dans les expériences *in vitro* faites précédemment (**Fig. R11**). En effet, pour un EPSP donné (80nS), la latence et le jitter du couplage EPSP-Spike augmente pour une probabilité de couplage allant de 1 à 0.5 quand l'amplitude du FF-IPSP augmente. A partir de 0.5, et si l'amplitude du FF-IPSP augmente encore, on a alors l'effet inverse avec une réduction de la latence mais aussi du jitter associé (**Fig. R11E et F**).

Pour identifier les mécanismes responsables de cette modulation bi-phasique de la précision temporelle dans le couplage EPSP-Spike par la feed-forward inhibition, nous avons déterminé comment cette feed-forward inhibition affecte la cinétique de l'EPSP, et corréler ces paramètres avec la précision du couplage EPSP-Spike. Dans cette série de simulation, l'initiation du potentiel d'action est désactivée dans le but de visualiser la cinétique de la séquence EPSP-IPSP autour du seuil d'émission des potentiels d'action (**Fig. R11I**). En absence de feed-forward inhibition (trace rouge), l'EPSP théorique traverse le seuil d'émission des PAs assez rapidement, ce qui donne une latence et un jitter du couplage EPSP-Spike assez faible (**Fig. R11E et I**). Lorsque la feed-forward est présente (**Fig. R11I**, 39nS, trace bleu), l'amplitude de l'EPSP théorique est réduite ainsi que son temps de montée qui est ralenti, et le potentiel de membrane flirte donc plus longtemps avec le seuil d'émission des PAs, augmentant alors la fenêtre de temps avec laquelle un potentiel d'action peut être émis. Si la feed-forward est encore plus importante (**Fig. R11I**, 60nS, trace verte), la probabilité du

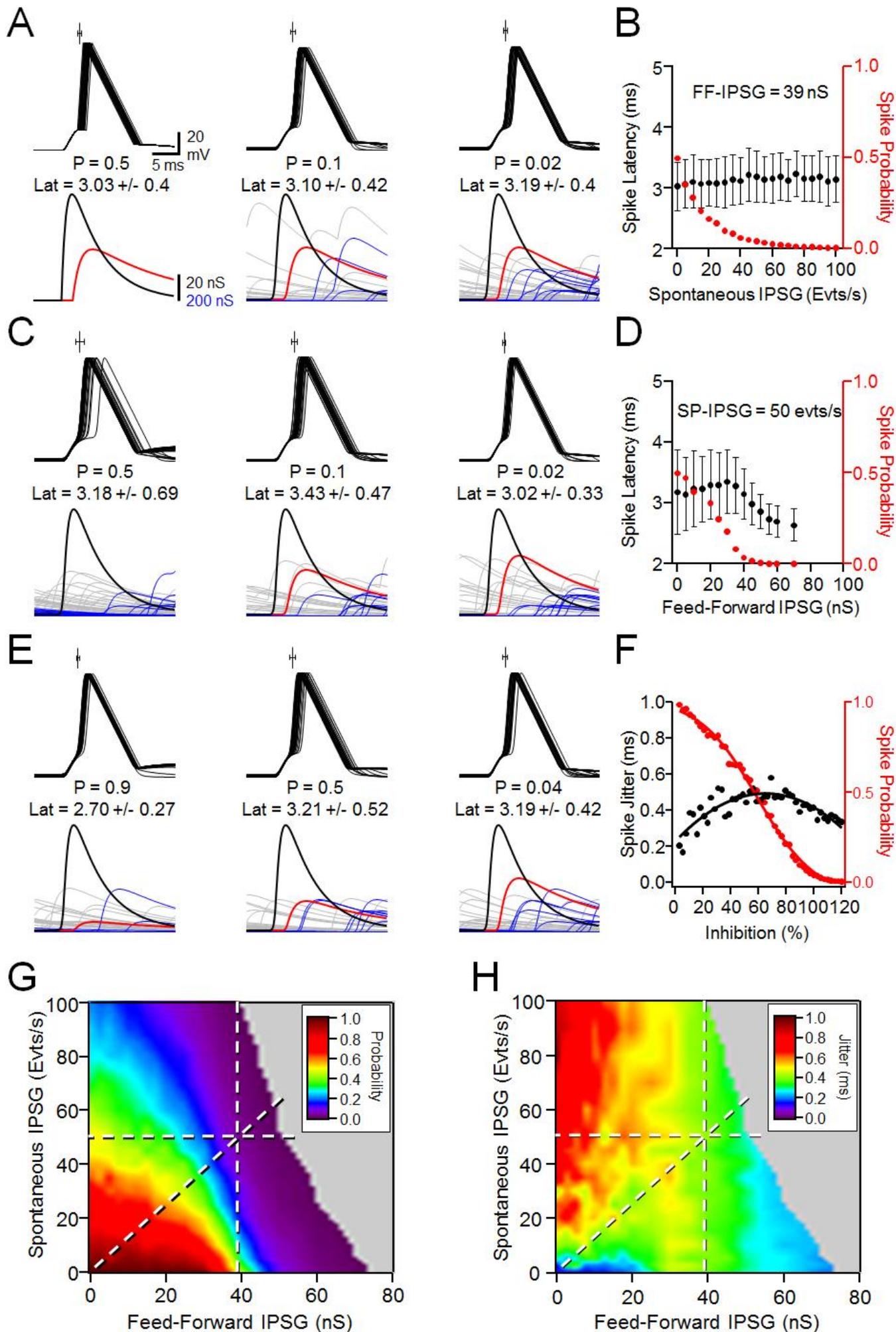


Fig. R12. Simulation de la modulation du couplage EPSP-Spike par l'activité spontanée et la feed-forward inhibition.

A, De gauche à droite, superpositions de 25 fluctuations membranaires en présence d'une activité feed-forward (FF-IPSG) de 39nS et d'une activité spontanée GABAergique (SP-IPSG) à différentes fréquences (0-30-65 événements/s). L'amplitude de l'EPSP est de 80nS. Seulement les traces où le potentiel d'action fut émis avec succès sont montrées. Pour chaque groupe de trace est représenté la probabilité du couplage ainsi que la latence moyenne et son jitter associé. L'EPSP est en coloré en noir, le FF-IPSG en rouge, le SP-IPSG en bleu ou gris pour les cas où il y a eu émission d'un PA ou non, respectivement. **B**, Probabilité (rouge) et latence \pm jitter (noir) du couplage EPSP-Spike en fonction de la fréquence des événements GABA_A spontanées avec un FF-IPSG constant de 39nS (n=250). **C**, Même condition qu'en A mais cette fois-ci en présence d'une activité spontanée GABAergique constante (SP-IPSG = 50evts/s) et une feed-forward inhibition à différentes amplitudes (0-34-44nS). **D**, Probabilité (rouge) et latence \pm jitter (noir) du couplage EPSP-Spike en fonction de l'amplitude de la feed-forward inhibition avec un SP-IPSG constant de 50 événements/s (n=250). **E**, Même condition qu'en A mais le modèle reçoit cette fois des fréquences de SP-IPSG et des amplitudes de FF-IPSG avec un ratio constant (7.7evts/s et 6nS ; 28.2evts/s et 22nS ; 50evts/s et 39nS pour les SP-IPSG et FF-IPSG respectivement). **F**, Probabilité (rouge) et latence \pm jitter (noir) du couplage EPSP-Spike en fonction du pourcentage d'inhibition. 100% d'inhibition est atteint quand la fréquence des SP-IPSGs et l'amplitude du FF-IPSG sont respectivement de 50evts/s et 39nS. SP-IPSG et FF-IPSG sont changés dans des proportions similaires de 0 à 120% du contrôle. **G**, Probabilité du couplage EPSP-Spike (en couleur) pour une fréquence de SP-IPSG donnée et une amplitude de FF-IPSG donnée. **H**, Jitter du couplage EPSP-Spike (en couleur) pour une fréquence de SP-IPSG donnée et une amplitude de FF-IPSG donnée. La ligne verticale correspond à la simulation présentée en A et B ; La ligne horizontale correspond à la simulation présentée en C et D ; La ligne diagonale correspond à la simulation présentée en E et F.

couplage EPSP-Spike diminue fortement (0.03) en raison de l'amplitude de l'EPSP qui est tronquée par l'IPSP. De plus la rapide repolarisation du potentiel de membrane réduit la fenêtre de temps avec laquelle le potentiel de membrane sera aux alentours du seuil d'émission des PAs. Au final, les PAs seront rarement émis mais avec une bonne précision temporelle puisque la fenêtre de temps pendant laquelle ils peuvent être émis est fortement réduite.

Finalement, nous avons déterminé comment la présence simultanée de l'activité inhibitrice spontanée et feed-forward affectait le couplage EPSP-Spike en travaillant avec un EPSP constant (80nS). Dans la première simulation, nous avons testé une gamme de conductance spontanée (SP-IPSGs, 0 à 100 événements/sec) avec une conductance feed-forward constante de 39nS. Partant avec ces paramètres constants (EPSP 80nS et FF-IPSG 39nS) d'une probabilité de couplage de 0.5 et d'une latence de 3.03 ± 0.40 ms, l'augmentation croissante de l'activité spontanée réduit la probabilité de couplage mais n'a aucun effet significatif sur la latence ou le jitter du couplage EPSP-Spike (**Fig. R12A et B**). Dans une

seconde série de simulation, nous avons travaillé cette fois-ci avec une activité spontanée constante de 50 évènements/s et une gamme de FF-IPSG allant de 0 à 70nS. Avec ces nouveaux paramètres constants, la probabilité du couplage était sensiblement la même que précédemment, à savoir 0.5, et la latence de 3.18 ± 0.69 ms. Dans cette configuration, l'augmentation de la feed-forward inhibition réduit logiquement la probabilité du couplage EPSP-Spike et réduit également la latence et le jitter (**Fig. R12C et D**). Cependant, contrairement à la simulation réalisée sans la présence de l'activité spontanée constante (**Fig. R11F**), la feed-forward inhibition ne provoque qu'une amélioration de la précision temporelle du couplage EPSP-Spike car la modulation bi-phasique n'est plus observée. Pour finir, avec la présence simultanée d'une feed-forward inhibition de 39nS et d'une activité spontanée inhibitrice de 50 évènements/sec, la probabilité du couplage chute à 0.04. En réduisant à la fois les deux types d'inhibition (spontanée et feed-forward) tout en préservant leur relative contribution (ratio SP-IPSG/FF-IPSG constant), la probabilité du couplage EPSP-Spike augmente et la précision temporelle (jitter) est modulée de manière bi-phasique (**Fig. R12E et F**). Partant d'une probabilité de couplage proche de zéro obtenue pour un tonus inhibiteur maximal (120%), la réduction des deux types d'inhibition augmente à la fois la latence et le jitter du couplage EPSP-Spike jusqu'à une probabilité de couplage de 0.5 où la précision temporelle est la plus mauvaise (jitter = 0.52ms). Une réduction supplémentaire des deux types d'inhibition est ensuite associée ensuite à une diminution de la latence et du jitter. L'ensemble de ces simulations montrent que la modulation de la précision temporelle du couplage EPSP-Spike dépend de la contribution relative de différents types d'inhibition : la feed-forward inhibition impose une modulation bi-phasique de la précision temporelle du couplage EPSP-Spike, à moins que l'inhibition spontanée soit suffisamment importante pour empêcher cette modulation bi-phasique (**Fig. R12G et H**).

DISCUSSION

Dans cette étude, nous avons montré que les cellules de lieu de la région CA1 de l'hippocampe sont capables de réguler par leur décharge neuronale l'activité GABAergique spontanée qu'elles reçoivent via un rétrocontrôle médié par les endocannabinoïdes. En conséquence les cellules de lieu sont capables de réguler leur propre excitabilité intrinsèque mais aussi la précision temporelle avec laquelle elles émettent des potentiels d'action. Les patrons de décharge des cellules de lieu enregistrés *in vivo* lors d'une exploration spatiale de l'animal peuvent se montrer en effet suffisants pour induire le phénomène de DSI *in vitro*.

1. Phénomène de DSI et processus de mémorisation spatiale

La DSI représente la forme de plasticité à court-terme la plus étudiée mais sa signification fonctionnelle et sa réelle existence *in vivo* reste à démontrer. Dans la présente étude, nous avons réussi à induire la DSI *in vitro* avec des patrons de décharge de cellules de lieu de la région CA1 de l'hippocampe enregistrés lors d'explorations spatiales où l'animal devait retrouver de la nourriture à différents endroits d'une arène (Dupret et al., 2010). Des niveaux élevés d'endocannabinoïdes, suite à une délétion génétique de l'enzyme de dégradation de l'anandamide, la FAAH, sont à l'origine d'une amélioration des performances mnésiques chez la souris (Varvel et al., 2007). De manière similaire, la délétion génétique de l'enzyme de dégradation du 2-AG, la DGL, prolonge la DSI *in vitro* et augmente les performances de la mémoire spatiale de l'animal (Pan et al., 2011). Ainsi, en plus d'être responsables d'une modification à long-terme de la transmission synaptique (Isaac et al., 2009), les patrons de décharges des cellules de lieu peuvent également être à l'origine d'une modulation de la précision temporelle de la décharge neuronale en diminuant transitoirement l'activité GABAergique reçue par les neurones pyramidaux via les endocannabinoïdes, ce qui pourrait constituer un mécanisme contribuant au rôle du système des endocannabinoïdes dans les phénomènes de mémorisation impliquant l'hippocampe et notamment la mémoire spatiale.

Les récepteurs CB1 contrôlent la libération de GABA au niveau des terminaisons axonales des interneurons exprimant la CCK (Katona et al., 1999; Tsou et al., 1999; Pan et al., 2011). Cette classe d'interneurons CCK+ fait partie d'une famille hétérogène d'interneurons innervant les cellules pyramidales au niveau de leur compartiment somatique (inhibition périsomatique) mais également tout le long de leur arborisation dendritique

(Klausberger and Somogyi, 2008). Durant les décharges répétitives des cellules principales de l'hippocampe, ces interneurons ont un mode de libération du GABA qui est asynchrone (Losonczy et al., 2004; Hefft and Jonas, 2005; Karson et al., 2008). La mise en activité des cellules de lieu lors de tests comportementaux chez l'animal éveillé est observée quand le réseau hippocampique est dominé par des oscillations thêta (4 à 10Hz). Durant ces oscillations thêta, les interneurons CCK+ sont actifs préférentiellement au cours de la phase ascendante du cycle thêta, lorsque la majorité des neurones pyramidaux sont silencieux et lorsque quelques neurones principaux déchargent en raison du passage de l'animal dans le champ de lieu de la cellule pyramidale concernée (Klausberger et al., 2005; Klausberger and Somogyi, 2008). De plus, les cellules de lieu montrent aussi un déplacement graduel de mise en activité au cours du cycle thêta appelé « précession de phase » quand l'animal passe à travers son champ de lieu (O'Keefe and Recce, 1993). Par conséquent, la suppression de la libération de GABA par ces interneurons CCK+/CB1+ lors de l'activité des cellules de lieu qui vont libérer des endocannabinoïdes (2-AG) peut conduire à une amélioration dans la précision temporelle de la décharge de ces cellules de lieu au cours du cycle thêta, ce qui pourrait être à l'origine de la ségrégation des cellules de lieu actives pour former des assemblées neuronales distinctes et contribuer à l'élaboration de la carte de géolocalisation spatiale de l'hippocampe (Jezek et al., 2011). Beaucoup de cellules de lieu déchargent à proximité du lieu de la récompense dans des tests comportementaux, indiquant que des localisations précises sont représentées dans le code hippocampique (Markus et al., 1995; Hollup et al., 2001; Hok et al., 2007). Les cellules de lieu encodant de telles localisations ont montré une augmentation dans la synchronisation de leur décharge durant des événements à très haute fréquence (150-200Hz) comme les « sharp wave/ripple (SWR) » (O'Neill et al., 2006; Dupret et al., 2010). Il est donc probable que la décharge coïncidente de plusieurs cellules de lieu à proximité du lieu de récompense augmente les niveaux de 2-AG et par conséquent de DSI. De plus, la synchronisation des décharges neuronales des cellules de lieu peut se produire aussi pendant la phase de consolidation lors de périodes d'inactivité de l'animal (O'Neill et al., 2010). Durant les SWR, des interneurons CCK+ peuvent montrer des réponses de décharge variables alors qu'au contraire les interneurons PV+ montrent plutôt des réponses fiables (Klausberger et al., 2005). En raison de la fenêtre de temps de la libération asynchrone de GABA par les interneurons CCK+ qui est plus grande que les épisodes d'ondulation (ripples) à haute fréquence (Karson et al., 2009), la DSI pourrait être un mécanisme pré-synaptique de rétrocontrôle efficace pour couper la libération asynchrone de GABA par les interneurons CCK+/CB1+, ce qui pourrait permettre d'abaisser la quantité

d'activité glutamatergique nécessaire à la décharge des cellules pyramidales, favorisant ainsi leur recrutement et leur synchronisation lors des rythmes oscillatoires à haute fréquence (O'Neill et al., 2006; Dupret et al., 2010).

2. Activité des cellules de lieu, prérequis de la DSI et endocannabinoïdes

Dans cette étude nous avons confirmé que la durée du train de potentiels d'action déterminait l'amplitude de la DSI (Pitler and Alger, 1992). Cependant les prérequis au niveau de la décharge post-synaptique pour l'induction de la DSI contraste avec les prérequis, notamment à de faible fréquence (<20Hz) relatés dans l'hippocampe (Hampson et al., 2003; Zhuang et al., 2005) mais pas dans le néocortex (Fortin et al., 2004). La DSI observée à des faibles fréquences (10Hz), ainsi que le décours temporel de la récupération de l'activité GABAergique après induction de la DSI, suggèrent que l'amplitude et la cinétique des événements transitoires calciques post-synaptiques requis pour mobiliser le système des endocannabinoïdes (Lenz and Alger, 1999; Wang and Zucker, 2001; Myoga et al., 2009) sont respectivement lents et assez larges pour permettre des augmentations de calcium intracellulaire et induire la DSI. Les états du cerveau (phase de sommeil ou d'éveil) ou les tâches comportementales influencent le taux de décharge des neurones dans l'hippocampe (McNaughton et al., 1983; Muller et al., 1994) et donc le contexte comportemental et l'expérience. Des changements graduels dans le taux de décharge de neurones ont été observés quand le rat traverse un champ de lieu selon la direction choisie dans un labyrinthe à chemin unique (Navratilova et al., 2012). Ainsi, la capacité d'une cellule de lieu à contrôler ses entrées synaptiques inhibitrices CB1-sensibles s'appuie sur sa dynamique de décharge. Les cellules de lieu silencieuses ou peu actives lors d'explorations spatiales ne produiraient pas assez de potentiels d'action pour induire la DSI (Hampson et al., 2003). Par contre les neurones pyramidaux activement engagés dans des processus de codage de l'information devraient pouvoir mettre en jeu les mécanismes de synthèse activité-dépendants des endocannabinoïdes et atteindre le seuil d'induction de la DSI.

L'application de carbachol dans le milieu extracellulaire augmente la fréquence des courants inhibiteurs spontanés (Pitler and Alger, 1992) et potentialise la DSI dans les neurones pyramidaux de l'hippocampe (Pitler and Alger, 1994; Martin and Alger, 1999; Martin et al., 2001; Kim et al., 2002) à travers l'activation des récepteurs muscariniques post-synaptique M1 et M3 (Ohno-Shosaku et al., 2003). Le nombre de potentiels d'action nécessaire pour induire la DSI est certainement d'autant moins important que la libération

endogène d'acétylcholine est élevée. En effet, la libération endogène d'acétylcholine a été montrée comme affectant la libération de GABA et l'amplitude de la DSI (Pitler and Alger, 1994b; Martin et al., 2001; Nagode et al., 2011). L'activation tonique du système cholinergique dans l'hippocampe par l'application d'agonistes exogènes se justifie dans les travaux où on étudie la plasticité de la transmission synaptique *in vitro*. En effet des mesures par microdialyse de l'acétylcholine dans l'hippocampe ont révélé une augmentation importante du niveau basal d'acétylcholine lors de la locomotion, l'exploration et l'apprentissage spatial (Pepeu and Giovannini, 2004).

Différentes raisons peuvent tenir compte du faible seuil d'activité pour l'induction de la DSI observée dans ce travail de thèse quand on compare avec les résultats publiés par Hampson et al. (2003). En plus de l'amplitude de la DSI, la cinétique du temps de récupération (temps nécessaire à l'activité GABAergique pour retrouver des niveaux comparables à ceux observés avant la dépolarisation ou décharge neuronale) augmente aussi avec le temps de la dépolarisation neuronale ou le nombre de potentiels d'action émis au cours de la décharge (Pitler and Alger, 1992; Fortin et al., 2004; Zhuang et al., 2005). Selon la quantification de la DSI pris en compte pour une stimulation donnée, le seuil d'induction peut être plus ou moins élevé. Dans notre étude, la mesure de la DSI est faite juste après la fin de la période d'induction (entre 0 et 4s) alors que dans les travaux de Hampson et al. (2003) la DSI était mesurée entre 4 et 7 secondes après la stimulation. Avec ces fenêtres temporelles d'analyse de la DSI différentes, pour une stimulation donnée, le seuil d'activité minimale requise pour l'induction de la DSI sera d'autant plus bas que la DSI sera quantifiée précocement après la période d'induction. L'âge des animaux est aussi un critère important pour l'induction de la DSI. En effet, chez les animaux nouveau-nés, la DSI a été reportée comme étant faible en comparaison de celle observée à des stades de développement plus avancés (Zhuang et al., 2005; Zhu and Lovinger, 2010). Ainsi, l'activité d'une cellule de lieu donnée peut ne pas être suffisante pour induire la DSI chez des animaux âgés d'une semaine de vie post-natale (P7) (Hampson et al., 2003), mais le devenir ensuite à des âges plus avancés. Jusqu'à présent et à ma connaissance, les enregistrements de cellules de lieu les plus précoces ont été réalisés chez des rats âgés de 22 jours de vie post-natale (Scott et al., 2011). Il est donc tentant de spéculer sur le fait que si la DSI est importante pour la réalisation de processus cognitifs nécessitant la région hippocampique, le délai de maturation du système des endocannabinoïdes ainsi que la faible activité des cellules de lieu pourrait expliquer en partie les faibles scores réalisés par les jeunes animaux lors de test comportementaux.

3. Contribution de l'activité inhibitrice dans la précision temporelle

Nos expériences ont révélés que la réduction transitoire de l'activité GABAergique spontanée CB1-sensible augmente la précision temporelle de la décharge des cellules pyramidales de la région CA1 de l'hippocampe. Cette auto-régulation de l'amélioration de la précision temporelle peut être observée : 1) pendant la DSI ; 2) après le blocage pharmacologique des récepteurs GABA_A par la PTX ; 3) quand la fréquence des évènements GABA_A a été réduite. Cependant, la DSI n'est pas associée à une augmentation de la fréquence de décharge des cellules pyramidales. Bien que le carbachol appliqué en extracellulaire (5µM) réduise les conductances potassiques dépendantes du calcium activées pendant la DSI (Pitler and Alger, 1992), nous avons observé des changements transitoires dans le courant de maintien suite aux dépolarisations ou décharges neuronales. De tels changements reflètent le blocage partiel de ces conductances connues pour diminuer l'excitabilité lors de décharges répétitives (Madison and Nicoll, 1984). Il est donc probable que la DSI contrebalance cette réduction de l'excitabilité intrinsèque. En effet, l'injection dynamique d'IPSPs spontanés à des fréquences croissantes a démontré que l'activité spontanée GABAergique était associée à une réduction de l'excitabilité. Cependant, ces changements restaient dans des proportions beaucoup plus faibles que les changements observés sur la précision temporelle de la décharge. La réduction de la variabilité (jitter) initiée par la DSI fut observée que ce soit dans les conditions d'enregistrement électrophysiologiques avec une solution intracellulaire riche en ions chlorures (GABA dépolarisant, **Fig. R8**) ou pauvre en ions chlorures (GABA hyperpolarisant physiologique, **Fig. R8**), confirmant que des courants entrants ou sortants GABAergiques perturbaient la reproductibilité de la décharge de potentiels d'action selon la différence entre le potentiel d'inversion du GABA (E_{GABA}) et le seuil d'émission des potentiels d'action (Caillard, 2011).

Dans le but d'évaluer l'impact de la DSI dans le couplage entrée-sortie, nous avons évalué comment des variables comme le temps d'occurrence, la fréquence et l'amplitude des conductances GABAergiques pouvaient affecter la probabilité et la latence avec laquelle un potentiel d'action était émis suite à l'intégration d'une conductance excitatrice donnée (**Fig. R8 et R9**). La mesure simultanée des EPSCs post-synaptiques, issus de la stimulation des collatérales de Schaffer, et des IPSCs di-synaptiques caractérisant la feed-forward inhibition, n'a pas montré de changement significatif de l'amplitude de l'EPSC associé à la DSI. Les changements transitoires dans l'amplitude de l'EPSC observé dans quelques-uns de nos enregistrements étaient probablement dus au chevauchement temporel de l'IPSC,

transitoirement réduit, avec l'EPSC (Wagner and Alger, 1996). Dans les cultures cellulaires d'hippocampe, la libération de neurotransmetteur peut être diminuée à la fois dans les synapses excitatrices et les synapses inhibitrices suite à l'application d'agonistes exogènes des récepteurs CB1 ou par des dépolarisations neuronales post-synaptiques. La sensibilité aux cannabinoïdes des synapses excitatrices apparaît toutefois moins importante que celles des synapses inhibitrices (Ohno-Shosaku et al., 2002; Xu et al., 2010). Les conditions physiologiques requises *in vitro* pour permettre une réduction transitoire de la transmission excitatrice par les endocannabinoïdes peuvent être atteintes mais seulement dans des conditions où une importante augmentation de la concentration du calcium post-synaptique est observée.

Quand les activités excitatrices et inhibitrices sont décorréliées dans le temps, c'est à dire en présence d'une activité GABAergique spontanée, la perturbation de la précision temporelle de la décharge pour une entrée excitatrice donnée est proportionnelle à la fréquence des événements GABA_A spontanées, ce qui a été démontré par nos simulations (**Fig. R11**). Par conséquent, durant la DSI, l'amélioration transitoire de la précision temporelle peut être observée que ce soit lors du couplage EPSP-Spike ou lors d'une décharge répétitive induite par un créneau de courant dépolarisant constant. Au contraire, quand les entrées excitatrices et inhibitrices sont corrélées dans le temps suite au recrutement di-synaptique des interneurons présynaptiques, la relation entre l'amplitude de l'IPSG et les paramètres du couplage EPSP-Spike deviennent plus complexes car ils deviennent dépendants de la probabilité initial du couplage entrée-sortie (**Fig. R10 et R11**). Dans notre modèle, les fluctuations de voltage avant l'initiation du potentiel d'action expliquent comment la modulation de l'amplitude de l'EPSP et les cinétiques de décours par l'inhibition di-synaptique affectent de manière bi-phasique la précision temporelle de la décharge. Durant la DSI, la réduction de la feed-forward inhibition ainsi que la probabilité initiale du couplage entrée-sortie sont donc les facteurs déterminant qualitativement et quantitativement l'impact sur la précision temporelle de la décharge neuronale. Quand les probabilités de couplage EPSP-Spike sont maintenues faibles par la présence de l'activité spontanée GABAergique, la DSI de la feed-forward inhibition est seulement associée à une diminution de la précision temporelle (**Fig. R12D et H**). D'autre part, quand la feed-forward inhibition est présente et réduit la probabilité du couplage EPSP-Spike à 50%, la précision temporelle est exclusivement contrôlée par l'inhibition di-synaptique. Comme la feed-forward inhibition n'est que partiellement contrôlée par des interneurons CB1-sensibles (Glickfeld and Scanziani, 2006; Glickfeld et al., 2008), cette composante précoce de l'inhibition di-

synaptique devrait être relativement insensible à la DSI. L'augmentation de la probabilité de la décharge durant la DSI serait donc principalement soutenue par l'inhibition spontanée (**Fig. R12B et H**). Néanmoins, comme observée dans nos enregistrements *in vitro*, la réduction conjointe des deux sortes d'inhibition (spontanée et feed-forward) lors de la DSI devrait affecter d'une manière bi-phasique la précision temporelle du couplage entrée-sortie. La fenêtre temporelle d'émission d'un potentiel d'action est alors d'autant plus étendue que la probabilité de couplage est voisine de 0.5. A l'heure actuelle il existe très peu de données concernant la structure temporelle des entrées synaptiques excitatrices et inhibitrices reçues par les cellules de lieu lors de tâches comportementales. Les hypothèses alternatives concernant la contribution respective des activités GABAergiques corrélés ou non aux entrées glutamatergiques et leur plasticité dépendante des endocannabinoïdes restent donc théoriques. Les enregistrements électrophysiologiques *in vivo* en configuration cellule entière dans l'hippocampe lors d'exploration spatiale chez les rats ont été mis au point récemment (Lee et al., 2006; Harvey et al., 2009). En combinant ces nouvelles techniques d'investigation permettant d'optimiser la résolution temporelle des événements synaptiques reçus par les neurones avec la dialyse intracellulaire d'inhibiteurs de la synthèse d'endocannabinoïdes ou de perfusion locale d'antagonistes des récepteurs CB1 (AM251) et/ou d'inhibiteurs de la dégradation des endocannabinoïdes (JZL 184), de nouvelles données pourraient expliquer la pertinence physiologique et les conséquences d'une modulation des entrées synaptiques inhibitrices via le système des endocannabinoïdes suite à l'activité des cellules de lieu à la fois sur la coordination de la précision temporelle de la décharge et les oscillations de réseau dans l'hippocampe.

PERSPECTIVES

Dans la présente étude, nous avons montré que le contrôle des entrées synaptiques inhibitrices par les endocannabinoïdes lors de la DSI pouvait donner lieu à un contrôle et une modulation de la précision temporelle de la décharge neuronale des neurones pyramidaux de la région CA1 de l'hippocampe.

La DSI étant une plasticité à court-terme de l'activité GABAergique, des plasticités à long-terme de cette même activité GABAergique devraient avoir les mêmes effets sur la précision temporelle de la décharge. Les endocannabinoïdes sont responsables justement d'une dépression à long-terme de la transmission synaptique inhibitrice (i-LTD) via des mécanismes d'induction toutefois différents de ceux que l'on peut voir pour la DSI (Chevalleyre and Castillo, 2003, 2004; Chevalleyre et al., 2007). Il serait donc intéressant de voir dans un premier temps si les activités de cellules de lieu enregistrées *in vivo* sont capables d'induire cette i-LTD *in vitro*, comme pour la DSI. Et ensuite de vérifier la conséquence physiologique de cette dépression à long-terme sur la précision temporelle de la décharge.

Il serait également intéressant de faire le parallèle entre notre étude *in vitro*, et les réelles conséquences qu'une altération du système des endocannabinoïdes pourrait avoir sur les performances mnésiques de l'animal lors de tests comportementaux *in vivo*. Ceci permettrait d'apporter des arguments supplémentaires sur le réel impact que peut avoir le système des endocannabinoïdes sur la fidélité temporelle de la décharge et son implication supposée cruciale dans les processus de codage de l'information et de mémorisation.

Il serait également intéressant de mieux comprendre le rôle du système neuromodulateur médié par le réseau cholinergique dans l'hippocampe et sa relation avec la DSI. Des expériences préliminaires réalisées dans le but de savoir s'il était possible d'augmenter l'activité GABAergique spontanée avec un autre agoniste exogène du système cholinergique que le carbachol, l'application d'oxotremorine M (Oxo-M) a donné lieu à des variations rythmiques de l'activité spontanée GABA_A. Comme dans ces conditions l'activité GABAergique enregistrée paraît être insensible aux protocoles d'induction de la DSI (dépolérisation à 0mV pendant 1s), Il semblerait donc que selon l'agoniste cholinergique utilisé, et sur la base de leur sensibilité aux endocannabinoïdes, certaines classes d'interneurones seraient différenciellement mobilisées.

1. Induction de la i-LTD par des patrons de décharge *in vivo*.

D'après les travaux de Chevalyere et Castillo (Chevalyere and Castillo, 2003), il existe dans la région CA1 de l'hippocampe une dépression à long-terme de l'activité GABAergique (i-LTD) qui est initiée par un des endocannabinoïdes principaux, le 2-AG. La i-LTD décrite par les auteurs est induite suite à la stimulations extracellulaires (HFS, TBS, etc...) des collatérales de Schaffer. La libération de glutamate, en activant des récepteurs métabotropiques (mGluR) postsynaptiques stimule la synthèse de 2-AG qui va ensuite diffuser de façon paracrine pour activer les récepteurs CB1 localisés sur les afférences inhibitrices voisines et ainsi provoquer une dépression à long-terme de la libération de GABA (Fig. P1).

Les travaux réalisés au cours de cette thèse montrent que la décharge des cellules pyramidales de la région CA1 de l'hippocampe provoque la synthèse d'endocannabinoïdes. En conséquence ces neurones diminuent l'activité GABAergique qu'ils reçoivent et cela donne lieu à des changements de la fidélité temporelle de leur décharge. Il est donc fortement envisageable qu'une dépression à long terme (i-LTD) de cette même activité GABAergique puisse avoir le même résultat et donc amener les neurones à voir la fidélité temporelle de leur décharge modifiée sur le long-terme. Etant donné que des patrons de décharge de cellules de lieu enregistrés lors de comportements exploratoires permettent d'induire une DSI, nous pensons que des activités de décharges plus soutenues ou répétées pourraient modifier de manière non plus transitoire mais persistante l'activité GABAergique.

Nous proposons donc d'étudier dans un premier temps si une réduction de l'activité spontanée GABAergique peut être observée suite à l'induction de la i-LTD telle qu'elle fut décrite par Chevalyere et Castillo. Nous étudierons également la possibilité que la seule décharge des cellules pyramidales puisse induire la i-LTD. Pour cela nous jouerons *in vitro* les patrons de décharge de cellules pyramidales enregistrées *in vivo* lors de sessions d'apprentissage, afin de vérifier la signification fonctionnelle de la mobilisation du système des endocannabinoïdes et notamment la synthèse de 2-AG dans la plasticité à long-terme de la transmission GABAergique et les phénomènes de mémorisation et d'apprentissage.

Au cours de cette thèse nous avons pu observer que 3 passages successifs de l'animal à travers un champ de lieu modifiaient de manière transitoire mais pas de manière persistante l'activité GABAergique spontanée reçue par la cellule pyramidale codant pour ce lieu. Nous pouvons supposer qu'une répétition plus importante des passages à travers le champ de lieu lors des phases d'exploration finisse par affecter de manière durable l'activité GABAergique

spontanée. Il est possible toutefois que la i-LTD ne puisse pas être détectée lors de l'enregistrement de l'activité spontanée GABAergique. Du fait du filtrage dendritique, même si la fréquence de l'activité inhibitrice spontanée est comparable le long de l'axe somato-dendritique, l'activité GABAergique périsonomatique contribuera en proportion de manière plus importante avec des enregistrements réalisés au niveau du soma (Cossart et al. 2000). La i-LTD s'exprimant exclusivement niveau des synapses dendritiques (Chevalleyre et Castillo, 2003), il sera nécessaire d'enregistrer en plus de l'activité spontanée des réponses GABAergiques évoquées au niveau du Stratum Radiatum pour contourner ces difficultés.

Quand bien même un grand nombre de passages à travers le champ de lieu seraient rejoués *in vitro*, la seule décharge des cellules pyramidales de la région CA1 pourrait ne pas être suffisante pour induire la i-LTD. Dans cette hypothèse, nous proposons de stimuler les collatérales de schaffer selon les patrons de décharge des cellules de lieu de la région CA3. De telles expériences permettraient tout d'abord d'évaluer la possibilité que la i-LTD puisse être induite par des patterns d'activité glutamatergiques issus d'enregistrements *in vivo* lors de comportements exploratoires et ensuite de tester le rôle primordial joué par l'activité des entrées glutamatergiques dans l'expression de cette LTD hétérosynaptique de l'inhibition.

Pour finir Il serait également intéressant de combiner la stimulation des collatérales de schaffer avec la décharge de potentiels d'action de la cellule pyramidale CA1. En rejouant les patrons de décharge de deux cellules pyramidale CA3 et CA1, la stimulation des entrées glutamatergiques d'une cellule pyramidale selon un pattern CA3 avec la décharge des potentiels d'action selon un pattern CA1 pourrait donner lieu à différentes formes de plasticités induites par la synthèse d'endocannabinoïdes dans la cellule pyramidale CA1 enregistrée. Les conséquences de l'activité de différentes paires CA3-CA1 pourraient être testées, afin d'étudier les 3 configurations temporelles possibles : ainsi pour commencer seraient étudiées les conséquences d'un chevauchement d'activité CA3-CA1, notamment quand les champs de lieu sont comparables pour les 2 types cellulaires. La séquence CA3 – CA1 reflèterait une cellule pyramidale CA3 dont le champ de lieu précéderait temporellement celui de la cellule pyramide CA1. Enfin la séquence CA1-CA3 reflèterait à l'opposé une cellule pyramidale CA1 dont le champ de lieu précéderait temporellement celui de la cellule pyramide CA3.

L'ensemble de ces expériences, en détaillant les conditions physiologiques requises pour l'induction de plasticités synaptiques à court- et à long-terme faisant intervenir les endocannabinoïdes comme messenger rétrograde, devraient nous permettre d'accroître notre

compréhension du rôle des endocannabinoïdes dans les phénomènes de mémorisation et d'apprentissage.

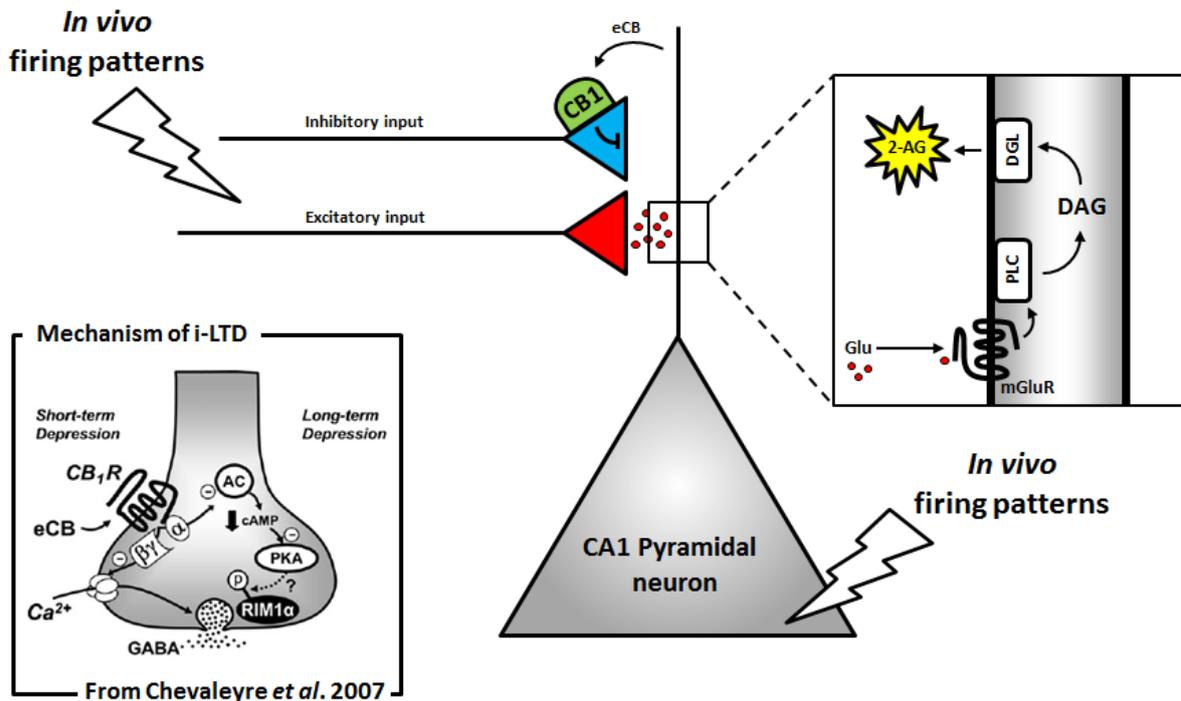


Fig. P1. Induction hypothétique de la i-LTD par des activités *in vivo* de cellules de lieu. Le but est de voir dans un premier temps si l'exécution de patrons de décharge *in vivo* appliqués en post-synaptique (tout comme pour la DSI) peut induire une dépression à long-terme de l'activité GABAergique. Puis dans un deuxième temps de voir si la stimulation des collatérales de Schaffer, effectués par la reproduction des patrons de décharge enregistrés *in vivo* dans CA3, sont capables d'induire une i-LTD selon des mécanismes décrits par Chevaleyre et Castillo (Chevaleyre et al., 2007).

2. Altération pharmacologique du système des endocannabinoïdes et conséquences sur la mémoire de reconnaissance.

Suite aux expériences que nous avons réalisées *in vitro*, nous postulons que la mobilisation du système des endocannabinoïdes, en induisant une plasticité de l'activité GABAergique (DSI ou i-LTD), peut être à l'origine d'une amélioration de la fidélité temporelle de la décharge des neurones de la région CA1 de l'hippocampe.

A partir de cette hypothèse, et en tenant compte de la bibliographie, il est raisonnable de penser que l'amélioration de la fidélité temporelle de la décharge neuronale joue un rôle crucial dans la synchronisation et le traitement de l'information comme par exemple au cours des processus de mémorisation et d'apprentissage. Dans une étude récente (Pan et al., 2011), les auteurs ont montré qu'une modification du système des endocannabinoïdes peut avoir un

impact sur la mémoire. En effet, des souris transgéniques déficientes en Monoacylglycerol Lipase, l'enzyme de dégradation du 2-AG, agoniste endogène des récepteurs CB1, voient leurs performances cognitives améliorées dans des tests d'orientation spatiale ou de reconnaissance d'objets. Dans un article récent (Puighermanal et al., 2009), il a été mis en évidence que chez des souris transgéniques n'exprimant plus de récepteurs CB1 dans les interneurons (GABA-CB1^{-/-}), l'index de discrimination dans un test de reconnaissance d'objet était moins bon que chez les souris sauvages. Comme les souris transgéniques n'exprimant plus de récepteurs CB1 dans les cellules glutamatergiques (Glu-CB1^{-/-}), obtiennent des scores équivalents aux animaux sauvages, ces résultats suggèrent que l'activation par les endocannabinoïdes des récepteurs CB1 exprimés dans les interneurons GABAergiques est un élément important dans l'acquisition de cette forme de mémoire.

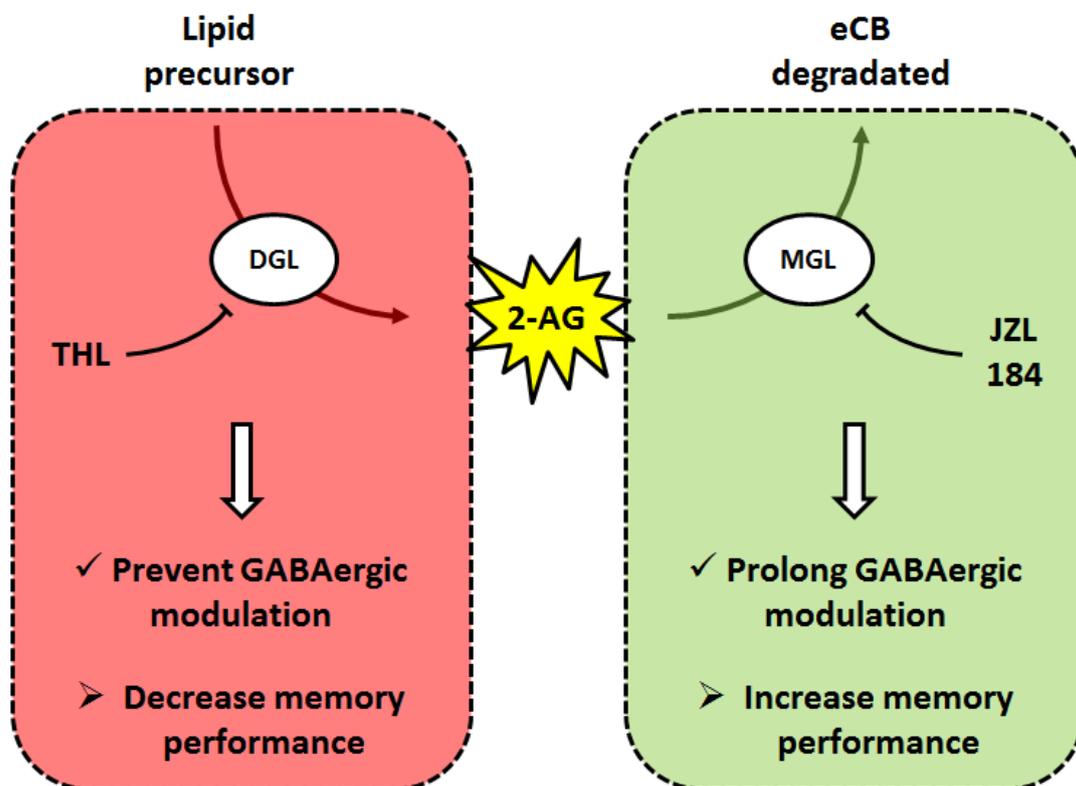


Fig. P2. Effet hypothétique de l'altération pharmacologique de la synthèse et dégradation du 2-AG sur les performances mnésiques. L'administration *in vivo* de THL, un inhibiteur de l'enzyme de biosynthèse du 2-AG, diminuera la modulation de l'activité GABAergique perturbatrice de la fidélité temporelle ce qui devrait avoir pour conséquence une diminution des scores de l'animal lors de tests comportementaux. D'autre part, l'administration de JZL 184, un inhibiteur de l'enzyme de dégradation du 2-AG, devrait prolonger la modulation de l'activité GABAergique induite par les endocannabinoïdes comme le 2-AG et donc augmenter les performances mnésiques de l'animal, selon l'hypothèse que le codage des informations se trouvera amélioré en raison de modifications de la fidélité temporelle de la décharge.

Notre projet est donc d'évaluer, avec des agents pharmacologiques qui altèrent la synthèse et la dégradation du 2-AG (**Fig. P2**), l'implication de cet endocannabinoïde dans la mémoire de travail chez des rats au cours d'expériences de comportement comme la reconnaissance d'objet (object-recognition task) ou la localisation d'objet (object-location task). En parallèle, des expériences *in vitro* seront menées afin d'évaluer l'impact de ces manipulations pharmacologiques sur la plasticité de la transmission GABAergique et les changements de fidélité de la décharge associées suite à la décharge des cellules pyramidales de la région CA1 de l'hippocampe.

3. Modulation cholinergique de l'activité spontanée GABAergique par recrutement spécifique de certaines classes d'interneurones.

Dans l'hippocampe, l'activité spontanée GABAergique reçue par les cellules pyramidales *in vitro* est généralement faible. Pour caractériser les paramètres d'induction de la DSI sur ce type d'activité, il était nécessaire de travailler avec un niveau important d'activité spontanée GABAergique. Classiquement, le carbachol (5 μ M), un agoniste cholinergique est utilisé pour augmenter de façon significative et de manière constante l'activité spontanée GABAergique dans l'hippocampe (Pitler and Alger, 1994). La proportion d'interneurones GABAergiques stimulés rendus actifs par l'application de carbachol sont préférentiellement plus sensibles aux cannabinoïdes exogènes et endogènes (Karson et al., 2008). Cependant le carbachol peut également stimuler la production d'endocannabinoïdes par les neurones pyramidaux (Martin and Alger, 1999), nous avons voulu essayer des agonistes plus spécifiques des récepteurs muscariniques comme l'oxotremorine M (Oxo-M) pour voir s'il en était de même. Les résultats de cette série d'expérience ont montré une augmentation de l'activité spontanée GABAergique mais avec une organisation temporelle différente. En effet, contrairement au carbachol qui élève de manière homogène l'activité GABAergique DSI-sensible, l'application en extracellulaire d'Oxo-M (5 μ M) induit des bouffées d'activité spontanée GABAergique qui reste insensible à la DSI (**Fig. P3**).

La première interprétation de ce résultat inattendu fut que l'Oxo-M stimulerait préférentiellement les interneurones insensibles aux endocannabinoïdes car n'exprimant pas le récepteur CB1 comme les interneurones PV+ (Freund et al., 2003). Les interneurones PV+ libèrent de manière synchrone le GABA lorsqu'ils émettent des potentiels d'action (Hefft and Jonas, 2005). Une salve de décharge de potentiels d'action donnerait donc lieu à une salve de réponses postsynaptiques en bouffée.

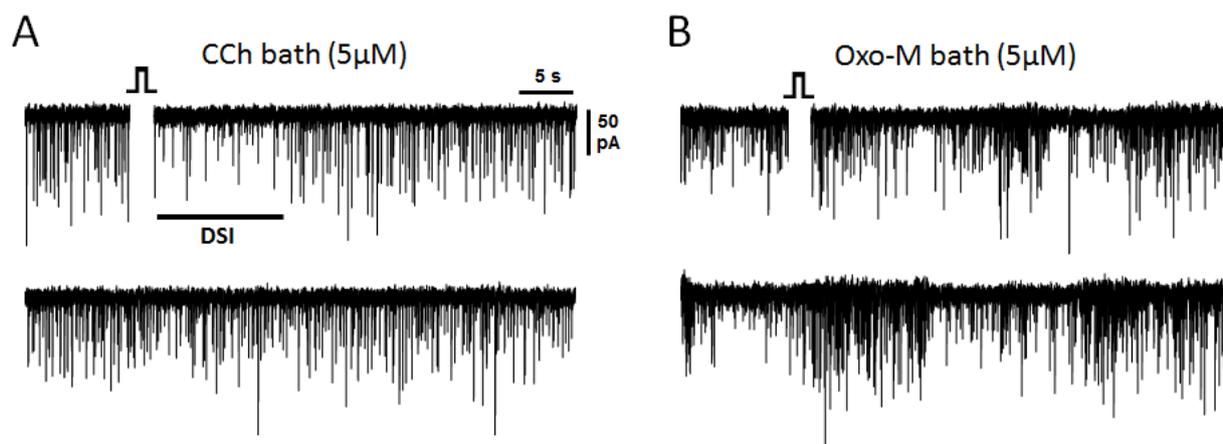


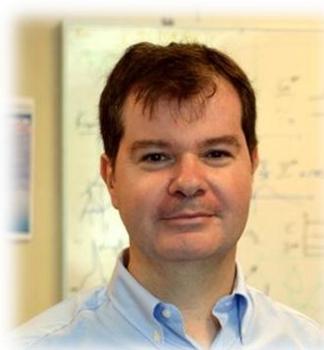
Fig. P3. Effet du carbachol et de l'Oxo-M sur l'activité spontanée GABAergique. **A**, Enregistrements électrophysiologiques en mode voltage imposé de l'activité spontanée GABAergique après application de carbachol ($5\mu\text{M}$) en extracellulaire. **B**, Enregistrements électrophysiologiques en mode voltage imposé de l'activité spontanée GABAergique après application d'Oxo-M ($5\mu\text{M}$) en extracellulaire. A noter qu'une dépolarisation neuronale (pulse à 0mV pendant 1s) induit la DSI en présence de carbachol (A) alors qu'elle n'induit pas la DSI en présence d'Oxo-M (B).

A l'inverse les interneurons CCK+ libérant le GABA de manière asynchrone suite à l'émission de potentiels d'action (Hefft and Jonas, 2005), une salve de décharge de potentiels d'action donnerait donc lieu à une activité plus stable au cours du temps, telle que celle que l'on peut voir lors de l'enregistrement des neurones pyramidaux après application de carbachol. Comme les synapses GABAergiques de ces interneurons expriment les récepteurs CB1 (Tsou et al., 1999), une activité préférentielle de ces interneurons suite à l'application de carbachol pourrait expliquer la grande sensibilité de cette activité GABAergique révélée dans ces conditions pharmacologiques par les endocannabinoïdes. Le projet consisterait donc dans un premier temps à déterminer si des classes d'interneurones sont préférentiellement recrutées lors de l'application de carbachol, l'Oxo-M ou d'autres agonistes cholinergiques comme la pilocarpine (agoniste muscarinique) ou le PHA 543613 (agoniste nicotinique). Des expériences pharmacologiques complémentaires pourront être réalisées en combinant l'application d'agonistes à spectre large comme le carbachol avec différents antagonistes des récepteurs muscariniques comme le VU 0255035, l'AF-DX 116 et le zamifenacin fumarate respectivement antagonistes des récepteurs muscariniques M1, M2 et M3. En plus de l'enregistrement de cellules pyramidales permettant de déterminer les variations de tonus GABAergique associé à l'application d'un agoniste cholinergique, des enregistrements d'interneurones seront programmés pour caractériser les effets de l'application des différents agents pharmacologiques sur l'excitabilité et la décharge neuronale de ces interneurons.

Thèse encadrée et réalisée sous la direction de



Olivier CAILLARD
Directeur de Thèse



Dominique DEBANNE
Chef d'Equipe et d'Unité

Au sein de



**Unité de Neurobiologie des
canaux Ioniques et de la Synapse**
Anciennement UMR641 dirigée par
Michael SEAGAR

Financée par



ANNEXE (ARTICLE)

Title: Self-tuning of inhibition by endocannabinoids shapes spike-time precision in CA1 pyramidal neurons

Abbreviated title: Endocannabinoids tune spike-time precision

Authors: Franck Dubruc^{1,2}, David Dupret³ and Olivier Caillard^{1,2}

1. Inserm, UMR_S 1072, 13015, Marseille, France

2. Aix-Marseille Université, UNIS, 13015, Marseille, France

3. MRC Anatomical Neuropharmacology Unit, Department of Pharmacology, University of Oxford, Mansfield Road, Oxford OX1 3TH, United Kingdom

Corresponding author: Olivier Caillard

Inserm UMR_S 1072, Unité de Neurobiologie des Canaux Ioniques et de la Synapse

Faculté de Médecine - Secteur Nord, Université Aix-Marseille CS80011, Bd Pierre Dramard

13344 Marseille Cedex 15 France

Tel: 00 33 4 91 69 88 62

Fax: 00 33 4 91 09 05 06

e-mail: olivier.caillard@univ-amu.fr

Number of Words: Abstract: ##; Introduction: ##; Discussion: ###

Number of Figures: 7; Number of Tables: 0; Number of Pages: ##

Author Contributions: F.D. and O.C. designed research; F.D. and O.C. performed research; F.D., D.D., and O.C. analyzed data; F.D., D.D. and O.C. wrote the paper.

Note to Editor:

Some portion of the data in this manuscript has been published elsewhere:

The place cell firing patterns depicted in figure 1 and replayed *in vitro* for the purpose of the present study were part of the data set collected, analysed and published by Dupret et al. 2010. However, the *in vivo* firing patterns of the selected place cell used in the present study were not depicted, used in isolation for analysis purposes or published elsewhere.

Abstract

In the hippocampus, activity-dependent changes of synaptic transmission and spike-timing coordination are thought to mediate information processing for the purpose of memory formation. Here we investigated the self-tuning of intrinsic excitability and spiking reliability by CA1 hippocampal pyramidal cells via changes of their GABAergic inhibitory inputs and endocannabinoid signaling. Spatially-selective firing patterns recorded *in vivo* during a spatial learning task on a cheeseboard maze and replayed *in vitro* by pyramidal neurons, induced a transient suppression of spontaneous GABAergic activity and enhanced excitability. This Depolarization-induced Suppression of Inhibition (DSI) mobilized the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol (2-AG), acting on CB1R-dependent GABAergic synaptic inputs to the discharging cell and conditioned a transient improvement of spike-time precision during consecutive burst discharge. When evaluating the consequences of DSI on Excitatory Post-Synaptic Potential (EPSP)-spike coupling, we found that transient reduction of uncorrelated (spontaneous) GABAergic activity improved EPSP-Spike coupling probability and time precision. Transient reduction of correlated (feed-forward) inhibition also increased EPSP-Spike coupling probability, but disrupted or improved spike-timing reliability according to the initial spike coupling probability. Thus eCB-mediated tuning of pyramidal cell spike-time precision is governed not only by the initial level of global inhibition but also by the ratio between spontaneous and feed-forward GABAergic activities. These results reveal that eCB-mediated self-tuning of spike-timing by the pyramidal cells' own discharge can constitute an important contribution to place cell assemblies and memory formation in the hippocampus.

Keywords

short-term plasticity; Feed-Forward inhibition ; Spontaneous inhibition; Endocannabinoids ; Spike Timing; CA1 place cell

Abbreviations:

2-AG: 2-arachidonoylglycerol; **AM251**: *N*-(Piperidin-1-yl)-5-(4-iodophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1*H*-pyrazole-3-carboxamide; **CB1R** : Cannabinoid type 1 receptor; **CCH**: Carbachol; **CCK** : cholecystokinin; **CV_{ISI}** : Coefficient of Variation of the Interspike Interval; **DC** : Direct Current; **DSI**: Depolarization-induced Suppression of Inhibition; **dDSI**: dynamic DSI; **eCB** : endocannabinoids ; **EPSPG**: excitatory postsynaptic conductance; **EPSP** : excitatory postsynaptic potential ; **FFI**: Feed-Forward Inhibition; **FF-IPSPG**: Feed-forward inhibitory postsynaptic conductance; **IPSPG**: inhibitory postsynaptic conductance; **IPSP**: inhibitory postsynaptic potential; **ISI** : Inter Spike Interval; **PTX** : picrotoxin; **SP-IPSPG**: spontaneous inhibitory postsynaptic conductance; **THL**: Tetrahydrolipstatin; **V_{hold}** : Holding Membrane Potential; **V_m**: Membrane Potential;

Introduction

Brain computations associated with learning processes rely on complex interactions between excitatory and inhibitory circuits, and those involve activity-dependent synaptic plasticity mechanisms to refine the neuronal spike-timing underlying firing synchronization and temporal coordination of cell assemblies. In the hippocampus, a key brain circuit for memory, pyramidal cells called ‘place cells’ fire in specific regions of the environment (i.e. place fields) and their joint activity is thought to provide mnemonic representations of space used to guide behavior (O’Keefe and Dostrovsky, 1971; O’Keefe and Conway, 1978; Wilson and McNaughton, 1993). Cell assemblies forming distinct representations are thought to arise as a result of changes in synaptic weights between active place cells and precise spike-timing is expected to be instrumental for their temporal coordination (Wilson and McNaughton, 1994; Kentros et al., 1998; Robbe et al., 2006; O’Neill et al., 2008; Dupret et al., 2010). However the activity-dependent plasticity mechanisms by which place cells refine the spike-time precision of their firing patterns remain unknown.

Depolarization-induced suppression of inhibition (DSI) has been suggested to represent an important mechanism for learning and memory (DSI; for review, see Freund et al., 2003; Kano et al., 2009). This form of plasticity is mediated by endocannabinoid (eCB) signaling involving the cannabinoid type 1 receptor (CB1R), the activation of which is required for hippocampal long-term memory (Varvel et al., 2005; Puighermanal et al., 2009; Han et al., 2012). CB1Rs are predominantly expressed on axon terminals of cholecystokinin-expressing (CCK) interneurons (Katona et al., 1999; Tsou et al., 1999), known to provide local inhibition to pyramidal cells by means of asynchronous release of GABA (Losonczy et al., 2004; Foldy et al., 2006; Karson et al., 2009). During DSI, hippocampal CA1 pyramidal neurons release eCB that transiently inhibits afferent GABAergic activity and the CB1R agonist 2-arachidonoylglycerol (2-AG) is known to mediate such a retrograde control (Gao et al., 2010; Tanimura et al., 2010).

In knock-out mice deficient for the principal 2-AG-degrading enzyme monoacylglycerol lipase, sustained 2-AG elevation enhances hippocampal LTP and cognitive and spatial learning (Pan et al., 2011). As these knock-out mice also exhibit prolonged depolarization-induced suppression of inhibition (DSI) in hippocampal CA1 pyramidal neurons, together with the fact that the hippocampal LTP threshold is reduced during DSI (Carlson et al., 2002), it was suggested that DSI may be an important mechanism for enhancing learning and memory.

Yet whether *in vivo* place cell firing patterns trigger eCB-mediated DSI remains controversial (Hampson et al., 2003). Moreover, the effects of DSI on spike-time precision remain to be determined as eCB signaling in pyramidal cells reduced both synchronous and asynchronous synaptic GABA release from CB1R-dependent inhibitory inputs.

Here we established the firing requirement for DSI using *in vivo* place cell patterns monitored during a spatial learning task (Dupret et al., 2010) and evaluated the effect of DSI on CA1 pyramidal cell firing and spike timing properties. We found that the *in vitro* replay of place cell discharge elicited an eCB-mediated transient reduction in GABA release depending on the number of action potentials fired, and improved their spike-time precision as measured by a decrease in the coefficient of variation during burst discharge. Moreover we employed dynamic current injections to mimic synaptic input events, with computational modeling, to identify the parameters and decipher the mechanisms underlying self-tuning of spike-time precision by coexisting correlated and uncorrelated GABAergic activities. We revealed that excitatory postsynaptic potential (EPSP)-spike coupling was governed by feed-forward inhibition imposing a biphasic tuning of spike-time precision, ultimately prevented by high-level spontaneous inhibition.

Materials and Methods

Ethic Statement

All rats were maintained on a 12 h light/dark cycle with food and water provided ad libitum. Animal research was approved by the local direction of veterinary services (Direction Départementale des Services Vétérinaires – Préfecture des Bouches du Rhône, France (O. Caillard, licence number A13-493). All experiments were carried out according to the European and institutional guidelines for the care and use of laboratory animals (Council Directive 86/609/EEC and French National Research Council).

Hippocampal slice preparation and electrophysiological recordings

Transverse hippocampal slices (350 μm thick) were obtained from 14- to 20-day old Wistar rats as previously described (Debanne et al., 2008). Experiments were performed at 32°C in ACSF containing the following (in mM): 125 NaCl, 26 NaHCO₃, 3 CaCl₂, 2.5 KCl, 2 MgCl₂, 0.8 NaH₂PO₄, 10 D-glucose; and saturated with 95% O₂ and 5% CO₂. CA1 pyramidal cells were visualized using an Olympus BX-51 WI microscope equipped with differential interference contrast optics under infrared illumination and a water immersion lens (X60, 0.9 NA, Olympus). Electrophysiological recordings were performed in whole-cell configuration with a Multiclamp 700B amplifier (Axon Instruments), filtered at 5 kHz and digitized at 20 kHz via a PCI-6220 National Instrument interface controlled by IgorPro (Wavemetrics) and/or Digidata 1322A interface controlled by PClamp software (Axon Instruments). Patch pipettes had a resistance of 4-10 M Ω when filled with a KCl solution containing (in mM): 140 KCl, 5 HEPES, 2 EGTA, 2 Na₂ATP, 0.3 NaGTP, and 2 MgCl₂, pH 7.4 or with a low chloride solution containing (in mM): 140 Kgluconate, 10 HEPES, 2 EGTA, 2 Na₂ATP, 0.3 NaGTP, and 2 MgCl₂, pH 7.4. With the KCl-based solution, the reversal potential for GABA_A receptors, determined by local pressure ejection of isoguvacine (0.5 mM) at different holding membrane potentials, was 3.7 ± 2.9 mV (n=4). With the low chloride-based solution, the reversal potential for GABA_A receptors, determined by the same method was -73.7 ± 1.7 mV (n=9).

Cells were recorded if the series resistance, measured throughout experiments, remained stable and < 40 M Ω . Stimulating pipettes were filled with extracellular saline. Picrotoxin (PTX, 100 μM) was prepared in ethanol and stored at -80°C. Kynurenic acid (200 μM) and carbachol (CCH, 5 μM) were prepared in distilled water and stored at -20°C. AM251 (10 μM) and tetrahydrolipstatin (THL, 1 μM) were prepared in DMSO and stored at -20°C. Stocks solutions were thawed and diluted into the extracellular solution before use. Final DMSO concentrations were 0.05% and 0.1% for extracellular and intracellular solutions, respectively. At these concentrations DSI was not affected by DMSO. The DSI induced by depolarization of the cell in voltage-clamp at 0 mV for 1s was 27.0 ± 4.5 % of control GABAergic charge (n=16). In these conditions, the DSI was of comparable magnitude when cells were recorded with the intracellular or extracellular DMSO concentrations used in this study, respectively (28.5 ± 5.2 %, n=6, p=0.303).

Stimuli

Voltage or direct current (DC) steps and GABA_A synaptic conductances were generated using the Igor Pro software (Wavemetrics), and transmitted to the microelectrode amplifier via a PCI 6723 National Instrument interface. For experiments that required transient switches to current-clamp mode at specific times, an analog signal was constructed with Igor Pro Software and injected to the external mode command of the Multiclamp 700B amplifier contemporaneously with the voltage-clamp or current-clamp external input commands.

The firing patterns presented in figures 1, 2 and 4 were extracted from the dataset used in Dupret et al. (2010). These patterns corresponded to 3 successive learning trials (trials number 21, 22 and 23) during each of which the rat had to retrieve three food rewards hidden in a cheeseboard maze, before returning to the start box and collecting an additional reward. All procedures were carried out in accordance with the Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 (UK) and associated procedures under an approved project license. The place field of the selected place cell was situated on the path between the start box and the first goal location. *In vitro* replay of these place cell firing patterns was obtained by delivering sequences of brief depolarization (1.25 ms / 2nA) followed by short hyperpolarization (1.25 ms / 2nA) at specific times (Fig. 1 and Fig. 2F,G).

Depolarizing DC pulses were followed by hyperpolarizing pulses in order to drive cell discharges at very short Inter Spike Intervals (ISI, see Fig. 2G for instance). In behaving rats, CA1 pyramidal cells classically exhibit bursts of spikes (Ranck, Jr., 1973) with ISI ranging from 2 to 6 ms (Harris et al., 2001). In line with this, the CA1 pyramidal cell activity from the study of Dupret et al. (2010) also revealed short ISI, as low as 2.5 ms. Hence the protocols we used were the most reliable for driving action potentials at precise times. The DC injected to hyperpolarize the cell was also set to avoid uncontrolled action potential discharge, which may be facilitated by the depolarizing envelope that follows the fast phase of action potential repolarization

(Schwartzkroin, 1975; Storm, 1987) and depolarizing GABAergic postsynaptic potentials, that occurred frequently in our recording conditions (carbachol 5 μ M and GABA_A reversal potential = 3.7 ± 2.9 mV (n=4)).

Neuronal and synaptic modeling

GABAergic and glutamatergic synaptic events were modelled as a conductance with a dual exponential time-course of the form $(1 - \exp(-t/\tau_{\text{rise}})) \cdot \exp(-t/\tau_{\text{decay}})$ where $\tau_{\text{rise/decay}}$ is the rise/decay time constant. Spontaneous activity was created by convolution of the synaptic event template with the Poisson train occurrence of spontaneous events. τ_{rise} and τ_{decay} were 1 ms and 5.5 ms for excitatory postsynaptic conductances (EPSPs) and 1.5 ms and 14.7 ms for inhibitory postsynaptic conductances (IPSPs), respectively (Caillard, 2011). IPSP amplitude varied according to a binomial distribution with $n=5$ and $p=0.2$. Feed-forward IPSPs (FF-IPSPs) were sent with a delay of 2 ms after EPSPs (Pouille and Scanziani, 2001). The conductance instruction was then either converted to an analog signal to instruct the dynamic clamp amplifier or injected into the computational model. The latter was based on a leaky integrate and fire model (LIF) with random threshold (Holden, 1976; Manwani et al., 2002; Caillard, 2011): $C_m \cdot dV_i/dt = \sum_i g_i \cdot (V_o - V_i) + \sum_i I$ with $C_m = 400$ pF; $V_o = -65$ mV. A spike is generated when V_i reaches the action potential threshold (-45 mV), and the membrane potential resets to V_o . Resting membrane resistance was set at 200 M Ω . GABAergic and glutamatergic synaptic events, affecting both g_i and I when present, were included according to the equations $I_{\text{GABA}} = g_{\text{GABA}} \cdot (V_m - E_{\text{GABA}})$ and $I_{\text{GLU}} = g_{\text{GLU}} \cdot (V_m - E_{\text{Glu}})$. E_{GABA} and E_{Glu} were respectively set at -70 mV and 0 mV. All modeling was performed with Igor Pro Software.

Dynamic clamp

To add artificial IPSPs and EPSPs, we used a fast dynamic-clamp system using National Instruments data acquisition cards (PCI 6052E or PCI 6251) and NI-DAQmx 9.21, controlled by the QuB software (www.qub.buffalo.edu; Milesu et al., 2008). The dynamic-clamp system was running on an independent PC mounted with a dual 8 core Xeon processor @ 2.67 GHz. The Feedback loop ($F > 90$ kHz) continuously read the membrane potential V_m from the Multiclamp 700B, EPSP and/or IPSP and the DC command from the PCI-6723 NIDAQ card controlled by Igor software on a separate computer and generated an output according to the equation $I_{\text{sum}} = \text{EPSP}(V_m - E_{\text{Glu}}) + \text{IPSP}(V_m - E_{\text{GABA}}) + \text{DC}$. E_{Glu} and E_{GABA} were set respectively at 0 and -75 mV.

Dynamic clamp experiments were performed in the presence of kynurenatate (2 mM) and PTX (100 μ M). For feed-forward inhibition experiments, the following protocol was performed: EPSP peak amplitude was set so that spikes were successfully triggered with an average latency of approximately 5ms after each EPSP; the largest FF-IPSP amplitude was then defined in order to prevent action potential firing following the recording of a few EPSP/IPSP sequences. A preliminary EPSP-Spike probability curve was drawn online after testing a few IPSP/IPSP sequences several times. It served to define, for a given FF-IPSP amplitude, the number of EPSP/IPSP sequences that should theoretically be injected into the cell in order to get one successful coupling, with the limit probability of 0.05. Thereafter, EPSP/IPSP sequences were injected in random order, such that EPSP-Spike latencies at low EPSP-Spike coupling probabilities could successfully be collected.

Analysis

Spontaneous synaptic activity and spike analysis were performed with Igor Pro (Wavemetrics, Lake Oswego, OR, USA). A collection of Igor Pro functions (Neuromatic, Jason Rothman, <http://www.neuromatic.thinkrandom.com>) were used in addition to homemade functions.

To quantify spontaneous GABAergic activity we integrated the current area under baseline for each 500 ms bin of recordings in order to determine the total synaptic charge received by the cell over time. This parameter captured changes in both the frequency and the amplitude of synaptic events. DSI was measured as the change in the average charge in the 4 seconds that followed action potential discharge or depolarization to 0 mV. Mean DSI Magnitude depicted in figure 1 is defined as the reduction of GABAergic charge during this period of time.

Spike threshold was detected when dV/dt exceeded 10 mV / ms. Changes in excitability were evaluated for equivalent DC steps. Measurements of CV_{ISI} were performed by averaging CV for each sequential interval along the discharge starting from the 2nd spike. With this method, the reproducibility of the full discharge from one trial to another could be evaluated, independently of spike-frequency adaptation that was observed experimentally (Caillard, 2011). Measurement of spike-time jitter at 20 spikes / s was performed by interpolating the CV_{ISI} vs. average spike discharge with either the best linear or exponential fit. For EPSP-Spike coupling experiments, action potential coupling was evaluated, and latencies between the beginning of EPSP and spike threshold were collected. Jitter corresponded to the standard deviation of the mean latency.

Statistical comparisons were made using the Mann-Whitney test. Differences were considered significant when $p < 0.05$. Latencies are reported as mean \pm jitter where jitter corresponds to SD of the mean. Other data are reported as mean \pm SEM.

Results

Place cell firing induces endocannabinoid-mediated decrease of GABAergic transmission

To determine whether waking firing patterns of place cells can induce Depolarization-induced Suppression of Inhibition (DSI), *in vivo* spiking activity was replayed *in vitro* while monitoring GABAergic activity in the pyramidal cell layer of the CA1 hippocampal region. The CA1 place cell firing patterns were obtained using multichannel recording technique in rats performing a spatial learning task on a cheeseboard maze (Fig. 1A and B) (Dupret et al., 2010, see Methods), and converted into short current steps to elicit action potentials *in vitro* while performing voltage-clamp recordings of pyramidal neurons (peak of action potentials = 34 ± 7 mV; mean \pm sem; n=5). Following the elicited action potential discharge, the membrane potential (V_m) was transiently further hyperpolarized (-78.0 ± 3.3 mV) when compared to the preceding holding potential (-76.2 ± 1.4 mV). Neurons were recorded in the presence of kynureate (2 mM) to block ionotropic glutamatergic receptors and monitor the temporal dynamics of GABAergic activity, together with carbachol (5 μ M) to promote spontaneous inhibitory post-synaptic currents (IPSCs) (Pitler and Alger, 1992) and an elevated intracellular chloride concentration to reliably detect GABA_A events. In these conditions, GABA_A synaptic activity was detected as large inward currents when neurons were recorded at a $V_m = -80$ mV. The whole-cell amplifier automatically switched to current-clamp mode 125 ms prior to each action potential and back to voltage-clamp mode, unless the interval to the next spike to be triggered was less than 250 ms. Infield place cell discharge (i.e., occurring inside the place field) observed across successive learning trials was followed *in vitro* by a transient reduction of the GABAergic input activity, referred to as GABAergic charge (see methods) and measured by the integral of the area under the baseline current within the 4 seconds following each place field traversal (Fig. 1C; $31 \pm 4\%$, $45 \pm 5\%$ and $36 \pm 3\%$ of baseline GABAergic charge after each replayed trial; n=4; $p < 0.05$ for each place field traversal; $\#\#U(8)=0$, $Z=2.31$, $p=0.014\#\#$). Transient suppressions of GABAergic charge received by CA1 pyramidal neurons involved 2-arachidonoylglycerol (2-AG), an endogenous agonist of the CB₁ endocannabinoid receptor (Makara et al., 2005; Tanimura et al., 2010; Pan et al., 2011). In line with this we found that the induction of DSI by infield place cell firing patterns in our conditions was prevented by adding to the intracellular solution the tetrahydrolipstatin (THL, 1 μ M), an inhibitor of sn-1-diacylglycerol lipase responsible for 2-AG synthesis (Fig. 1D and 1E; n=4; $p > 0.05$ for each place field traversal). These results show that place cell firing patterns can induce an endocannabinoid-mediated transient suppression of the GABAergic activity received by CA1 hippocampal neurons.

Hippocampal place cells can exhibit substantial variations of their action potential discharge when the animal is crossing their respective place fields (McNaughton et al., 1983). We therefore attempted to induce DSI with firing patterns recorded from different place cells (Fig. 1F-H). We found that the DSI was not induced when a low number of spikes were used (GABAergic charge: $92 \pm 6\%$ of control; n=9, $p=0.346$), suggesting that only the most active place cells can induce DSI. Thus, in order to further evaluate the firing requirements for DSI, spontaneous inhibitory postsynaptic currents (sIPSCs) were recorded while driving CA1 pyramidal neurons with bursts of action potentials (range 3 to 55 intra-burst APs) elicited by a constant depolarizing current pulse. In this case, burst discharge eventually induced a transient reduction of the GABAergic charge, with the DSI peak value proportional to the number of intra-burst action potentials (Fig. 2A and D).

We next investigated the importance of spike patterns on DSI induction. The DSI induced by either a constant depolarizing current or a series of short depolarizations precisely reproducing *in vivo* spike times were of comparable magnitude when a similar number of spikes was emitted. For instance, both the transient reductions of the GABAergic charge induced by 28 spikes (Fig 2A, top left panel; $45 \pm 8\%$, n=6, $p=0.001$) and by place cell *in vivo* discharge (Fig 2A, top right panel; $47 \pm 7\%$, n=9, $p < 0.001$) were significant and comparable ($p=0.5$). For both types of elicited spiking activity, a low number of spikes (<7) however failed to induce a DSI (Fig. 2A bottom panels; constant depolarizing current: $p=0.557$; *in vivo* patterns: $p=0.14$). Moreover, DSI induction was prevented by the CB₁ receptor antagonist AM251 (Fig. 2B and D; 5 μ M AM251). While in the drug-free condition a 30Hz intra-burst spiking rate reduced the IPSC charge to $40 \pm 10\%$ with a recovery mean time course of 24.9 ± 5.7 s (Fig. 2E, n=5, $p < 0.01$), the GABAergic charge remained virtually unaffected with AM251 (Fig 2E, IPSC charge = $100 \pm 3\%$; n=5, $p=0.34$). Moreover, the GABAergic charge also remained at control levels under intracellular dialysis of THL (Fig. 2C and D, THL 1 μ M; $99 \pm 3\%$; n=3, $p=0.35$). Thus the induction of DSI by patterns of action potentials required both 2-AG synthesis and CB₁R activation.

It is well established that both polarity and magnitude of long-term transmission changes at hippocampal glutamatergic synapses depend on the frequency of neuronal activity (Bliss and Lomo, 1973; Dudek and Bear, 1992; Mulkey and Malenka, 1992; Sjostrom et al., 2001). In order to determine how CA1 neuron firing governed DSI magnitude, we compared transient changes in GABAergic charge elicited by spike trains of defined number and frequency of action potentials (Fig. 2F). Brief DC steps were injected into the recorded cells to control the

number and timing of individual action potentials. Within the 10–250 Hz frequency range, a given number of action potentials triggered similar suppressions of GABAergic activity; however an increased number of action potentials at a given intra-burst frequency reduced accordingly the IPSC charge (Fig. 2G). Thus CA1 neurons can self-tune the GABAergic inhibition they receive in an activity-dependent manner.

Endocannabinoids mediate self-tuning of spike-timing in CA1 pyramidal neurons

Next we sought to determine the consequence of CB1R-mediated transient suppression of GABAergic activity on action potential firing and timing of CA1 pyramidal cells. We evoked sequences of bursts of action potentials at various intra-burst rates using DC current injections every 30 s and monitored spontaneous GABAergic activity in between (Fig. 3A₁). During these recordings small and large DC steps alternated to allow DSI recovery and prevent its build-up over time. We calculated the mean coefficient of variation of inter-spike intervals along the discharge (CV_{ISI} , see Methods) to evaluate spike-time precision as a function of DC current amplitude and associated discharge rate; a decreased in CV_{ISI} signed an improvement in spike-time precision. The highest rate discharge was kept to the 5th burst of the sequence, such that the last burst evoked by an ultimate DC step (5 s only after the 5th) was elicited when DSI was maximal. We repeated these sequences at least 4 times for each recorded cell [range 4–7] for subsequent analysis. The CV_{ISI} measured for the first 5 bursts decreased according to the increase in burst spike rate (Fig. 3A₂). The mean CV_{ISI} decreased following sustained burst discharge and related maximal DSI (Fig. 3A₃; $78\pm 5\%$ of control, $n=10$; $p<0.01$).

Next we determined the consequence of CB1R-mediated transient suppression of GABAergic activity on action potential firing and timing of CA1 pyramidal cells. We evoked sequences of bursts of action potentials at various intra-burst rates using DC current injections every 30 s and monitored spontaneous GABAergic activity in between (Fig. 3A₁). During these recordings small and large DC steps alternated to allow DSI recovery and prevent its build-up over time. We calculated the mean coefficient of variation of inter-spike intervals along the discharge (CV_{ISI} , see Methods) to evaluate spike-time precision as a function of DC current amplitude and associated discharge rate; a decreased in CV_{ISI} signed an improvement in spike-time precision. The highest rate discharge was kept to the 5th burst of the sequence, such that the last burst evoked by an ultimate DC step (5 s only after the 5th) was elicited when DSI was maximal. We repeated these sequences at least 4 times for each recorded cell [range 4–7] for subsequent analysis. The CV_{ISI} measured for the first 5 bursts decreased according to the increase in burst spike rate (Fig. 3A₂). The mean CV_{ISI} decreased following sustained burst discharge and related maximal DSI (Fig. 3A₃; $78\pm 5\%$ of control, $n=10$; $p<0.01$).

We then performed similar protocols under CB1 receptor blockade to determine whether the CB1-mediated reduction in GABAergic activity observed during DSI was required for the improvement of spike-time precision following sustained action potential discharge. In the presence of AM251 (Fig. 3B; 5 μ M), sustained discharge did not induce DSI nor improved spike-time precision ($97\pm 5\%$ of the CV_{ISI} measured in AM251, $n=8$, $p=0.2$).

If the reduced GABAergic activity observed during DSI was responsible for the improvement in spike-time precision, sustained action potential discharge should not improve spike-time precision in the presence of the GABA_A receptor blockers. Indeed spike-time precision did not improve following sustained discharge in the presence of picrotoxin (PTX, 100 μ M) (Fig. 3C; $98\pm 2\%$ of the CV_{ISI} measured in PTX; $n=8$; $p=0.5$).

Taken together these results suggested that the improvement of spike-time precision following sustained discharges reduction required a reduction in spontaneous GABAergic activity that was under the control of endocannabinoid signaling. We addressed this hypothesis directly by dynamically and randomly injecting inhibitory postsynaptic conductance waveforms (spontaneous-IPSGs; SP-IPSGs) into CA1 pyramidal cells recorded in the presence of kynurenatate (2mM) and picrotoxin (100 μ M, Fig. 3D), in order to evaluate the consequences of various levels of spontaneous GABAergic activity on excitability and spike-time precision. For the purpose of these dynamic-clamp experiments the reversal potential for GABA was set at -75mV. Changes in excitability were normalized for each individual cell by the average change in spike number at each DC step when SP-IPSGs were present. We found that the rate of spontaneous GABAergic activity predicted both changes in excitability and CV_{ISI} ; although GABAergic activity affected spike-time precision more than excitability (Fig. 3E).

Taken all together, these pharmacological and dynamic-clamp experiments pointed to the fact that the control level of spontaneous GABAergic activity or the reduced rate following DSI correlated perfectly well with the changes in CV_{ISI} measured at an equivalent discharge rate (Fig. 3 F). Indeed, the CV_{ISI} measured in drug-free conditions in control and following DSI for a mean discharge rate of 20 spikes/s were comparable to the CV_{ISI} measured with a spontaneous dynamic-clamp GABAergic activity of 33 events / s ($U(15)=15$, $Z=1.22$, $p=0.11$) and 10 events / s ($U(15)=18$, $Z=0.86$, $p=0.19$), respectively. In the presence of AM251 (5 μ M),

pyramidal cells received a higher level of spontaneous GABAergic activity ($148 \pm 23\%$ of the mean drug-free GABAergic charge; $n=8$; $p<0.05$), suggesting that a tonic release of endocannabinoids mediated the self-tuning of GABAergic inputs to CA1 pyramidal cells in drug-free conditions. The CV_{ISI} measured in AM251 ($5 \mu\text{M}$) was then comparable to the CV_{ISI} measured with a spontaneous dynamic-clamp GABAergic activity of 100 events / s. Last, CV_{isi} measured in the presence of the GABA_A receptor blocker picrotoxin (PTX, $100 \mu\text{M}$) was reduced relative to the drug-free condition ($57 \pm 5\%$ of control at 20 spikes/s, $n=8$; $p<0.05$). Taken together these results demonstrate that spontaneous GABAergic activity set the initial level of spike-time precision and conditioned, under the control of endocannabinoid signaling, the improvement of spike-time precision following sustained neuronal discharge.

Finally, in order to evaluate whether DSI affected both spike-time precision and excitability with a physiological, hyperpolarizing GABA_A reversal potential, we performed whole-cell recordings using a low chloride-based intracellular solution (Fig. 4). The mean rate of discharge was plotted against the amplitude of the first 5 DC steps to evaluate the level of excitability in the control condition. CV_{ISI} was also calculated to evaluate spike-time precision for the various DC amplitudes and associated discharge rates. DSI, induced either by a constant depolarizing current (Fig. 4A) or the replay of a place cell pattern (Fig. 4B) did not significantly change cell excitability (Fig. 4C; $98 \pm 3\%$, $n=10$, $p=0.224$). In contrast DSI improved intra-burst spike-time precision as shown by a smaller CV_{ISI} compared to the control condition at equivalent firing rate (Fig. 4D; $81 \pm 5\%$, $n=10$, $p<0.05$). Thus following sustained burst discharge of CA1 pyramidal cells, spike firing-dependent synthesis and release of endocannabinoids induces a transient suppression of GABAergic activity which improves the spike-time precision of these neurons.

Next we addressed how DSI affected the tuning of neuronal discharge in response to excitatory postsynaptic potentials (EPSPs), a phenomenon referred to as EPSP-Spike coupling. We dynamically elicited EPSPs by injecting Excitatory Postsynaptic Conductance waveforms (EPsGs) of fixed amplitude to CA1 neurons (Fig. 4E). For the purpose of this experiment, and because at resting membrane potential DSI cannot be quantified reliably with a small GABA_A driving force, we randomly injected Inhibitory Postsynaptic Conductance waveforms (IPsGs) with a reversal potential of -75mV to mimic spontaneous activity in the presence of kynureate (2mM) and picrotoxin ($100 \mu\text{M}$). DSI was modeled by an initial reduction of presynaptic activity to 10% of control, followed by a 30s exponential recovery of GABAergic charge. EPSP-Spike coupling was evaluated by measuring both EPSP-Spike latency and temporal jitter in control conditions with GABAergic activity reduced approximately to 20% and 80% for DSI and recovery, respectively. A minimum of 6 dynamic DSI (dDSI) trials, and place cell *in vivo* firing patterns associated with every other trial were performed per recorded cell to evaluate the contribution of both dDSI and *in vivo* place cell firing to EPSP-Spike coupling (see methods). We found that in the absence of endogenous GABAergic activity place cell firing patterns did not alter EPSP-Spike coupling parameters ($p=0.34$ and 0.55 for latency and jitter, respectively). Following dDSI, EPSP-Spike latency remained stable ($92 \pm 1\%$ of control latency, $n=4$, $p=0.17$) but EPSP-Spike jitter decreased ($61 \pm 5\%$ of control jitter, $n=4$, $p<0.05$, Fig 4F and G).

Taken together these results show that spontaneous GABAergic activity received by CA1 neurons correlated with their spike-time precision, and that cells' ability to tune their spike-timing relied on an endocannabinoid-mediated transient reduction in the GABAergic charge.

Feed-forward inhibition tunes EPSP-Spike time precision

Feed-forward inhibition limits EPSPs and narrows EPSP-Spike timing *in vitro* (Pouille and Scanziani, 2001). It is partially mediated by CCK/CB1-expressing interneurons (Glickfeld and Scanziani, 2006) on which axon terminals hippocampal CB1Rs are predominantly expressed (Katona et al., 1999; Tsou et al., 1999). Since our results have shown that endocannabinoid-mediated transient suppression of GABAergic charge improved EPSP-Spike-time precision, we next aim to evaluate how a transient suppression of feed-forward inhibition might tune EPSP-Spike coupling during DSI. We first placed an extracellular stimulation electrode in the *stratum radiatum* 200-400 μm from the recorded CA1 pyramidal cell body (Fig. 5A), in order to stimulate Schaffer collaterals, evoke both a monosynaptic EPSC and a disynaptic IPSC (Pouille and Scanziani, 2001) and evaluate the consequence of a depolarization on both amplitude responses (Fig. 5B). We observed that a 1s depolarization to 0mV reliably elicited within 5 seconds a transient reduction of the GABAergic response (Fig. 5C) explained by a reduced disynaptic IPSCs (Fig. 5D; eIPSC; $76 \pm 2\%$, $n=4$, $p<0.05$) while the monosynaptic EPSC remained unaffected (Fig. 5D; eEPSC; $105 \pm 6\%$; $n=4$, $p=0.34$). Thus, the depolarization of CA1 pyramidal cells transiently increased the excitatory/inhibitory input ratio, as the feed-forward inhibition was depressed while the excitatory drive from the Schaffer collaterals remained constant.

Feed-forward inhibition has been demonstrated to improve spike-time precision when EPSP-spike timing was evaluated for a constant EPSP-Spike coupling probability of 0.5 (Pouille and Scanziani, 2001). Because our results showed that DSI was not associated with a change in Schaffer collateral EPSC amplitude (Fig. 5D), we

decided to test EPSP-Spike coupling when excitatory inputs remained constant while increasing the excitatory/inhibitory input ratio. Thus we evaluated how variable disynaptic IPSPs affected spike-timing for constant EPSPs. We dynamically injected EPSPs followed with a 2ms delay by IPSPs – referred to as FF-IPSPs – into CA1 pyramidal cells such that both EPSP-Spike latency and jitter could be evaluated for the full range of EPSP-Spike coupling probabilities (see Methods). The probability of EPSP-Spike coupling was reduced as the FF-IPSP amplitude increased (Fig. 5E, F). In contrast a bell-shaped response curve of EPSP-Spike latency was observed as a function of IPSP amplitude (Fig. 5G). A disynaptic dependent biphasic relationship between the EPSP-Spike precision, as measured by the spike jitter, and the spike coupling probability was observed in all recorded cells (Fig. 5H; n=4). Indeed, EPSP-Spike latencies first distributed in a broader time-window as FF-IPSP amplitude increased (Fig. 5G); the maximum jitter was observed for a mean coupling probability of 0.50 ± 0.06 (Fig. 5H). A further increase in disynaptic IPSP amplitude reduced both the mean latency (Fig. 5G) and jitter (Fig. 5H).

These results imply that the integration time-window for Schaffer collateral EPSPs was dependent on the recruitment of GABAergic interneurons mediating disynaptic inhibition and followed a biphasic tuning bound to the initial EPSP-Spike coupling probability. Since a depolarization-induced suppression of correlated inhibition was observed in CA1 pyramidal neurons, spike-time precision could either be increased or decreased according to the initial contribution of correlated inhibition to EPSP-Spike coupling. The coexistence of correlated (evoked) and uncorrelated (spontaneous) GABAergic inhibitions suggested important consequences on the integration time-window of excitatory inputs by CA1 pyramidal neurons, depending on the relative contribution of both types of inhibition before and after place cell discharge activity, and the consecutive mobilization of endocannabinoid signaling pathways.

Theoretical contribution of spontaneous and feed-forward inhibition to EPSP-Spike coupling

In order to evaluate the tuning of EPSP-Spike coupling by coexisting spontaneous and feed-forward inhibition, we used a “Leaky Integrate and Fire” with “Random action potential Threshold” (RT-LIF) model, as it focuses on subthreshold membrane properties while excluding the mechanisms underlying action potential generation (Holden, 1976; Manwani et al., 2002). Moreover such a model fairly reproduces the spike-time jitter attributed to the stochastic properties of voltage-dependent ion channels (Caillard, 2011). In a first series of simulations the model received various excitatory inputs represented by EPSPs of different amplitudes [0-100nS], combined or not with spontaneous GABAergic activity, referred to as SP-IPSP [0-250 Events/s] (Fig. 6A-D). In the absence of inhibition, only the EPSP amplitude determined both EPSP-Spike coupling probability and spike-time precision. Once spontaneous GABAergic activity was added to the model both EPSP-Spike latency and jitter (as expressed by SD of latency, Fig 6B) increased with SP-IPSP rate. Thus spontaneous GABAergic activity reduces EPSP-Spike coupling probability (Fig. 6C) and increases spike latency and jitter at any given EPSP amplitude (Fig. 6D)

In the second series of simulations, the same range of EPSPs was injected into the model in association with feed-forward GABAergic activity as represented by correlated IPSPs of various amplitudes [0-100nS] (Fig. 6E-H); these feed-forward IPSPs – referred to as FF-IPSP – were elicited 2ms after the beginning of each EPSP. In this case, the relationships between spike-time jitter, EPSP-Spike coupling probability and EPSP/FF-IPSP relative amplitudes were distinguishable (Fig. 6E-H). As EPSP amplitude increased the transition between spike success and failure covered a wider range of feed-forward IPSP amplitudes, but this range remained narrower than in the simulation using spontaneous GABAergic activity. For instance, with a 80nS EPSP (Fig. 6B and 6F), a decrease in EPSP-Spike coupling probability from 0.9 to 0.1 required an increase in spontaneous GABAergic charge by a factor of 14, but only increasing 1.5 times the feed-forward GABAergic charge. Both spike-time latency and jitter (Fig 6F) increased with the amplitude of FF-IPSP until EPSP-Spike probability dropped to 0.5 (Fig 6F and Fig 6G); however a further increase of FF-IPSP then decreased these two key features of EPSP-Spike coupling.

To identify the mechanism underlying this biphasic tuning of EPSP-Spike coupling, we next determined how feed-forward inhibition affected EPSP amplitude and kinetics, and correlated these parameters with spike coupling. The firing was cancelled in the model in order to visualize the EPSP/IPSP kinetics. In the absence of feed-forward inhibition (Fig. 6E, left panel), EPSPs crossed the spike threshold rapidly and as a consequence both the mean spike latency and jitter were small (Fig. 6I; 0nS, red trace). Increasing the feed-forward inhibition reduced EPSP amplitude and shortened EPSP decay time constant (Fig. 6I; 39 nS, blue trace). In these conditions EPSP-Spike coupling probability fell to 0.5 (Fig 6E, middle panels), EPSP peak remained in the lower part of the Gaussian noise distribution of spike threshold. As a consequence spike latency was distributed in the widest range (Fig. 6J; 3.1 ± 0.4 ms). Finally, for stronger feed-forward inhibition EPSP-Spike coupling probability

dropped to 0.03 (Fig 6E, right panels). Because EPSP peak amplitude was low with respect to spike threshold, the fast repolarization shortened the time window during which EPSP could elicit an action potential (Fig. 6I, 60 nS; green trace). As a consequence spikes were rarely fired, and occurred within a short and narrow latency range (Fig. 6J; 2.6 ± 0.3 ms). Therefore, both the amplitude and the repolarization rate of the EPSP/IPSP sequence determined the broadness of the integration time window, with respect to the fluctuating spike threshold for action potential generation. With these mechanisms, the RT-LIF model matched the experimental data showing that feed-forward inhibition can tune EPSP-Spike time precision, and that it correlated with EPSP-Spike coupling probability.

Finally, we determined how the simultaneous presence of spontaneous and feed-forward inhibition affected EPSP-Spike coupling by injecting a fixed excitatory input (80nS EPSP) in the model and measuring its spike coupling (Fig. 7). We first found that increasing spontaneous activity [range 0-100 SP-IPSP events/s] while maintaining the feed-forward inhibition constant [39nS FF-IPSP] reduced EPSP-Spike coupling probability below its 0.5 initial value but had no effect on spike-time latency and precision (Fig. 7A and B). However, increasing the feed-forward inhibition [range 0-70nS FF-IPSPs] while maintaining constant the spontaneous inhibition rate (50 SP-IPSP events/s) reduced the EPSP-Spike coupling probability below its 0.5 initial value as previously, but also decreased both EPSP-Spike jitter (Fig. 7C and D). Thus, a DSI of spontaneous GABAergic activity would not be associated with any change in EPSP-spike time precision if FFI is present and insensitive to DSI.

In contrast to the simulation performed without spontaneous inhibition (Fig. 6F), feed-forward inhibition was only associated with an improvement of spike time precision as the biphasic tuning of EPSP-Spike timing was not observed (Fig. 7C and 7D). Thus, a DSI of FFI would not be associated with a disruption in EPSP-spike time precision if spontaneous GABAergic activity is present and insensitive to DSI.

Last, when both feed-forward and spontaneous inhibition were simultaneously present and varied with a constant SP-IPSP/FF-IPSP ratio, increasing both types of inhibition reduced EPSP-Spike coupling probability but biphasically tuned EPSP-Spike latencies and jitter responses (Fig. 7 E and F). Increasing both types of inhibition increased EPSP-Spike latency and jitter until 0.5 coupling probability, at which the spike-time jitter was the largest (0.52 ms). From this maximal jitter disruption, further increasing inhibition reduced both latency and jitter. Thus tuning of spike-time precision was governed by the relative contribution of the two combined forms of inhibition during DSI: DSI of feed-forward inhibition imposed a biphasic response of spike time jitter, unless spontaneous inhibition was sufficiently high to prevent this biphasic time code (Fig. 7G and H).

Discussion

In this study we established that CA1 hippocampal place cells self-tune intrinsic excitability and spike-timing, via an eCB-mediated transient suppression of their spontaneous GABAergic inputs. When the spatially-selective firing patterns of place cells recorded *in vivo* during a spatial learning were injected *in vitro*, they could reach the threshold for DSI induction. Pyramidal cell spike dynamics integrated over a broad time-scale to set the DSI level and its maintenance. A fine interplay between CB1R-dependent GABAergic synaptic input activity and excitatory drive, both received by the discharging cell, conditioned the consequence of DSI on spike-timing precision.

DSI and hippocampal memory processes

DSI is the most widely studied form of eCB-mediated short-term plasticity, but whether it can be induced by physiological firing patterns remained to be determined. Here we successfully induced DSI injecting waking patterns of CA1 place cells discharge recorded during a spatial task where rats learnt to locate hidden rewards on a cheeseboard maze (Dupret et al., 2010). This DSI was mediated by eCB signaling and increased spike-time precision of the discharging cell. Elevated brain levels of eCB, due to genetic deletion of the primary catabolic enzyme of the eCB anandamide, improved aspects of spatial memory (Varvel et al., 2007). Similarly, genetic deletion of the 2-AG degrading enzyme monoacylglycerol lipase altered CA1 DSI and enhanced spatial memory (Pan et al., 2011). Thus, in addition to previously reported place cell firing-dependent changes in synaptic transmission (Isaac et al., 2009), self-tuned spike-timing precision by eCB-mediated DSI constitutes a likely mechanism underlying the contribution of eCB to memory formation.

CB1 receptors control the release of GABA at CCK-expressing output synapses (Katona et al., 1999; Tsou et al., 1999; Pan et al., 2011). CCK-expressing GABAergic interneurons are a heterogeneous family of interneurons that innervate pyramidal cells on their somatic and dendritic domains (Klausberger and Somogyi, 2008). During repetitive discharges of hippocampal principal cells, these interneurons display an asynchronous mode of GABA release (Losonczy et al., 2004; Hefft and Jonas, 2005; Foldy et al., 2006; Karson et al., 2008). Spatially-selective firing of place cells is expressed during active waking behavior at times when the network is dominated by theta oscillations (4-10Hz). During theta oscillations, CCK-expressing interneurons preferentially fire on the ascending phase, at times when some CA1 place cells start firing as the animal enters their place fields (Klausberger et al., 2005; Klausberger and Somogyi, 2008). Moreover, place cells also exhibit a gradual phase shift relative to theta rhythm as the animal passes through the place field (phase precession, O'Keefe and Recce, 1993). Therefore, the activity-dependent transient suppression of CCK-expressing cell outputs by 2-AG released following place cell infield discharge can improve spike-time precision on consecutive theta cycles, support the segregation of spatially-selective pyramidal cells forming distinct assemblies, and contribute to theta-paced dynamic flickering of hippocampal place-cell maps (Jezek et al., 2011). Many place cells fire at goal locations during goal-oriented tasks, indicating that salient locations are represented in the hippocampal code (Markus et al., 1995; Hollup et al., 2001; Hok et al., 2007). Place cells encoding such locations showed increased firing synchronization during waking sharp-wave/ripple (SWR, 150-250Hz) events (O'Neill et al., 2006; Dupret et al., 2010). Therefore it is likely that coincident firing of place cells related to goal locations provide additional 2-AG levels and DSI. Moreover, SWR-related firing synchronization of pyramidal cells also occurs during off-line periods at times when memory traces are thought to be consolidated (O'Neill et al., 2010). During SWRs, individual CCK-expressing interneurons exhibited highly variable firing responses, in contrast to the reliable increased firing of PV-expressing basket cells for instance (Klausberger et al., 2005). Because asynchronous GABA release from CCK-expressing outputs outlasts ripple episodes (Karson et al., 2009), DSI may provide an efficient retrograde presynaptic mechanism to shutdown asynchronous GABA release from CCK-expressing cells and let pyramidal cells fire synchronously, therefore favoring cell assembly formation and expression.

Place cell activity, DSI firing requirement and endocannabinoids

In this study we confirmed that spike train duration determined the magnitude of DSI (Pitler and Alger, 1992). However the broad time-window observed for the build-up of DSI contrasted with the firing requirements, especially at low (<20 Hz) inter-spike intervals, that were previously reported in the hippocampus (Hampson et al., 2003; Zhuang et al., 2005) but not in the neocortex (Fortin et al., 2004). The DSI observed at low (10Hz) firing frequencies, together with the slow time course for DSI recovery, suggested that the amplitude and kinetics of the postsynaptic calcium transients required for mobilizing the eCB pathway (Lenz and Alger, 1999; Myoga et al., 2009; Wang and Zucker, 2001) were respectively large and slow enough to provide long-lasting increases in $[Ca^{2+}]_i$ and induce DSI. Brain states or task contingencies influence firing rates in the

hippocampus (McNaughton et al., 1983;Muller et al., 1994) and so does behavioral context and experience. For instance, large gradual changes in firing rates were reported when the rat followed consecutively a same specified path, according to the place field crossing direction (Navratilova et al., 2012). Thus, the capacity of a place cell to control its CB1R-dependent GABAergic inputs relies on its firing dynamics and pyramidal neurons actively engaged in information processing should therefore reach the threshold for DSI induction. Other less active or weakly spatially-tuned place cells, may not fire a sufficient number of spikes to induce a significant DSI (Hampson et al., 2003).

Carbachol, added to the extracellular medium enhances the frequency of spontaneous IPSCs (Pitler and Alger, 1992) and enhances DSI in CA1 pyramidal neurons (Pitler and Alger, 1994;Martin and Alger, 1999;Martin et al., 2001;Kim et al., 2002) through the activation of postsynaptic M1 and M3 receptors (Ohno-Shosaku et al., 2003). The number of action potentials required for DSI induction may thus be linked to endogenous release of acetylcholine. Indeed, endogenous release of acetylcholine affected GABA release and DSI magnitude (Pitler and Alger, 1994;Martin et al., 2001;Nagode et al., 2011).Tonic activation of the cholinergic system in the hippocampus nevertheless appears relevant when studying synaptic transmission and plasticity *in vitro*. In fact, microdialysis measurements of acetylcholine in the hippocampus have revealed marked increases in the basal levels during locomotion, exploration and spatial learning (for review see Pepeu and Giovannini, 2004).

Different reasons can account for the low activity threshold for DSI induction reported here, compared to a previous report (Hampson et al. (2003). Not only magnitude but also recovery time course increases with the duration of postsynaptic depolarization or action potential number during discharge (Pitler and Alger, 1992;Zhuang et al., 2005;Fortin et al., 2004).

Given the fact that DSI magnitude decays exponentially with time following its induction, delaying the time window during which DSI is measured after its induction will reduce its magnitude apparent lower DSI magnitude for a given protocol. In the present study we have measured DSI in the 4 seconds that followed action potential discharge. Therefore the firing discharge required for successfully inducing a significant DSI will appear to be lower than expected from previous studies where DSI magnitude was evaluated later following DSI induction (4-7 seconds after the end of induction protocol; Hampson et al. 2003). Indeed if taking into account a mean 25 s monoexponential decay from a DSI of 60% when measured at 0-4 s after induction (our results), delaying DSI to 4-7 s would reduce it to 50% corresponding to a DSI reduction of 17%.

Next, the age of the animals is critical for DSI induction. In immature animals DSI has been reported to be weak (Zhuang et al., 2005;Zhu and Lovinger, 2010). Therefore, the activity of a given place cell may not be sufficient to induce DSI in a one week old animal (Hampson et al., 2003), but adequate later in development. So far, the earliest reported stage for place cell recordings in rat is P22 (Scott et al., 2011). At this age place cells are few in number, exhibit low firing rates and their place fields are small when compared to more mature animals (Scott et al., 2011). It is tempting to speculate that, if DSI is relevant for cognitive processes requiring proper hippocampal function, the delayed maturation of eCB signaling together with reduced firing activity may be partly responsible for the low spatial behavior score measured in young animals.

GABAergic contribution to spike-time precision

Our experiments revealed that a transient reduction in CB1R-dependent spontaneous GABAergic activity improved spike-time precision of discharging pyramidal cells. This self-tuned improvement of spike-time precision was achieved: 1) during DSI; 2) after pharmacological blockade of GABA_A receptors with PTX; 3) when the rate of dynamic GABA_A events was reduced. However, DSI was not associated with an increase in pyramidal cell firing. Although carbachol (5 μ M, applied in the bath) reduced Ca²⁺-dependent K⁺ conductances activated during DSI (Pitler and Alger, 1992), we observed transient shifts in the holding current. Such shifts likely reflected the incomplete blockade of these conductances known to control excitability after repetitive discharges in a feed-back manner (Madison and Nicoll, 1984). It is likely that DSI counterbalanced the reduction in intrinsic excitability. In fact, dynamic injection of IPSPs at various rates demonstrated that spontaneous GABAergic activity was associated with a reduction of excitability. Nevertheless these changes remained proportionally much smaller than the changes in jitter. DSI-mediated reduction in jitter were observed both with high (Fig. 3) or low chloride (Fig. 4) based intracellular solutions, confirming that inward or outward GABAergic currents disrupt spike-time reliability depending on the difference between GABA_A reversal and spike threshold (Caillard, 2011).

In order to evaluate the impact of DSI on EPSP-Spike coupling, we have considered time, frequency and amplitude variations in GABAergic conductance for constant excitatory conductance.

A consensual correlation exists between the transience of an excitatory signal and its ability to precisely time a spike, when the excitatory input signal amplitude is scaled up or down in order to maintain a constant spike coupling probability (Mainen and Sejnowski, 1995;Jaeger and Bower, 1999;Pouille and Scanziani,

2001;Axmacher and Miles, 2004;Mittmann et al., 2005;Cudmore et al., 2010;Gastrein et al., 2011). Measuring simultaneously Schaffer collateral EPSCs and disynaptic IPSCs showed no significant changes in EPSC amplitude during DSI. The transient changes in EPSC amplitude observed in a subset of cells were likely due to the temporal overlap of the reduced IPSC (Wagner and Alger, 1996). In hippocampal cell cultures, both excitatory and inhibitory synapses can be depressed by exogenous cannabinoid agonists or postsynaptic depolarization, but the cannabinoid sensitivity of excitatory synapses appeared lower than GABAergic synapses (Ohno-Shosaku et al., 2002;Xu et al., 2010), such that the physiological conditions for eCB-mediated transient reduction in excitatory synaptic transmission may be reached but only under conditions allowing a large increase in postsynaptic calcium concentration (Nakamura et al., 1999).

When GABAergic and glutamatergic activities were uncorrelated, i.e. in the presence of spontaneous activity, the disruption of spike-time jitter was proportional to the rate of spontaneous GABAergic activity, and was appropriately represented by our modeling study (Fig. 6). Therefore, during DSI, a transient improvement in spike-time precision was observed, either when the cell integrated phasic glutamatergic inputs or when it integrated summed uncorrelated inputs, giving rise to a repetitive discharge of action potentials. In contrast, when excitatory and inhibitory inputs correlated in time through the disynaptic recruitment of presynaptic interneurons, the relationship between the amplitude of the IPSC and EPSP-Spike parameters were more complex and dependent on the initial EPSP-Spike coupling probability (Fig. 5 and 6). In our model, voltage fluctuations before spike initiation explained how modulation of EPSP amplitude and decay kinetics by disynaptic inhibition affected EPSP-Spike timing in a biphasic manner. During DSI, the reduction in disynaptic inhibition, together with the initial EPSP-Spike coupling probability were critical for defining qualitatively and quantitatively the impact on EPSP-Spike timing. When EPSP-Spike coupling probabilities were reduced by the presence of spontaneous GABAergic activity, DSI of correlated GABAergic activity was only associated with disrupted spike-timing (Fig. 7D and H). On the other hand, when feed-forward inhibition was present and reduced coupling probability to at least 50%, spike-timing was exclusively controlled by disynaptic inhibition. Feed-forward inhibition being only partly mediated by CB1R-expressing interneurons (Glickfeld et al., 2008;Glickfeld and Scanziani, 2006), this earlier component of disynaptic inhibition should be relatively insensitive to DSI, when compared to feedback inhibition. Enhancement of spike firing probability during DSI would therefore be mainly supported by uncorrelated inhibition (Fig.7 B and H). Nevertheless, as observed in our recordings, coincident reduction in both uncorrelated and correlated inhibition during DSI should affect spike-time precision in a biphasic manner while increasing EPSP-Spike probability, the spike-time window being the broadest when probability of spike occurrence is around 0.5. Because of the lack of data on the temporal structure of the excitatory and inhibitory inputs received by place cells during behavioral tasks, these alternative hypotheses remain theoretical at present. Whole-cell recordings in the hippocampus of freely moving rodents have been achieved recently (Lee et al., 2006;Harvey et al., 2009). Combining such techniques with intracellular dialysis of eCB biosynthesis inhibitors or local perfusion of either CB1R antagonists or eCB degradation inhibitors will certainly provide important data to understand the physiological relevance and consequences of self-tuning CB1R-dependent GABAergic inputs following place cell activity on both spike-timing coordination and network oscillations in the hippocampus.

Acknowledgements

This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Centre National pour la Recherche Scientifique (CNRS), and by a grant from the Fondation Française pour la Recherche sur l'Epilepsie (FFRE). Part of the equipment used in this study were funded by European Community (LSHM-CT-2004-511995), Agence Nationale pour la Recherche (ANR 06-Neuro-014-01) and région PACA (APO 'Plexin') grants attributed to D. Debanne. Salary support of F. Dubruc was provided by région PACA (APO 'Plexin') doctoral studentship and Neuroservice (B. Buisson). D.Dupret was supported by a MRC Intramural Programme Grant (U138197111). We wish to thank J. Csicsvari for sharing spike-time occurrence of place cells during *in vivo* recordings of behavioral tasks, M. Manko for her constructive comments on a previous version of the manuscript, L.S. Milescu for help in installing and tuning QuB dynamic clamp system, L. Fronzaroli-Molinieres and C. Gomez for technical assistance, the members of INSERM UMR 1072 for helpful comments and suggestions during completion of this work, D. Debanne and M. Seagar for critical reading of the manuscript.

References

- Axmacher N, Miles R (2004) Intrinsic cellular currents and the temporal precision of EPSP-action potential coupling in CA1 pyramidal cells. *J Physiol* 555:713-725.
- Bliss TVP, Lomo T (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol (Lond)* 232:331-356.
- Caillard O (2011) Pre & postsynaptic tuning of action potential timing by spontaneous GABAergic activity. *PLoS One* 6:e22322.
- Carlson G, Wang Y, Alger BE (2002) Endocannabinoids facilitate the induction of LTP in the hippocampus. *Nat Neurosci* 5:723-724.
- Cudmore RH, Fronzaroli-Molinieres L, Giraud P, Debanne D (2010) Spike-time precision and network synchrony are controlled by the homeostatic regulation of the D-type potassium current. *J Neurosci* 30:12885-12895.
- Debanne D, Boudkazi S, Campanac E, Cudmore RH, Giraud P, Fronzaroli-Molinieres L, Carlier E, Caillard O (2008) Paired-recordings from synaptically coupled cortical and hippocampal neurons in acute and cultured brain slices. *Nat Protoc* 3:1559-1568.
- Dudek SM, Bear MF (1992) Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:4363-4367.
- Dupret D, O'Neill J, Pleydell-Bouverie B, Csicsvari J (2010) The reorganization and reactivation of hippocampal maps predict spatial memory performance. *Nat Neurosci* 13:995-1002.
- Foldy C, Neu A, Jones MV, Soltesz I (2006) Presynaptic, activity-dependent modulation of cannabinoid type 1 receptor-mediated inhibition of GABA release. *J Neurosci* 26:1465-1469.
- Fortin DA, Trettel J, Levine ES (2004) Brief trains of action potentials enhance pyramidal neuron excitability via endocannabinoid-mediated suppression of inhibition. *J Neurophysiol* 92:2105-2112.
- Freund TF, Katona I, Piomelli D (2003) Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev* 83:1017-1066.
- Gao Y, et al. (2010) Loss of retrograde endocannabinoid signaling and reduced adult neurogenesis in diacylglycerol lipase knock-out mice. *J Neurosci* 30:2017-2024.
- Gastrein P, Campanac E, Gassel C, Cudmore RH, Bialowas A, Carlier E, Fronzaroli-Molinieres L, Ankri N, Debanne D (2011) The role of hyperpolarization-activated cationic current in spike-time precision and intrinsic resonance in cortical neurons in vitro. *J Physiol* 589:3753-3773.
- Glickfeld LL, Atallah BV, Scanziani M (2008) Complementary modulation of somatic inhibition by opioids and cannabinoids. *J Neurosci* 28:1824-1832.
- Glickfeld LL, Scanziani M (2006) Distinct timing in the activity of cannabinoid-sensitive and cannabinoid-insensitive basket cells. *Nat Neurosci* 9:807-815.
- Hampson RE, Zhuang SY, Weiner JL, Deadwyler SA (2003) Functional significance of cannabinoid-mediated, depolarization-induced suppression of inhibition (DSI) in the hippocampus. *J Neurophysiol* 90:55-64.
- Han J, Kesner P, Metna-Laurent M, Duan T, Xu L, Georges F, Koehl M, Abrous DN, Mendizabal-Zubiaga J, Grandes P, Liu Q, Bai G, Wang W, Xiong L, Ren W, Marsicano G, Zhang X (2012) Acute cannabinoids impair working memory through astroglial CB1 receptor modulation of hippocampal LTD. *Cell* 148:1039-1050.
- Harris KD, Hirase H, Leinekugel X, Henze DA, Buzsaki G (2001) Temporal interaction between single spikes and complex spike bursts in hippocampal pyramidal cells. *Neuron* 32:141-149.

- Harvey CD, Collman F, Dombeck DA, Tank DW (2009) Intracellular dynamics of hippocampal place cells during virtual navigation. *Nature* 461:941-946.
- Hefft S, Jonas P (2005) Asynchronous GABA release generates long-lasting inhibition at a hippocampal interneuron-principal neuron synapse. *Nat Neurosci* 8:1319-1328.
- Hok V, Lenck-Santini PP, Roux S, Save E, Muller RU, Poucet B (2007) Goal-related activity in hippocampal place cells. *J Neurosci* 27:472-482.
- Holden AV (1976) Models of stochastic activity of neurones. New York: Springer-Verlag.
- Hollup SA, Molden S, Donnett JG, Moser MB, Moser EI (2001) Accumulation of hippocampal place fields at the goal location in an annular watermaze task. *J Neurosci* 21:1635-1644.
- Isaac JTR, Buchanan KA, Muller RU, Mellor JR (2009) Hippocampal place cell firing patterns can induce long-term synaptic plasticity in vitro. *J Neurosci* 29:6840-6850.
- Jaeger D, Bower JM (1999) Synaptic control of spiking in cerebellar Purkinje cells: dynamic current clamp based on model conductances. *J Neurosci* 19:6090-6101.
- Jezek K, Henriksen EJ, Treves A, Moser EI, Moser MB (2011) Theta-paced flickering between place-cell maps in the hippocampus. *Nature* 478:246-249.
- Kano M, Ohno-Shosaku T, Hashimoto-dani Y, Uchigashima M, Watanabe M (2009) Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol Rev* 89:309-380.
- Karson MA, Tang AH, Milner TA, Alger BE (2009) Synaptic cross talk between perisomatic-targeting interneuron classes expressing cholecystokinin and parvalbumin in hippocampus. *J Neurosci* 29:4140-4154.
- Karson MA, Whittington KC, Alger BE (2008) Cholecystokinin inhibits endocannabinoid-sensitive hippocampal IPSPs and stimulates others. *Neuropharmacology* 54:117-128.
- Katona I, Sperlagh B, Sik A, Kafalvi A, Vizi ES, Mackie K, Freund TF (1999) Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *J Neurosci* 19:4544-4558.
- Kentros C, Hargreaves E, Hawkins RD, Kandel ER, Shapiro M, Muller RV (1998) Abolition of long-term stability of new hippocampal place cell maps by NMDA receptor blockade. *Science* 280:2121-2126.
- Kim J, Isokawa M, Ledent C, Alger BE (2002) Activation of muscarinic acetylcholine receptors enhances the release of endogenous cannabinoids in the hippocampus. *J Neurosci* 22:10182-10191.
- Klausberger T, Marton LF, O'Neill J, Huck JH, Dalezios Y, Fuentealba P, Suen WY, Papp E, Kaneko T, Watanabe M, Csicsvari J, Somogyi P (2005) Complementary roles of cholecystokinin- and parvalbumin-expressing GABAergic neurons in hippocampal network oscillations. *J Neurosci* 25:9782-9793.
- Klausberger T, Somogyi P (2008) Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science* 321:53-57.
- Lee AK, Manns ID, Sakmann B, Brecht M (2006) Whole-cell recordings in freely moving rats. *Neuron* 51:399-407.
- Lenz RA, Alger BE (1999) Calcium dependence of depolarization-induced suppression of inhibition in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Physiol* 521 Pt 1:147-157.
- Losonczy A, Biro AA, Nusser Z (2004) Persistently active cannabinoid receptors mute a subpopulation of hippocampal interneurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:1362-1367.
- Madison DV, Nicoll RA (1984) Control of the repetitive discharge of rat CA 1 pyramidal neurones in vitro. *J Physiol* 354:319-331.

- Mainen ZF, Sejnowski TJ (1995) Reliability of spike timing in neocortical neurons. *Science* 268:1503-1506.
- Makara JK, Mor M, Fegley D, Szabo SI, Kathuria S, Astarita G, Duranti A, Tontini A, Tarzia G, Rivara S, Freund TF, Piomelli D (2005) Selective inhibition of 2-AG hydrolysis enhances endocannabinoid signaling in hippocampus. *Nat Neurosci* 8:1139-1141.
- Manwani A, Steinmetz PN, Koch C (2002) The impact of spike timing variability on the signal-encoding performance of neural spiking models. *Neural Comput* 14:347-367.
- Markus EJ, Qin YL, Leonard B, Skaggs WE, McNaughton BL, Barnes CA (1995) Interactions between location and task affect the spatial and directional firing of hippocampal neurons. *J Neurosci* 15:7079-7094.
- Martin LA, Alger BE (1999) Muscarinic facilitation of the occurrence of depolarization-induced suppression of inhibition in rat hippocampus. *Neuroscience* 92:61-71.
- Martin LA, Wei DS, Alger BE (2001) Heterogeneous susceptibility of GABA(A) receptor-mediated IPSCs to depolarization-induced suppression of inhibition in rat hippocampus. *J Physiol* 532:685-700.
- McNaughton BL, Barnes CA, O'keefe J (1983) The contributions of position, direction, and velocity to single unit activity in the hippocampus of freely-moving rats. *Exp Brain Res* 52:41-49.
- Milescu LS, Yamanishi T, Ptak K, Mogri MZ, Smith JC (2008) Real-time kinetic modeling of voltage-gated ion channels using dynamic clamp. *Biophys J* 95:66-87.
- Mittmann W, Koch U, Hausser M (2005) Feed-forward inhibition shapes the spike output of cerebellar Purkinje cells. *J Physiol* 563:369-378.
- Mulkey RM, Malenka RC (1992) Mechanisms underlying induction of homosynaptic Long-term depression in area CA1 of the hippocampus. *Neuron* 9:967-975.
- Muller RU, Bostock E, Taube JS, Kubie JL (1994) On the directional firing properties of hippocampal place cells. *J Neurosci* 14:7235-7251.
- Myoga MH, Beierlein M, Regehr WG (2009) Somatic spikes regulate dendritic signaling in small neurons in the absence of backpropagating action potentials. *J Neurosci* 29:7803-7814.
- Nagode DA, Tang AH, Karson MA, Klugmann M, Alger BE (2011) Optogenetic Release of ACh Induces Rhythmic Bursts of Perisomatic IPSCs in Hippocampus. *PLoS One* 6:e27691.
- Nakamura T, Barbara JG, Nakamura K, Ross WN (1999) Synergistic release of Ca²⁺ from IP₃-sensitive stores evoked by synaptic activation of mGluRs paired with backpropagating action potentials [see comments]. *Neuron* 24:727-737.
- Navratilova Z, Hoang LT, Schwindel CD, Tatsuno M, McNaughton BL (2012) Experience-dependent firing rate remapping generates directional selectivity in hippocampal place cells. *Front Neural Circuits* 6:6.
- O'keefe J, Conway DH (1978) Hippocampal place units in the freely moving rat: why they fire where they fire. *Exp Brain Res* 31:573-590.
- O'keefe J, 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'keefe J, Recce ML (1993) Phase relationship between hippocampal place units and the EEG theta rhythm. *Hippocampus* 3:317-330.
- O'Neill J, Pleydell-Bouverie B, Dupret D, Csicsvari J (2010) Play it again: reactivation of waking experience and memory. *Trends Neurosci* 33:220-229.
- O'Neill J, Senior T, Csicsvari J (2006) Place-selective firing of CA1 pyramidal cells during sharp wave/ripple network patterns in exploratory behavior. *Neuron* 49:143-155.

- O'Neill J, Senior TJ, Allen K, Huxter JR, Csicsvari J (2008) Reactivation of experience-dependent cell assembly patterns in the hippocampus. *Nat Neurosci* 11:209-215.
- Ohno-Shosaku T, Matsui M, Fukudome Y, Shosaku J, Tsubokawa H, Taketo MM, Manabe T, Kano M (2003) Postsynaptic M1 and M3 receptors are responsible for the muscarinic enhancement of retrograde endocannabinoid signalling in the hippocampus. *Eur J Neurosci* 18:109-116.
- Ohno-Shosaku T, Tsubokawa H, Mizushima I, Yoneda N, Zimmer A, Kano M (2002) Presynaptic cannabinoid sensitivity is a major determinant of depolarization-induced retrograde suppression at hippocampal synapses. *J Neurosci* 22:3864-3872.
- Pan B, Wang W, Zhong P, Blankman JL, Cravatt BF, Liu QS (2011) Alterations of endocannabinoid signaling, synaptic plasticity, learning, and memory in monoacylglycerol lipase knock-out mice. *J Neurosci* 31:13420-13430.
- Pepcu G, Giovannini MG (2004) Changes in acetylcholine extracellular levels during cognitive processes. *Learn Mem* 11:21-27.
- Pitler TA, Alger BE (1992) Postsynaptic spike firing reduces synaptic GABA_A responses in hippocampal pyramidal cells. *J Neurosci* 12:4122-4132.
- Pitler TA, Alger BE (1994) Depolarization-induced suppression of GABAergic inhibition in rat hippocampal pyramidal cells: G protein involvement in a presynaptic mechanism. *Neuron* 13:1447-1455.
- Pouille F, Scanziani M (2001) Enforcement of temporal fidelity in pyramidal cells by somatic feed-forward inhibition. *Science* 293:1159-1163.
- Puighermanal E, Marsicano G, Busquets-Garcia A, Lutz B, Maldonado R, Ozaita A (2009) Cannabinoid modulation of hippocampal long-term memory is mediated by mTOR signaling. *Nat Neurosci* 12:1152-1158.
- Ranck JB, Jr. (1973) Studies on single neurons in dorsal hippocampal formation and septum in unrestrained rats. I. Behavioral correlates and firing repertoires. *Exp Neurol* 41:461-531.
- Robbe D, Montgomery SM, Thome A, Rueda-Orozco PE, McNaughton BL, Buzsaki G (2006) Cannabinoids reveal importance of spike timing coordination in hippocampal function. *Nat Neurosci* 9:1526-1533.
- Schwartzkroin PA (1975) Characteristics of CA1 neurons recorded intracellularly in the hippocampal in vitro slice preparation. *Brain Res* 85:423-436.
- Scott RC, Richard GR, Holmes GL, Lenck-Santini PP (2011) Maturation dynamics of hippocampal place cells in immature rats. *Hippocampus* 21:347-353.
- Sjostrom PJ, Turrigiano GG, Nelson SB (2001) Rate, timing, and cooperativity jointly determine cortical synaptic plasticity. *Neuron* 32:1149-1164.
- Storm JF (1987) Action potential repolarization and a fast after-hyperpolarization in rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol* 385:733-759.
- Tanimura A, Yamazaki M, Hashimoto Y, Uchigashima M, Kawata S, Abe M, Kita Y, Hashimoto K, Shimizu T, Watanabe M, Sakimura K, Kano M (2010) The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol produced by diacylglycerol lipase alpha mediates retrograde suppression of synaptic transmission. *Neuron* 65:320-327.
- Tsou K, Mackie K, Sanudo-Pena MC, Walker JM (1999) Cannabinoid CB1 receptors are localized primarily on cholecystinin-containing GABAergic interneurons in the rat hippocampal formation. *Neuroscience* 93:969-975.
- Varvel SA, Anum EA, Lichtman AH (2005) Disruption of CB(1) receptor signaling impairs extinction of spatial memory in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 179:863-872.

- Varvel SA, Wise LE, Niyuhire F, Cravatt BF, Lichtman AH (2007) Inhibition of fatty-acid amide hydrolase accelerates acquisition and extinction rates in a spatial memory task. *Neuropsychopharmacology* 32:1032-1041.
- Wagner JJ, Alger BE (1996) Increased neuronal excitability during depolarization-induced suppression of inhibition in rat hippocampus. *J Physiol* 495 (Pt 1):107-112.
- Wang J, Zucker RS (2001) Photolysis-induced suppression of inhibition in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Physiol* 533:757-763.
- Wilson MA, McNaughton BL (1993) Dynamics of the hippocampal ensemble code for space. *Science* 261:1055-1058.
- Wilson MA, McNaughton BL (1994) Reactivation of hippocampal ensemble memories during sleep. *Science* 265:676-679.
- Xu JY, Chen R, Zhang J, Chen C (2010) Endocannabinoids differentially modulate synaptic plasticity in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *PLoS One* 5:e10306.
- Zhu PJ, Lovinger DM (2010) Developmental alteration of endocannabinoid retrograde signaling in the hippocampus. *J Neurophysiol* 103:1123-1129.
- Zhuang S, Hampson RE, Deadwyler SA (2005) Behaviorally relevant endocannabinoid action in hippocampus: dependence on temporal summation of multiple inputs. *Behav Pharmacol* 16:463-471.

Figure Captions

Fig. 1. *In vivo* firing patterns induce DSI *in vitro*.

(A) Scheme representing the cheeseboard maze for evaluating spatial memory (Dupret et al., 2010). During learning, the animal is given consecutive trials to locate 3 hidden food rewards. The startbox is opened for each trial and the animal harvests the 3 rewards before returning to the startbox and collects a 4th pellet. (B) Position at which action potentials were emitted by a CA1 place cell during 3 consecutive trials. Each dot corresponds to the location at which place cell emitted an individual spike and is superimposed on the animal's path. Inset: color-coded rate map for the last 20 trials starting from those depicted in B. (C) Voltage-clamp recordings ($V_{\text{hold}}=-80$ mV) of spontaneous GABAergic activity interrupted by transient current-clamp switches during which brief DC injections were performed in order to replay the whole sequence of action potentials that were recorded *in vivo* (including the time spent in the startbox). (D) Same experiment as in C except that the cell was dialyzed with THL (1 μM). (E) Time course of spontaneous GABAergic charge during the replay of the whole action potential sequence depicted in B and C in control (black, n=3) and THL (1 μM , white, n=4). The time spent in the place field is denoted in grey. (F) Voltage-clamp recordings ($V_{\text{hold}}=-80$ mV) of spontaneous GABAergic activity interrupted by transient current-clamp switches during which brief DC injections were performed in order to replay a sequence of action potentials that were recorded *in vivo* during a single trial in two different place cells (C56 and C71). The insets represent the sequence of action potentials that was evoked in the *in vitro* recorded cells (G) mean time course of spontaneous GABAergic charge before and after the replay of the different action potential sequences depicted in F (C56, n=6; C71, n=4). (H) Mean DSI Magnitude measured in the next 4 seconds following action potential discharge for the cells depicted in G.

Fig. 2. Pyramidal cell firing induces endocannabinoid-mediated suppression of GABAergic activity.

(A) Voltage-clamp recordings of spontaneous GABAergic activity ($V_{\text{hold}}=-80$ mV). After a control period the cell is transiently switched to current-clamp mode in order to allow the firing of action potentials either by 1s DC step injections (upper and lower left), or by a series of brief DC injections in order to replay a sequence of action potentials that were recorded *in vivo* during a single trial in two different place cells (upper and lower right, same patterns as in Fig. 1). (B) Same experiments as in A (left panels) except that AM251 (5 μM) was added to the extracellular medium. (C) Same experiment as in A (left panels) except that the cell was dialyzed with THL (1 μM). (D) Modifications in GABAergic charge as a function of the number of spikes evoked during a 1s duration DC current injection paradigm in control (black, n=20), extracellular AM251 (5 μM , red, n=8) and THL (1 μM , green, n=3) conditions. The average change was measured between 1 and 5 s after the end of neuronal discharge. (E) Time course of spontaneous GABAergic charge recovery after a mean spike discharge of 31 spikes (n=5, range 29-32, black), 32 spikes in the presence of AM251 (5 μM , n=5, range 27-37, red), 29 spikes in the presence of THL (1 μM , n=3, range 25-35, green). (F) Voltage-clamp recordings ($V_{\text{hold}}=-80$ mV) of spontaneous GABAergic activity interrupted by transient current-clamp switches during which brief DC injections were performed in order to evoke a series of action potentials at various rates and durations. Insets represent voltage fluctuations during each paradigm. (G) Modifications in GABAergic charge for various spike frequency rates. The number of spikes was either 1 (white) 5 (grey) or 30 (black).

Fig. 3. Endocannabinoid-mediated self-tuning of spike-timing in pyramidal neurons.

(A1) Voltage-clamp recordings ($V_{\text{hold}}=-80$ mV) of spontaneous GABAergic activity, interrupted by episodic current-clamp switches, during which 1s duration DC injections were performed to evoke a series of action potentials (AP) at various rates (upper insets). The last series of AP was performed 4 s after the previous one in order to evaluate spike timing during DSI. (A2) Coefficient of Variation of the Inter Spike Interval (CV_{ISI}) vs. spike rate for the cell depicted in A1 in control (black) and during DSI (white). (A3) Summary of changes in CV_{ISI} for the discharge rate during DSI vs. an equivalent rate of discharge during the control period (n=10). (B) Same experiments as in (A) but in the presence of AM251 (5 μM , n=8). (C) Same experiments as in (A) but in the presence of PTX (100 μM , n=8). (D1) Vm fluctuations in response to a DC step (150 pA, 1 s) in the presence of PTX (100 μM) in control (blue) and when SP-IPSGs were dynamically injected at a rate of 33 events / s (orange). Vm is depicted from the 4th to the 6th spike when the 5th spike was set as the time reference. (D2) CV_{ISI} vs. spike firing rate and (D3) firing rate vs. DC step in control (blue), in the presence of SP-IPSGs

randomly injected at a rate of 10 (green), 33 (orange) or 100 (red) events/s. **(E)** Changes in excitability (black) and CV_{ISI} (white) when neurons received different rates of SP-IPSGs. **(F)** Summary of changes in CV_{ISI} for a discharge rate of 20 spikes/s in control conditions (CTL, n=10), after DSI, in the presence of AM251 (5 μ M, n=8) before and after sustained spike discharge, in the presence of PTX (100 μ M, n=8) before and after sustained spike discharge, in the presence of PTX and SP-IPSGs injected dynamically (Dyn, n=5) at a rate of 10, 33 and 100 events per second.

Fig. 4. Pyramidal cell firing tunes spike-timing in CA1 pyramidal Neurons.

(A1) Voltage-clamp recordings of spontaneous GABAergic activity ($V_{hold}=-50$ mV), interrupted by episodic current-clamp switches, during which 1s duration DC injections were performed in order to evoke a series of action potentials at various rates (insets). **(A2)** Spike rate *vs* DC injection for the cell depicted in A1. For DC injection evoked every 30s (black) or 5 sec after the last DC injection of the series (white). **(A3)** Coefficient of Variation of the Inter Spike Interval (CV_{ISI}) *vs* spike rate for the cell depicted in A1. Same conditions as in B. **(B1)** Same experiment as in A1 except that the last but one series of action potentials were evoked at a precise time to replay a place cell discharge. **(B2)** Spike rate *vs* DC injection for the cell depicted in B1. For DC injection evoked every 30s (black) or 5 sec after the last DC injection of the series (white). **(B3)** Coefficient of Variation of the Inter Spike Interval (CV_{ISI}) *vs* spike rate for the cell depicted in B1. Same conditions as in B. **(C)** Normalized changes in excitability observed during DSI (n=6). **(D)** Normalized changes in CV_{ISI} observed during DSI. The ctrl CV_{ISI} was interpolated from the spike rate measured during DSI (n=6). **(E)** 5 superimposed Vm fluctuations in response to an EPSP recorded in the presence of spontaneous dynamic-clamp IPSPs, in control conditions, during DSI and when the neuron recovers from a transient decrease in spontaneous GABAergic dynamic clamp activity that mimics DSI observed when *in vivo* firing patterns were replayed *in vitro*. The lower trace represents the voltage fluctuation over time when the cell receives fluctuating GABAergic dynamic inputs. **(F)** EPSP-Spike latencies for the cell depicted in F in control, during DSI and following recovery of spontaneous dynamic GABAergic activity. **(G)** Summary for EPSP-Spike jitter measured in different cells for the same protocol as the one depicted in F (n=5). The filled circles correspond to the cell depicted in F.

Fig. 5. Biphasic tuning of EPSP-Spike timing by Feed-Forward inhibition.

(A) Schema of the stimulating and recording configuration for evoking feed-forward inhibition. **(B)** Superimposed current responses recorded in a CA1 pyramidal cell following the extracellular stimulation of the Schaffer collateral pathway in control, 1 and 30s after DSI. stimulation intensity was set to record a sequence of inward and outward currents mediated by glutamatergic and GABAergic synapses respectively, while recording in a voltage-clamp configuration at -50mV with a low intracellular chloride concentration **(C)** Fluctuations (grey circles) and average (filled circles) eIPSC amplitudes over time before and after a 1 s depolarization to 0 mV for 5 successive DSI protocols. Same cell as the one depicted in B. IPSC amplitude was normalized to 1 during the control period. **(D)** Average fluctuations of normalized eEPSC (red) and eIPSC amplitudes (blue) over time before and after a 1 s depolarization to 0 mV (n=4). **(E)** From upper to lower superimposed Vm fluctuations in response to an EPSP (peak amplitude 6.25 nS) followed after 2 ms by FF-IPSPs of various amplitudes (black, 1nS; light grey, 2nS and strong grey, 2.5 nS). Vm fluctuations associated with a spike emission failure are also displayed. The lower traces correspond to the EPSP and IPSP fluctuations over time for the 3 different conditions. **(F)** EPSP-Spike coupling probability *vs* the amplitude of feedforward IPSP. The black and grey circles correspond to conditions depicted in (E). **(G)** Individual EPSP-Spike latencies (red) superimposed with the mean EPSP-Spike latency \pm jitter *vs* the amplitude of feedforward IPSP for the cell depicted in (E). The black and grey circles correspond to conditions depicted in (E). The black and red traces correspond to third order polynomial fits of mean latency and mean latency \pm jitter, respectively. **(H)** Third order polynomial fits of EPSP-Spike jitter *vs* the probability of EPSP-Spike coupling measured in different cells.

Fig. 6. Modeling Tuning of EPSP-Spike coupling by spontaneous and Feed-forward GABAergic activity.

(A) From left to right superimposed (25) Vm fluctuations in response to a constant EPSP (80nS) in the absence of spontaneous GABAergic activity, in the presence of SP-IPSPs occurring at a rate of 50 and 200 events /s. On the top of each group of traces is represented the mean latency \pm jitter (n=250). The EPSP-Spike coupling

probability and latency \pm jitter (ms) are written under Vm. Only Vm traces where a spike was successfully emitted are displayed. SP-IPSG fluctuations associated with a spike emission success or failure are shown in blue and grey, respectively (25 traces each). The EPSG is colored in black. **(B)** EPSP-Spike coupling probability (red) and latency \pm jitter (black) vs. the rate of randomly occurring GABA_A events/s. EPSG amplitude was set at 80nS (n=250). **(C)** EPSP-Spike coupling probability displayed on a pseudocolor scale vs. SP-IPSG rate and EPSG amplitude. The dashed line corresponds to the conditions displayed in A and B. **(D)** EPSP-Spike coupling jitter displayed on a pseudocolor scale vs SP-IPSG rate and EPSG amplitude. The dashed line corresponds to the conditions displayed in A and B. **(E)** From left to right superimposed (25) Vm fluctuations in response to a constant EPSG (80nS) in the absence of FF-IPSG, with FF-IPSG amplitude of 38.5 and 60 nS. On the top of each group of traces is represented the mean latency \pm jitter (n=250). The EPSP-Spike coupling probability and latency \pm jitter (ms) are written under Vm. The EPSG (black) and FF-IPSG (red) are displayed and aligned with Vm. **(F)** EPSP-Spike coupling probability (red) and latency \pm jitter (black) vs. the amplitude of the FF-IPSG. EPSG amplitude was set at 80 nS (n=250). **(G)** EPSP-Spike coupling probability displayed on a pseudocolor scale vs. FF-IPSG and EPSG amplitudes. The dashed line corresponds to the conditions displayed on E and F. **(H)** EPSP-Spike coupling jitter displayed on a pseudocolor scale vs. FF-IPSG and EPSG amplitudes. The dashed line corresponds to the conditions displayed in E and F. **(I)** Left Vm fluctuations for a constant EPSG (80 nS) in the absence of FF-IPSG (red), with FF-IPSG amplitude of 39 (blue) and 60 nS (green). In grey is represented the fluctuating threshold. The dashed lines represent the upper and lower limits for spike threshold, when considering its Gaussian distribution and its SD value (1 mV). The firing was cancelled in this simulation in order to see the integration of conductances overtime in the absence of firing. Right traces show Vm fluctuations around spike threshold on an expanded scale. The superimposed bold traces represent the distribution of the time and Vm at which action potential generation were generated in each conditions. **(J)** Cumulative histograms for action potential latencies for the three conditions depicted in (I). Same colour code as in (I).

Fig. 7. Modeling tuning of EPSP-Spike coupling by combined spontaneous and feed-forward inhibition.

(A) From left to right superimposed (25) Vm fluctuations in the presence of constant FF-IPSG of 39nS and various rates of SP-IPSGs (0-30-65 events/s). The EPSG amplitude was set at 80nS. Only Vm traces where a spike was successfully emitted are displayed. On the top of each group of traces is represented the mean latency \pm jitter (n=250). The EPSP-Spike coupling probability and latency \pm jitter are written under Vm. The EPSG is colored in black; FF-IPSG in red; SP-IPSG fluctuations in blue and grey for spike success and failures, respectively. **(B)** EPSP-Spike coupling probability (red) and latency \pm jitter (black) vs. rate of spontaneous GABAergic activity. The EPSG amplitude was set at 80nS. FF-IPSG was set at 39 nS (n=250). **(C)** Same conditions as in (A) except that the model receive a SP-IPSG rate of 50 events/s and FF-IPSGs of various amplitudes (0-34-44 nS). **(D)** Same graph as in (B) except that the model receive a SP-IPSG rate of 50 events/s and FF-IPSGs of various amplitudes (n=250). **(E)** Same conditions as in (A) except that the model receive SP-IPSG rates and FF-IPSGs at constant ratio (7.7 events/s and 6 nS; 28.2 events/s and 22 nS; 50 events/s and 39 nS for SP-IPSG rate and FF-IPSGs, respectively). **(F)** EPSP-Spike coupling probability (red) and latency \pm jitter (black) vs. the percentage of inhibition. 100% inhibition was set when SP-IPSG rate and FF-IPSGs were 50 events/s and 39 nS, respectively. SP-IPSG rates and FF-IPSGs were changed in similar proportions from 0 to 120% of control. **(G)** EPSP-Spike coupling probability displayed on a pseudocolor scale vs. FF-IPSG amplitude and SP-IPSG rates. The horizontal, vertical and diagonal lines correspond to the conditions displayed on A-B, C-D and E-F, respectively. **(H)** EPSP-Spike coupling jitter displayed on a pseudocolor scale vs. FF-IPSG amplitude and SP-IPSG rates. The horizontal, vertical and diagonal lines correspond to the conditions displayed on A-B, C-D and E-F, respectively.

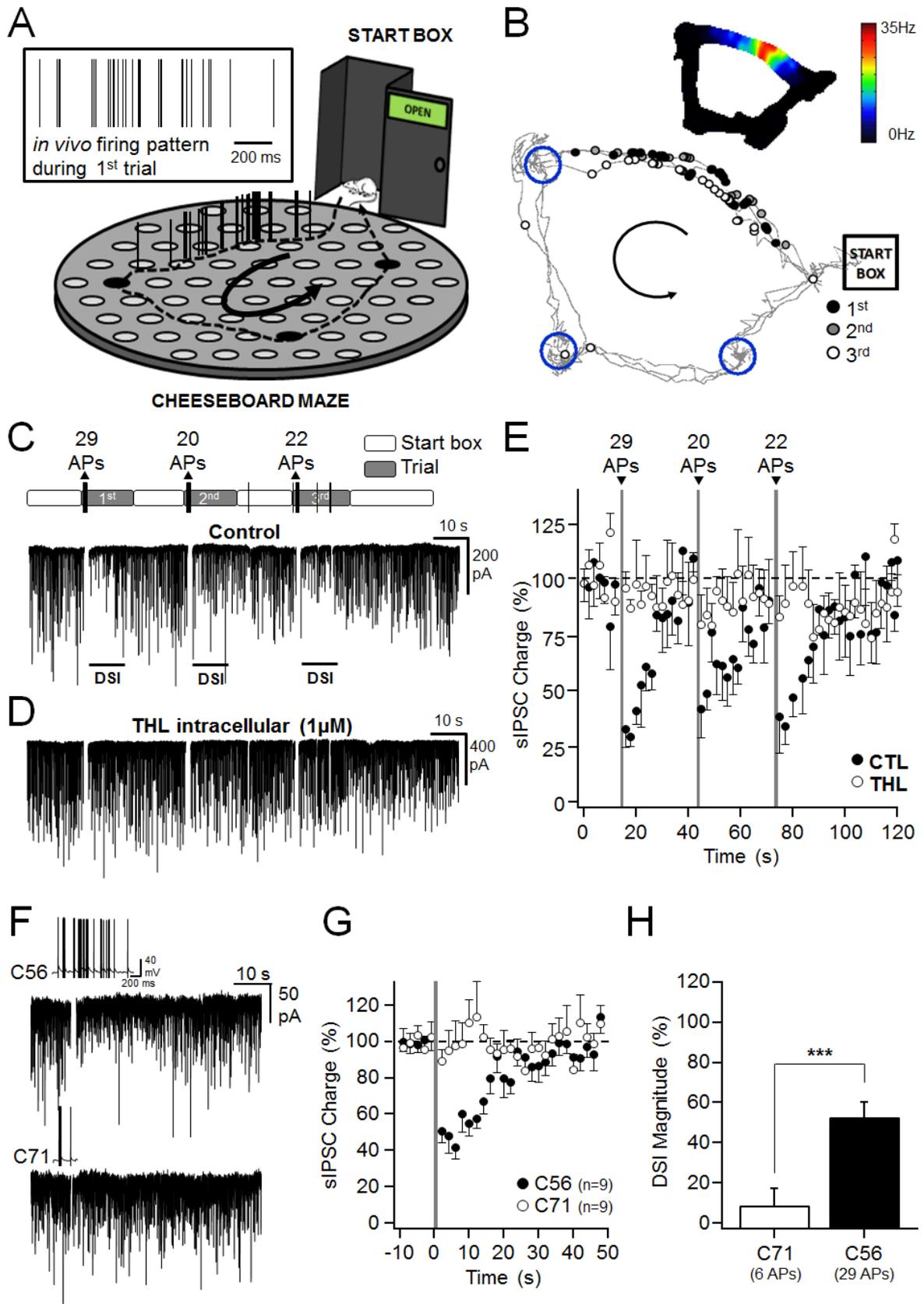


Figure 1

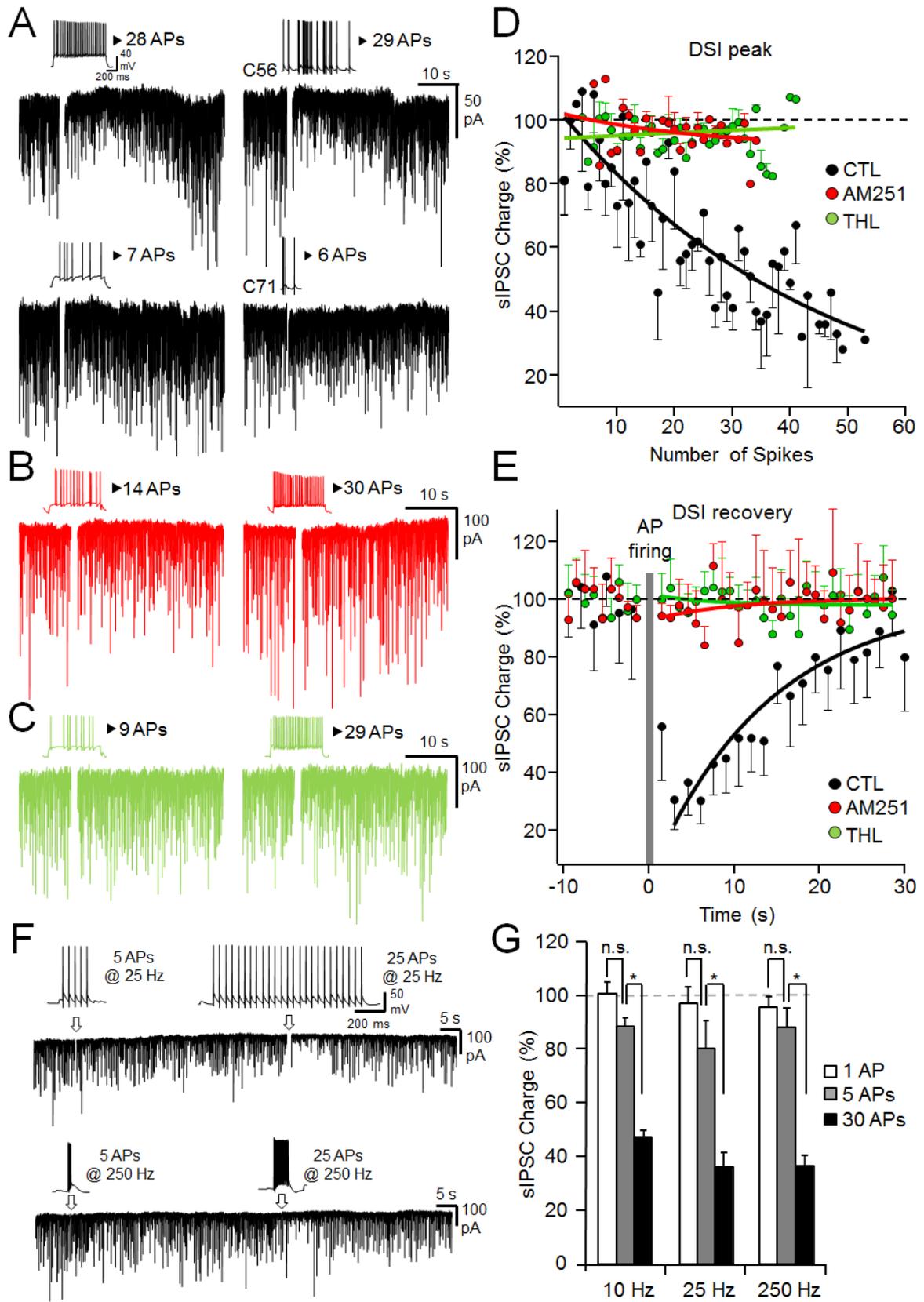


Figure 2

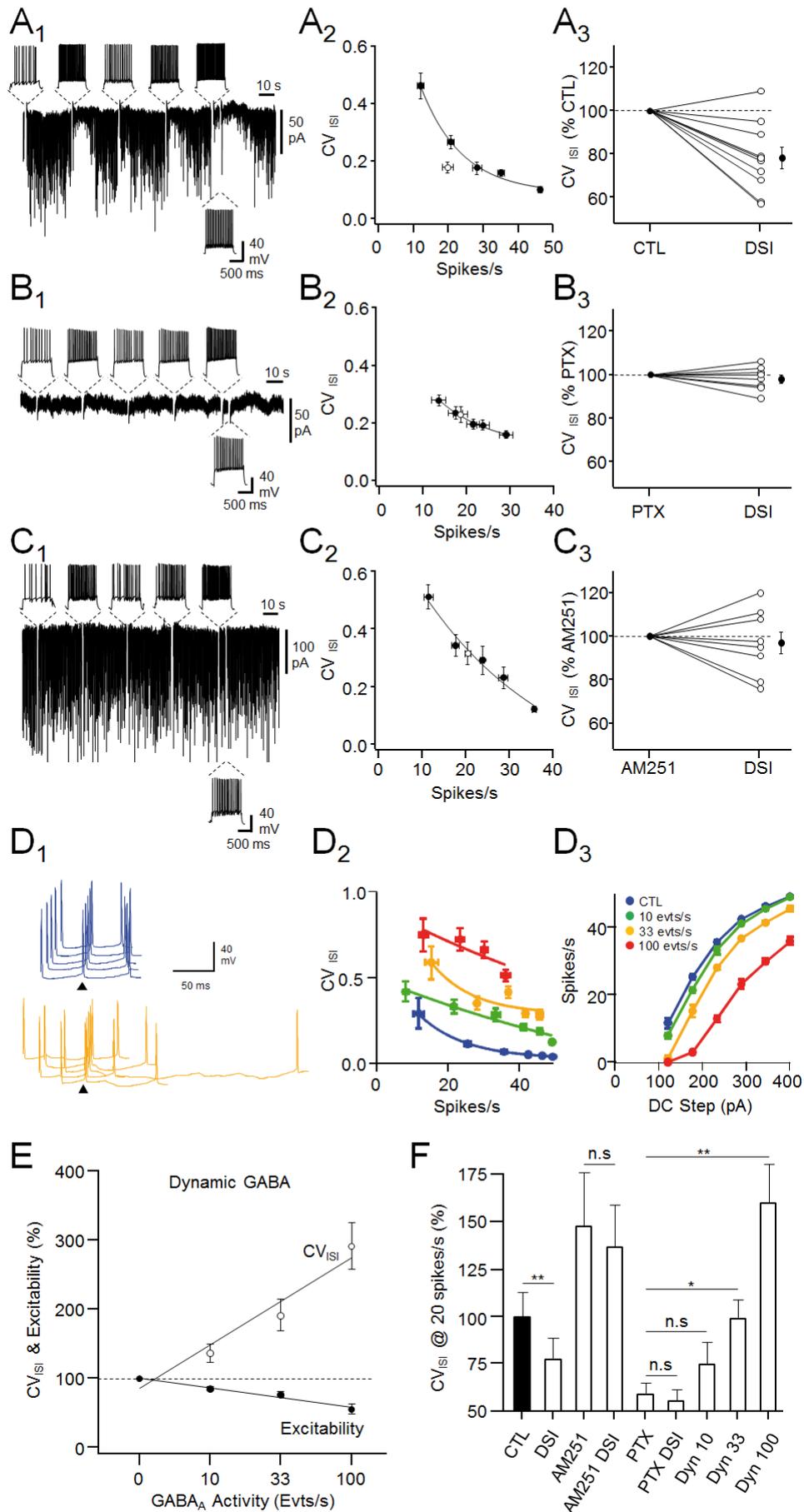


Figure 3

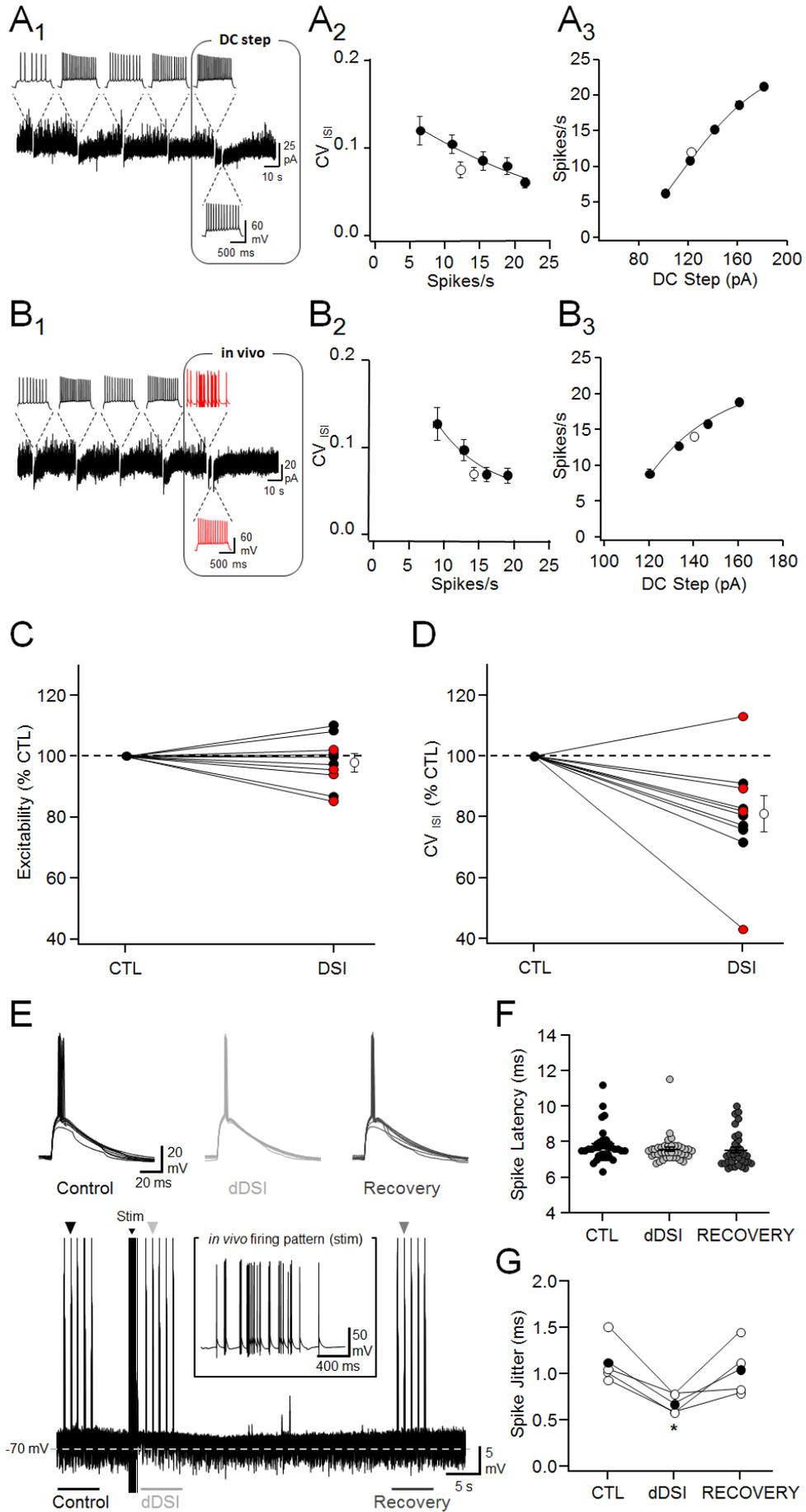


Figure 4

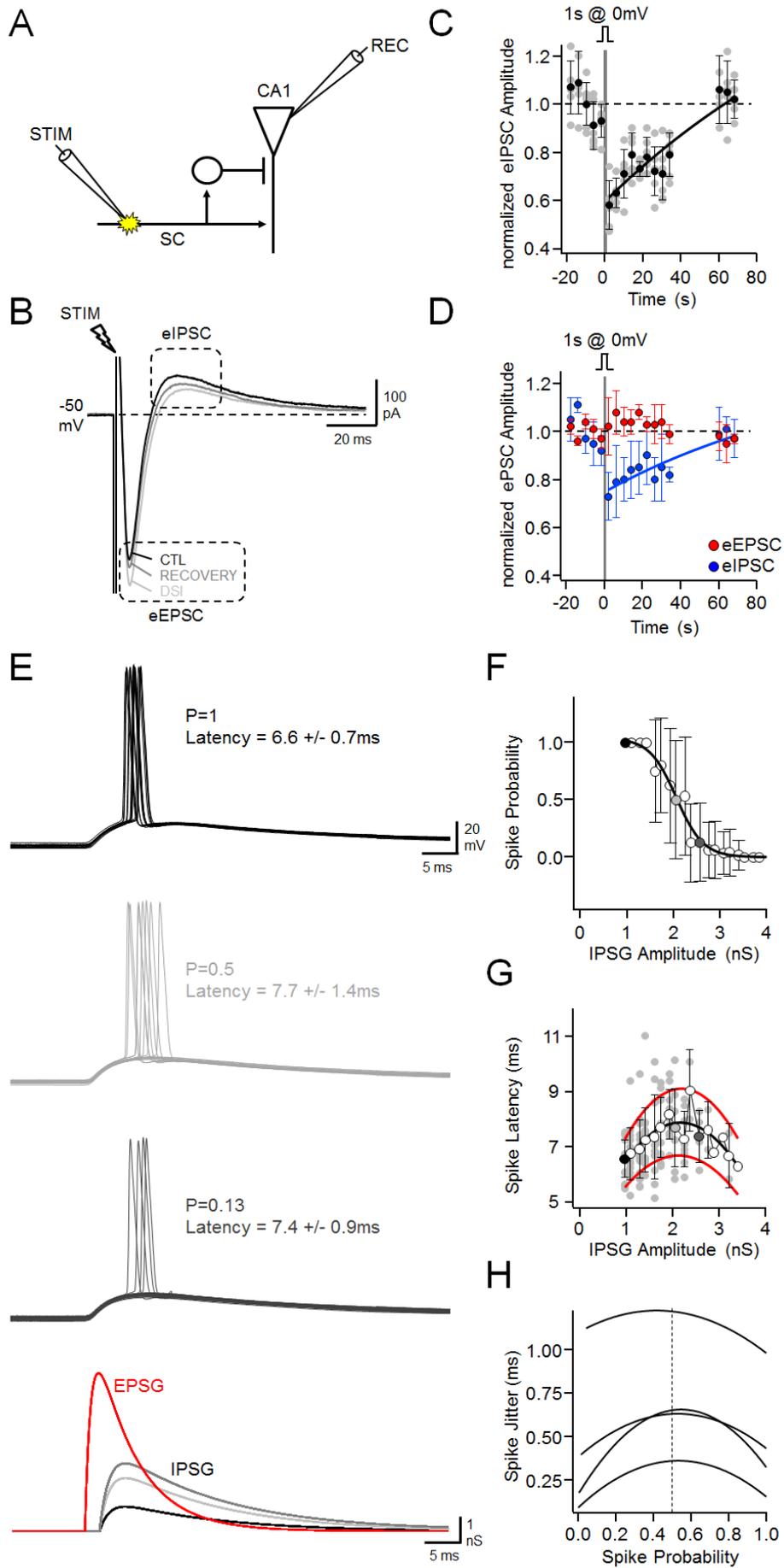


Figure 5

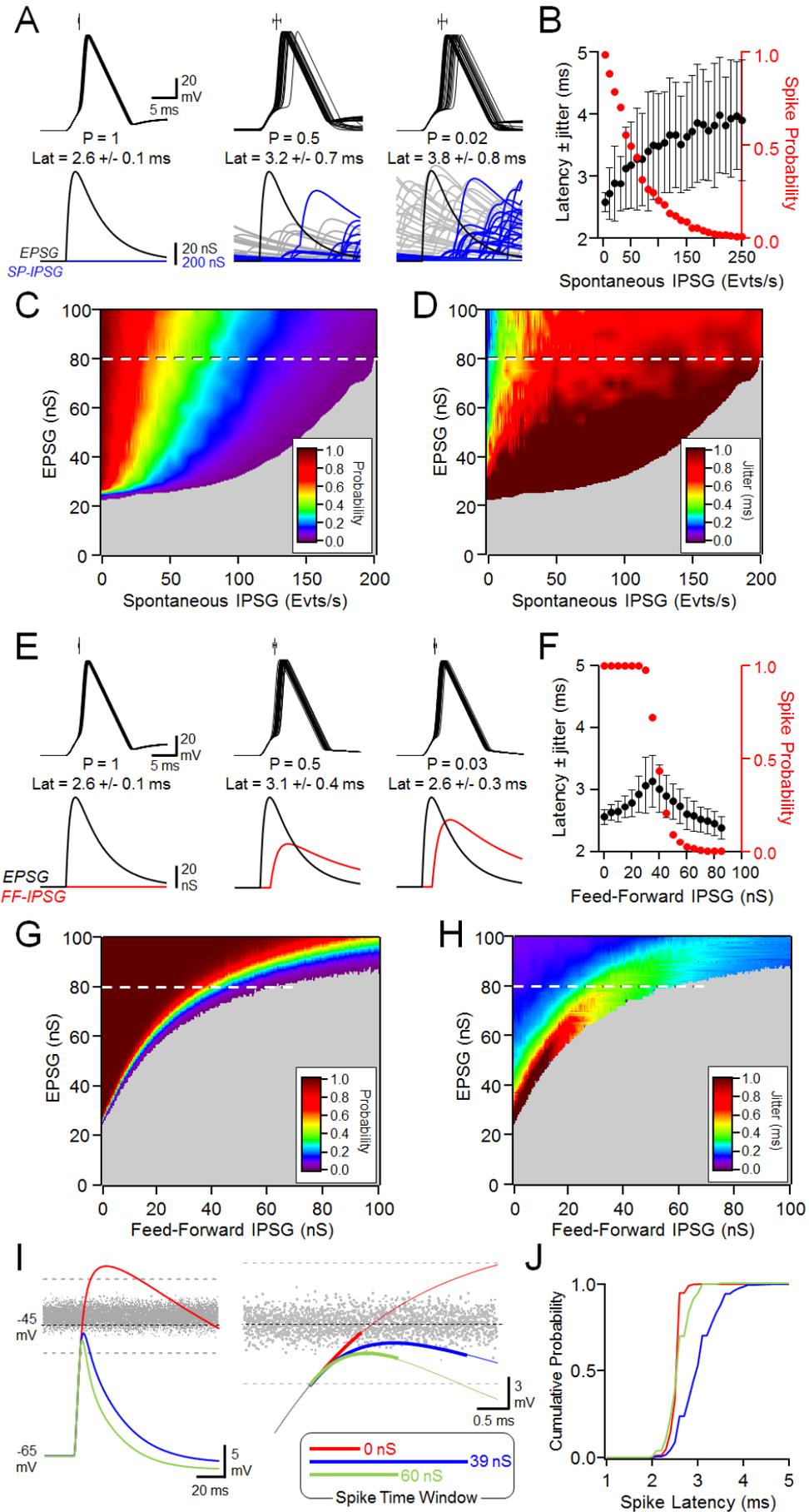


Figure 6

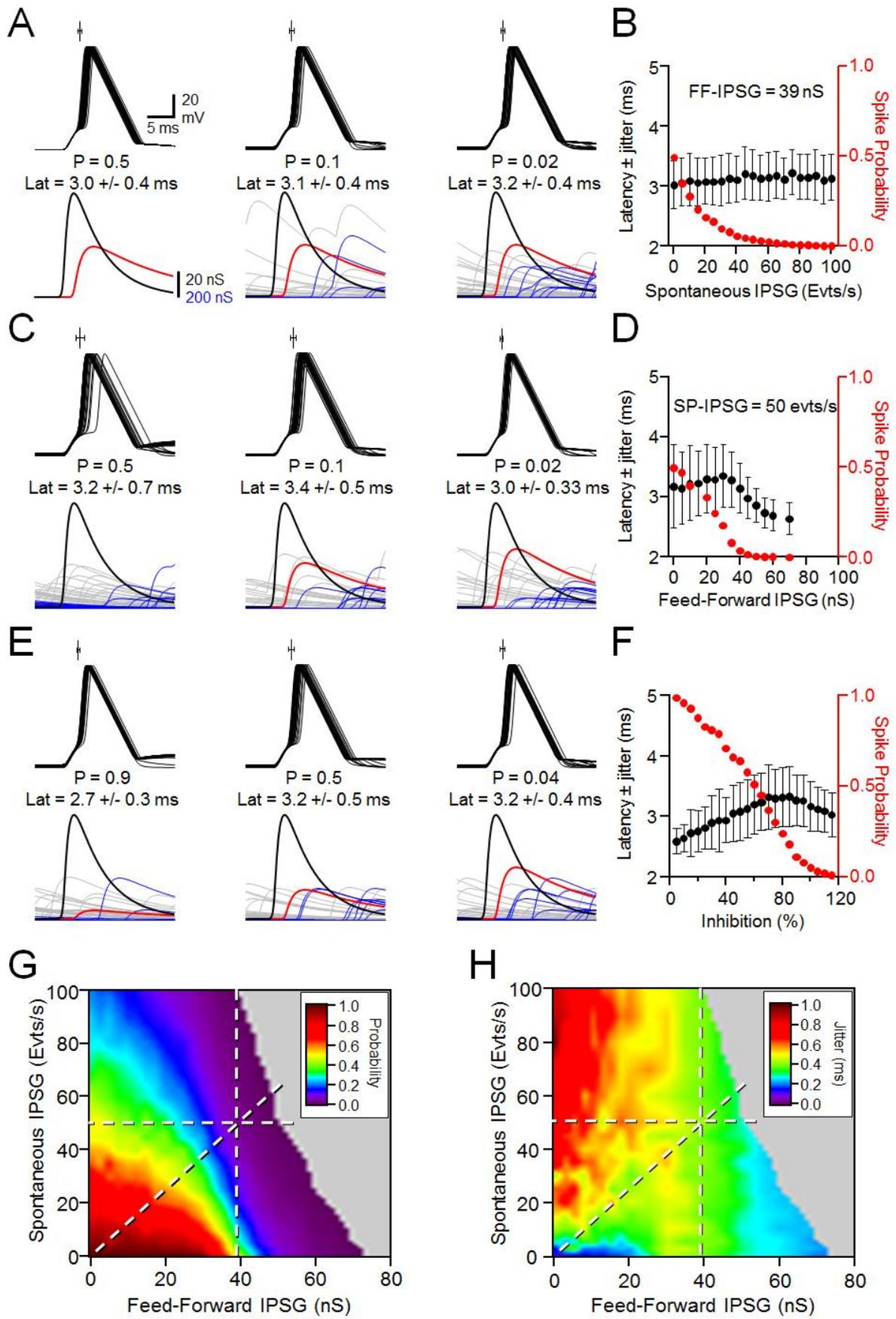


Figure 7

BIBLIOGRAPHIE

- Ahmed, O.J., and Mehta, M.R. (2009). The hippocampal rate code: anatomy, physiology and theory. *Trends Neurosci.* **32**, 329–338.
- Alger, B.E., and Kim, J. (2011). Supply and demand for endocannabinoids. *Trends Neurosci.* **34**, 304–315.
- Ali, A.B. (2007). Presynaptic Inhibition of GABAA receptor-mediated unitary IPSPs by cannabinoid receptors at synapses between CCK-positive interneurons in rat hippocampus. *J. Neurophysiol.* **98**, 861–869.
- Auerbach, J.M., and Segal, M. (1996). Muscarinic receptors mediating depression and long-term potentiation in rat hippocampus. *J. Physiol. (Lond.)* **492 (Pt 2)**, 479–493.
- Axmacher, N., and Miles, R. (2004). Intrinsic cellular currents and the temporal precision of EPSP-action potential coupling in CA1 pyramidal cells. *J. Physiol. (Lond.)* **555**, 713–725.
- Bacci, A., and Huguenard, J.R. (2006). Enhancement of spike-timing precision by autaptic transmission in neocortical inhibitory interneurons. *Neuron* **49**, 119–130.
- Bacci, A., Huguenard, J.R., and Prince, D.A. (2004). Long-lasting self-inhibition of neocortical interneurons mediated by endocannabinoids. *Nature* **431**, 312–316.
- Bacci, A., Huguenard, J.R., and Prince, D.A. (2005). Modulation of neocortical interneurons: extrinsic influences and exercises in self-control. *Trends Neurosci.* **28**, 602–610.
- Barker, G.R.I., and Warburton, E.C. (2011). When is the hippocampus involved in recognition memory? *J. Neurosci.* **31**, 10721–10731.
- Ben-Ari, Y. (2002). Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat. Rev. Neurosci.* **3**, 728–739.
- Ben-Ari, Y., Khalilov, I., Kahle, K.T., and Cherubini, E. (2012). The GABA excitatory/inhibitory shift in brain maturation and neurological disorders. *Neuroscientist* **18**, 467–486.
- Bennett, B.D., Callaway, J.C., and Wilson, C.J. (2000). Intrinsic membrane properties underlying spontaneous tonic firing in neostriatal cholinergic interneurons. *J. Neurosci.* **20**, 8493–8503.
- Bettler, B., Kaupmann, K., Mosbacher, J., and Gassmann, M. (2004). Molecular structure and physiological functions of GABA(B) receptors. *Physiol. Rev.* **84**, 835–867.
- Bird, C.M., and Burgess, N. (2008). The hippocampus and memory: insights from spatial processing. *Nat. Rev. Neurosci.* **9**, 182–194.
- Bormann, J. (1988). Electrophysiology of GABAA and GABAB receptor subtypes. *Trends Neurosci.* **11**, 112–116.
- Brown, M.W., and Aggleton, J.P. (2001). Recognition memory: what are the roles of the perirhinal cortex and hippocampus? *Nat. Rev. Neurosci.* **2**, 51–61.
- Brun, V.H., Leutgeb, S., Wu, H.-Q., Schwarcz, R., Witter, M.P., Moser, E.I., and Moser, M.-B. (2008). Impaired spatial representation in CA1 after lesion of direct input from entorhinal cortex. *Neuron* **57**, 290–302.
- Brun, V.H., Otnass, M.K., Molden, S., Steffenach, H.-A., Witter, M.P., Moser, M.-B., and Moser, E.I. (2002). Place cells and place recognition maintained by direct entorhinal-hippocampal circuitry. *Science* **296**, 2243–2246.

- Caillard, O. (2011). Pre & postsynaptic tuning of action potential timing by spontaneous GABAergic activity. *PLoS ONE* 6, e22322.
- Cardin, J.A., Carlén, M., Meletis, K., Knoblich, U., Zhang, F., Deisseroth, K., Tsai, L.-H., and Moore, C.I. (2009). Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses. *Nature* 459, 663–667.
- Chevalleyre, V., and Castillo, P.E. (2003). Heterosynaptic LTD of hippocampal GABAergic synapses: a novel role of endocannabinoids in regulating excitability. *Neuron* 38, 461–472.
- Chevalleyre, V., and Castillo, P.E. (2004). Endocannabinoid-mediated metaplasticity in the hippocampus. *Neuron* 43, 871–881.
- Chevalleyre, V., Heifets, B.D., Kaeser, P.S., Südhof, T.C., Purpura, D.P., and Castillo, P.E. (2007). Endocannabinoid-mediated long-term plasticity requires cAMP/PKA signaling and RIM1alpha. *Neuron* 54, 801–812.
- Chevalleyre, V., and Siegelbaum, S.A. (2010). Strong CA2 pyramidal neuron synapses define a powerful disinaptic cortico-hippocampal loop. *Neuron* 66, 560–572.
- Cserép, C., Szonyi, A., Veres, J.M., Németh, B., Szabadits, E., De Vente, J., Hájos, N., Freund, T.F., and Nyiri, G. (2011). Nitric oxide signaling modulates synaptic transmission during early postnatal development. *Cereb. Cortex* 21, 2065–2074.
- Cudmore, R.H., Fronzaroli-Molinieres, L., Giraud, P., and Debanne, D. (2010). Spike-time precision and network synchrony are controlled by the homeostatic regulation of the D-type potassium current. *J. Neurosci.* 30, 12885–12895.
- Cudmore, R.H., and Turrigiano, G.G. (2004). Long-term potentiation of intrinsic excitability in LV visual cortical neurons. *J. Neurophysiol.* 92, 341–348.
- Debanne, D., Boudkazi, S., Campanac, E., Cudmore, R.H., Giraud, P., Fronzaroli-Molinieres, L., Carlier, E., and Caillard, O. (2008). Paired-recordings from synaptically coupled cortical and hippocampal neurons in acute and cultured brain slices. *Nat Protoc* 3, 1559–1568.
- Destexhe, A., Rudolph, M., and Paré, D. (2003). The high-conductance state of neocortical neurons in vivo. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 739–751.
- Diana, M.A., and Marty, A. (2003). Characterization of depolarization-induced suppression of inhibition using paired interneuron–Purkinje cell recordings. *J. Neurosci.* 23, 5906–5918.
- Drever, B.D., Riedel, G., and Platt, B. (2011). The cholinergic system and hippocampal plasticity. *Behav. Brain Res.* 221, 505–514.
- Dupret, D., O’Neill, J., Pleydell-Bouverie, B., and Csicsvari, J. (2010). The reorganization and reactivation of hippocampal maps predict spatial memory performance. *Nat. Neurosci.* 13, 995–1002.
- Edwards, D.A., Kim, J., and Alger, B.E. (2006). Multiple mechanisms of endocannabinoid response initiation in hippocampus. *J. Neurophysiol.* 95, 67–75.
- Eichenbaum, H., Yonelinas, A.P., and Ranganath, C. (2007). The medial temporal lobe and recognition memory. *Annu. Rev. Neurosci.* 30, 123–152.
- Földy, C., Lee, S.-H., Morgan, R.J., and Soltesz, I. (2010). Regulation of fast-spiking basket cell synapses by the chloride channel ClC-2. *Nat. Neurosci.* 13, 1047–1049.
- Fortin, D.A., Trettel, J., and Levine, E.S. (2004). Brief trains of action potentials enhance pyramidal neuron excitability via endocannabinoid-mediated suppression of inhibition. *J. Neurophysiol.* 92, 2105–2112.
- Freund, T.F., Katona, I., and Piomelli, D. (2003). Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol. Rev.* 83, 1017–1066.

- Fricker, D., and Miles, R. (2000). EPSP amplification and the precision of spike timing in hippocampal neurons. *Neuron* 28, 559–569.
- Frotscher, M., and Léránth, C. (1985). Cholinergic innervation of the rat hippocampus as revealed by choline acetyltransferase immunocytochemistry: a combined light and electron microscopic study. *J. Comp. Neurol.* 239, 237–246.
- Frotscher, M., Vida, I., and Bender, R. (2000). Evidence for the existence of non-GABAergic, cholinergic interneurons in the rodent hippocampus. *Neuroscience* 96, 27–31.
- Gao, Y., Vasilyev, D.V., Goncalves, M.B., Howell, F.V., Hobbs, C., Reisenberg, M., Shen, R., Zhang, M.-Y., Strassle, B.W., Lu, P., et al. (2010). Loss of retrograde endocannabinoid signaling and reduced adult neurogenesis in diacylglycerol lipase knock-out mice. *J. Neurosci.* 30, 2017–2024.
- Gastrein, P., Campanac, E., Gasselín, C., Cudmore, R.H., Bialowas, A., Carlier, E., Fronzaroli-Molinieres, L., Ankri, N., and Debanne, D. (2011). The role of hyperpolarization-activated cationic current in spike-time precision and intrinsic resonance in cortical neurons in vitro. *J. Physiol. (Lond.)* 589, 3753–3773.
- Glickfeld, L.L., Atallah, B.V., and Scanziani, M. (2008). Complementary modulation of somatic inhibition by opioids and cannabinoids. *J. Neurosci.* 28, 1824–1832.
- Glickfeld, L.L., and Scanziani, M. (2006). Distinct timing in the activity of cannabinoid-sensitive and cannabinoid-insensitive basket cells. *Nat. Neurosci.* 9, 807–815.
- Gulyás, A.I., Szabó, G.G., Ulbert, I., Holderith, N., Monyer, H., Erdélyi, F., Szabó, G., Freund, T.F., and Hájos, N. (2010). Parvalbumin-containing fast-spiking basket cells generate the field potential oscillations induced by cholinergic receptor activation in the hippocampus. *J. Neurosci.* 30, 15134–15145.
- 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.
- Hampson, R.E., Zhuang, S.-Y., Weiner, J.L., and Deadwyler, S.A. (2003). Functional significance of cannabinoid-mediated, depolarization-induced suppression of inhibition (DSI) in the hippocampus. *J. Neurophysiol.* 90, 55–64.
- Harvey, C.D., Collman, F., Dombeck, D.A., and Tank, D.W. (2009). Intracellular dynamics of hippocampal place cells during virtual navigation. *Nature* 461, 941–946.
- Hashimoto-dani, Y., Ohno-Shosaku, T., and Kano, M. (2007). Presynaptic monoacylglycerol lipase activity determines basal endocannabinoid tone and terminates retrograde endocannabinoid signaling in the hippocampus. *J. Neurosci.* 27, 1211–1219.
- Hashimoto-dani, Y., Ohno-Shosaku, T., Maejima, T., Fukami, K., and Kano, M. (2008). Pharmacological evidence for the involvement of diacylglycerol lipase in depolarization-induced endocannabinoid release. *Neuropharmacology* 54, 58–67.
- Hefft, S., and Jonas, P. (2005). Asynchronous GABA release generates long-lasting inhibition at a hippocampal interneuron-principal neuron synapse. *Nat. Neurosci.* 8, 1319–1328.
- Herrera-Morales, W., Mar, I., Serrano, B., and Bermúdez-Rattoni, F. (2007). Activation of hippocampal postsynaptic muscarinic receptors is involved in long-term spatial memory formation. *Eur. J. Neurosci.* 25, 1581–1588.
- Hok, V., Lenck-Santini, P.-P., Roux, S., Save, E., Muller, R.U., and Poucet, B. (2007). Goal-related activity in hippocampal place cells. *J. Neurosci.* 27, 472–482.
- Hollup, S.A., Molden, S., Donnett, J.G., Moser, M.B., and Moser, E.I. (2001). Accumulation of hippocampal place fields at the goal location in an annular watermaze task. *J. Neurosci.* 21, 1635–1644.

- Isaac, J.T.R., Buchanan, K.A., Muller, R.U., and Mellor, J.R. (2009). Hippocampal place cell firing patterns can induce long-term synaptic plasticity in vitro. *J. Neurosci.* **29**, 6840–6850.
- Isokawa, M., and Alger, B.E. (2005). Retrograde endocannabinoid regulation of GABAergic inhibition in the rat dentate gyrus granule cell. *J. Physiol. (Lond.)* **567**, 1001–1010.
- Jezeq, K., Henriksen, E.J., Treves, A., Moser, E.I., and Moser, M.-B. (2011). Theta-paced flickering between place-cell maps in the hippocampus. *Nature* **478**, 246–249.
- Kahle, K.T., Staley, K.J., Nahed, B.V., Gamba, G., Hebert, S.C., Lifton, R.P., and Mount, D.B. (2008). Roles of the cation-chloride cotransporters in neurological disease. *Nat Clin Pract Neurol* **4**, 490–503.
- Karson, M.A., Tang, A.-H., Milner, T.A., and Alger, B.E. (2009). Synaptic cross talk between perisomatic-targeting interneuron classes expressing cholecystokinin and parvalbumin in hippocampus. *J. Neurosci.* **29**, 4140–4154.
- Karson, M.A., Whittington, K.C., and Alger, B.E. (2008). Cholecystokinin inhibits endocannabinoid-sensitive hippocampal IPSPs and stimulates others. *Neuropharmacology* **54**, 117–128.
- Katona, I., Sperl gh, B., S k, A., K falvi, A., Vizi, E.S., Mackie, K., and Freund, T.F. (1999). Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *J. Neurosci.* **19**, 4544–4558.
- Kim, J., Isokawa, M., Ledent, C., and Alger, B.E. (2002). Activation of muscarinic acetylcholine receptors enhances the release of endogenous cannabinoids in the hippocampus. *J. Neurosci.* **22**, 10182–10191.
- 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.
- Klausberger, T., and Somogyi, P. (2008). Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science* **321**, 53–57.
- Knox, L.T., Jing, Y., Fleete, M.S., Collie, N.D., Zhang, H., and Liu, P. (2011). Scopolamine impairs behavioural function and arginine metabolism in the rat dentate gyrus. *Neuropharmacology* **61**, 1452–1462.
- Kreitzer, A.C., Carter, A.G., and Regehr, W.G. (2002). Inhibition of interneuron firing extends the spread of endocannabinoid signaling in the cerebellum. *Neuron* **34**, 787–796.
- Kreitzer, A.C., and Regehr, W.G. (2001). Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells. *Neuron* **29**, 717–727.
- Kullmann, D.M. (2011). Interneuron networks in the hippocampus. *Curr. Opin. Neurobiol.* **21**, 709–716.
- Lee, A.K., Manns, I.D., Sakmann, B., and Brecht, M. (2006). Whole-cell recordings in freely moving rats. *Neuron* **51**, 399–407.
- Lenz, R.A., and Alger, B.E. (1999). Calcium dependence of depolarization-induced suppression of inhibition in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J. Physiol. (Lond.)* **521 Pt 1**, 147–157.
- Llano, I., Leresche, N., and Marty, A. (1991). Calcium entry increases the sensitivity of cerebellar Purkinje cells to applied GABA and decreases inhibitory synaptic currents. *Neuron* **6**, 565–574.
- Losonczy, A., Bir , A.A., and Nusser, Z. (2004). Persistently active cannabinoid receptors mute a subpopulation of hippocampal interneurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 1362–1367.
- Madison, D.V., and Nicoll, R.A. (1984). Control of the repetitive discharge of rat CA 1 pyramidal neurones in vitro. *J. Physiol. (Lond.)* **354**, 319–331.

- Mainen, Z.F., and Sejnowski, T.J. (1995). Reliability of spike timing in neocortical neurons. *Science* *268*, 1503–1506.
- Makara, J.K., Katona, I., Nyíri, G., Németh, B., Ledent, C., Watanabe, M., De Vente, J., Freund, T.F., and Hájos, N. (2007). Involvement of nitric oxide in depolarization-induced suppression of inhibition in hippocampal pyramidal cells during activation of cholinergic receptors. *J. Neurosci.* *27*, 10211–10222.
- Manwani, A., Steinmetz, P.N., and Koch, C. (2002). The impact of spike timing variability on the signal-encoding performance of neural spiking models. *Neural Comput* *14*, 347–367.
- Marinelli, S., Pacioni, S., Bisogno, T., Di Marzo, V., Prince, D.A., Huguenard, J.R., and Bacci, A. (2008). The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol is responsible for the slow self-inhibition in neocortical interneurons. *J. Neurosci.* *28*, 13532–13541.
- Marinelli, S., Pacioni, S., Cannich, A., Marsicano, G., and Bacci, A. (2009). Self-modulation of neocortical pyramidal neurons by endocannabinoids. *Nat. Neurosci.* *12*, 1488–1490.
- Markus, E.J., Qin, Y.L., Leonard, B., Skaggs, W.E., McNaughton, B.L., and Barnes, C.A. (1995). Interactions between location and task affect the spatial and directional firing of hippocampal neurons. *J. Neurosci.* *15*, 7079–7094.
- Marrosu, F., Portas, C., Mascia, M.S., Casu, M.A., Fà, M., Giagheddu, M., Imperato, A., and Gessa, G.L. (1995). Microdialysis measurement of cortical and hippocampal acetylcholine release during sleep-wake cycle in freely moving cats. *Brain Res.* *671*, 329–332.
- Martin, L.A., and Alger, B.E. (1999). Muscarinic facilitation of the occurrence of depolarization-induced suppression of inhibition in rat hippocampus. *Neuroscience* *92*, 61–71.
- Martin, L.A., Wei, D.S., and Alger, B.E. (2001). Heterogeneous susceptibility of GABA(A) receptor-mediated IPSCs to depolarization-induced suppression of inhibition in rat hippocampus. *J. Physiol. (Lond.)* *532*, 685–700.
- McNaughton, B.L., Barnes, C.A., and O’Keefe, J. (1983). The contributions of position, direction, and velocity to single unit activity in the hippocampus of freely-moving rats. *Exp Brain Res* *52*, 41–49.
- Milescu, L.S., Yamanishi, T., Ptak, K., Mogri, M.Z., and Smith, J.C. (2008). Real-time kinetic modeling of voltage-gated ion channels using dynamic clamp. *Biophys. J.* *95*, 66–87.
- Min, R., Testa-Silva, G., Heistek, T.S., Canto, C.B., Lodder, J.C., Bisogno, T., Di Marzo, V., Brussaard, A.B., Burnashev, N., and Mansvelder, H.D. (2010). Diacylglycerol lipase is not involved in depolarization-induced suppression of inhibition at unitary inhibitory connections in mouse hippocampus. *J. Neurosci.* *30*, 2710–2715.
- Mitsushima, D. (2011). Sex differences in the septo-hippocampal cholinergic system in rats: behavioral consequences. *Curr Top Behav Neurosci* *8*, 57–71.
- Morishita, W., and Alger, B.E. (2000). Differential effects of the group II mGluR agonist, DCG-IV, on depolarization-induced suppression of inhibition in hippocampal CA1 and CA3 neurons. *Hippocampus* *10*, 261–268.
- Moser, E.I., Kropff, E., and Moser, M.-B. (2008). Place cells, grid cells, and the brain’s spatial representation system. *Annu. Rev. Neurosci.* *31*, 69–89.
- Mu, J., Zhuang, S.Y., Kirby, M.T., Hampson, R.E., and Deadwyler, S.A. (1999). Cannabinoid receptors differentially modulate potassium A and D currents in hippocampal neurons in culture. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *291*, 893–902.
- Muller, R.U., Bostock, E., Taube, J.S., and Kubie, J.L. (1994). On the directional firing properties of hippocampal place cells. *J. Neurosci.* *14*, 7235–7251.

- Muller, R.U., Ranck, J.B., Jr, and Taube, J.S. (1996). Head direction cells: properties and functional significance. *Curr. Opin. Neurobiol.* *6*, 196–206.
- Myoga, M.H., Beierlein, M., and Regehr, W.G. (2009). Somatic spikes regulate dendritic signaling in small neurons in the absence of backpropagating action potentials. *J. Neurosci.* *29*, 7803–7814.
- Nagode, D.A., Tang, A.-H., Karson, M.A., Klugmann, M., and Alger, B.E. (2011). Optogenetic release of ACh induces rhythmic bursts of perisomatic IPSCs in hippocampus. *PLoS ONE* *6*, e27691.
- Nakashiba, T., Young, J.Z., McHugh, T.J., Buhl, D.L., and Tonegawa, S. (2008). Transgenic inhibition of synaptic transmission reveals role of CA3 output in hippocampal learning. *Science* *319*, 1260–1264.
- Narushima, M., Uchigashima, M., Hashimoto, K., Watanabe, M., and Kano, M. (2006). Depolarization-induced suppression of inhibition mediated by endocannabinoids at synapses from fast-spiking interneurons to medium spiny neurons in the striatum. *Eur. J. Neurosci.* *24*, 2246–2252.
- Navarrete, M., and Araque, A. (2008). Endocannabinoids mediate neuron-astrocyte communication. *Neuron* *57*, 883–893.
- Navarrete, M., and Araque, A. (2010). Endocannabinoids potentiate synaptic transmission through stimulation of astrocytes. *Neuron* *68*, 113–126.
- Navratilova, Z., Hoang, L.T., Schwindel, C.D., Tatsuno, M., and McNaughton, B.L. (2012). Experience-dependent firing rate remapping generates directional selectivity in hippocampal place cells. *Front Neural Circuits* *6*, 6.
- Neves, G., Cooke, S.F., and Bliss, T.V.P. (2008). Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat. Rev. Neurosci.* *9*, 65–75.
- O'Keefe, J. (1979). A review of the hippocampal place cells. *Prog. Neurobiol.* *13*, 419–439.
- 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'Keefe, J., and Recce, M.L. (1993). Phase relationship between hippocampal place units and the EEG theta rhythm. *Hippocampus* *3*, 317–330.
- O'Neill, J., Pleydell-Bouverie, B., Dupret, D., and Csicsvari, J. (2010). Play it again: reactivation of waking experience and memory. *Trends Neurosci.* *33*, 220–229.
- O'Neill, J., Senior, T., and Csicsvari, J. (2006). Place-selective firing of CA1 pyramidal cells during sharp wave/ripple network patterns in exploratory behavior. *Neuron* *49*, 143–155.
- Ohno-Shosaku, T., Matsui, M., Fukudome, Y., Shosaku, J., Tsubokawa, H., Taketo, M.M., Manabe, T., and Kano, M. (2003). Postsynaptic M1 and M3 receptors are responsible for the muscarinic enhancement of retrograde endocannabinoid signalling in the hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* *18*, 109–116.
- Ohno-Shosaku, T., Tsubokawa, H., Mizushima, I., Yoneda, N., Zimmer, A., and Kano, M. (2002). Presynaptic cannabinoid sensitivity is a major determinant of depolarization-induced retrograde suppression at hippocampal synapses. *J. Neurosci.* *22*, 3864–3872.
- Owens, D.F., and Kriegstein, A.R. (2002). Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nat. Rev. Neurosci.* *3*, 715–727.
- Pacher, P., and Mechoulam, R. (2011). Is lipid signaling through cannabinoid 2 receptors part of a protective system? *Prog. Lipid Res.* *50*, 193–211.
- Pan, B., Wang, W., Zhong, P., Blankman, J.L., Cravatt, B.F., and Liu, Q. (2011). Alterations of endocannabinoid signaling, synaptic plasticity, learning, and memory in monoacylglycerol lipase knock-out mice. *J. Neurosci.* *31*, 13420–13430.

- Pepeu, G., and Giovannini, M.G. (2004). Changes in acetylcholine extracellular levels during cognitive processes. *Learn. Mem.* **11**, 21–27.
- Piomelli, D. (2003). The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat. Rev. Neurosci.* **4**, 873–884.
- Piskorowski, R.A., and Chevaleyre, V. (2012). Synaptic integration by different dendritic compartments of hippocampal CA1 and CA2 pyramidal neurons. *Cell. Mol. Life Sci.* **69**, 75–88.
- Pitler, T.A., and Alger, B.E. (1992). Postsynaptic spike firing reduces synaptic GABA_A responses in hippocampal pyramidal cells. *J. Neurosci.* **12**, 4122–4132.
- Pitler, T.A., and Alger, B.E. (1994). Depolarization-induced suppression of GABAergic inhibition in rat hippocampal pyramidal cells: G protein involvement in a presynaptic mechanism. *Neuron* **13**, 1447–1455.
- Pouille, F., and Scanziani, M. (2001). Enforcement of temporal fidelity in pyramidal cells by somatic feed-forward inhibition. *Science* **293**, 1159–1163.
- Puighermanal, E., Marsicano, G., Busquets-Garcia, A., Lutz, B., Maldonado, R., and Ozaita, A. (2009). Cannabinoid modulation of hippocampal long-term memory is mediated by mTOR signaling. *Nat. Neurosci.* **12**, 1152–1158.
- Scott, R.C., Richard, G.R., Holmes, G.L., and Lenck-Santini, P.-P. (2011). Maturation dynamics of hippocampal place cells in immature rats. *Hippocampus* **21**, 347–353.
- Shinohara, Y., Hosoya, A., Yahagi, K., Ferecskó, A.S., Yaguchi, K., Sík, A., Itakura, M., Takahashi, M., and Hirase, H. (2012). Hippocampal CA3 and CA2 have distinct bilateral innervation patterns to CA1 in rodents. *Eur. J. Neurosci.* **35**, 702–710.
- Squire, L.R., Stark, C.E.L., and Clark, R.E. (2004). The medial temporal lobe. *Annu. Rev. Neurosci.* **27**, 279–306.
- Stella, N. (2004). Cannabinoid signaling in glial cells. *Glia* **48**, 267–277.
- Stella, N. (2010). Cannabinoid and cannabinoid-like receptors in microglia, astrocytes, and astrocytomas. *Glia* **58**, 1017–1030.
- Van Strien, N.M., Cappaert, N.L.M., and Witter, M.P. (2009). The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nat. Rev. Neurosci.* **10**, 272–282.
- Stuart, G., and Sakmann, B. (1995). Amplification of EPSPs by axosomatic sodium channels in neocortical pyramidal neurons. *Neuron* **15**, 1065–1076.
- Szabadits, E., Cserép, C., Szonyi, A., Fukazawa, Y., Shigemoto, R., Watanabe, M., Itohara, S., Freund, T.F., and Nyiri, G. (2011). NMDA receptors in hippocampal GABAergic synapses and their role in nitric oxide signaling. *J. Neurosci.* **31**, 5893–5904.
- Szabo, B., Urbanski, M.J., Bisogno, T., Di Marzo, V., Mendiguren, A., Baer, W.U., and Freiman, I. (2006). Depolarization-induced retrograde synaptic inhibition in the mouse cerebellar cortex is mediated by 2-arachidonoylglycerol. *J. Physiol. (Lond.)* **577**, 263–280.
- Tanimura, A., Yamazaki, M., Hashimoto, Y., Uchigashima, M., Kawata, S., Abe, M., Kita, Y., Hashimoto, K., Shimizu, T., Watanabe, M., et al. (2010). The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol produced by diacylglycerol lipase alpha mediates retrograde suppression of synaptic transmission. *Neuron* **65**, 320–327.
- Taube, J.S. (1998). Head direction cells and the neurophysiological basis for a sense of direction. *Prog. Neurobiol.* **55**, 225–256.
- Trettel, J., Fortin, D.A., and Levine, E.S. (2004). Endocannabinoid signalling selectively targets perisomatic inhibitory inputs to pyramidal neurones in juvenile mouse neocortex. *J. Physiol. (Lond.)* **556**, 95–107.

- Tsou, K., Mackie, K., Sañudo-Peña, M.C., and Walker, J.M. (1999). Cannabinoid CB1 receptors are localized primarily on cholecystinin-containing GABAergic interneurons in the rat hippocampal formation. *Neuroscience* *93*, 969–975.
- Twitchell, W., Brown, S., and Mackie, K. (1997). Cannabinoids inhibit N- and P/Q-type calcium channels in cultured rat hippocampal neurons. *J. Neurophysiol.* *78*, 43–50.
- Varvel, S.A., Wise, L.E., Niyuhire, F., Cravatt, B.F., and Lichtman, A.H. (2007). Inhibition of fatty-acid amide hydrolase accelerates acquisition and extinction rates in a spatial memory task. *Neuropsychopharmacology* *32*, 1032–1041.
- Wagner, J.J., and Alger, B.E. (1996). Increased neuronal excitability during depolarization-induced suppression of inhibition in rat hippocampus. *J. Physiol. (Lond.)* *495 (Pt 1)*, 107–112.
- Wang, J., and Zucker, R.S. (2001). Photolysis-induced suppression of inhibition in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J. Physiol. (Lond.)* *533*, 757–763.
- Wilson, R.I., Kunos, G., and Nicoll, R.A. (2001). Presynaptic specificity of endocannabinoid signaling in the hippocampus. *Neuron* *31*, 453–462.
- Wilson, R.I., and Nicoll, R.A. (2001). Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature* *410*, 588–592.
- Xu, J.-Y., Chen, R., Zhang, J., and Chen, C. (2010). Endocannabinoids differentially modulate synaptic plasticity in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *PLoS ONE* *5*, e10306.
- Zhu, P.J., and Lovinger, D.M. (2010). Developmental alteration of endocannabinoid retrograde signaling in the hippocampus. *J. Neurophysiol.* *103*, 1123–1129.
- Zhuang, S., Hampson, R.E., and Deadwyler, S.A. (2005). Behaviorally relevant endocannabinoid action in hippocampus: dependence on temporal summation of multiple inputs. *Behav Pharmacol* *16*, 463–471.

Résumé

Les neurones pyramidaux sont constamment bombardés par une activité GABAergique spontanée qui régule le comportement de la décharge neuronale. Des résultats récents ont montré que cette activité spontanée GABAergique pouvait moduler l'excitabilité mais aussi la fidélité temporelle de décharge d'un neurone définie comme sa capacité à reproduire à l'identique un patron de décharge lors de la présentation répétée d'un même stimulus (Caillard, 2011). D'autre part, de nombreuses études ont caractérisé l'existence d'une plasticité à court-terme de l'activité GABAergique médiée par les endocannabinoïdes. Ce phénomène, connu sous le nom de DSI (Depolarization-induced Suppression of Inhibition) a été décrit dans de nombreuses structures comme le cervelet, le cortex ou encore l'hippocampe (pour revue voir Freund et al. 2003 ; Kano et al. 2009).

Au cours de ma thèse, j'ai étudié quelles pouvaient être les conséquences fonctionnelles de la production d'endocannabinoïdes sur l'activité neuronale et en particulier sur la fidélité temporelle de la décharge des neurones pyramidaux de la région CA1 de l'hippocampe. Dans un premier temps nous avons montré que le profil de décharge *in vivo* des cellules de lieu de la région CA1 de l'hippocampe pouvait induire, quand il était rejoué *in vitro*, une diminution de la libération spontanée de GABA via la voie de signalisation des endocannabinoïdes. Nous avons observé ensuite que cette diminution transitoire de la transmission GABAergique était associée à une amélioration de la fidélité temporelle de la décharge des neurones pyramidaux de la région CA1 de l'hippocampe.

D'autre part, nous nous sommes intéressés à l'impact que pourrait avoir une plasticité de l'activité inhibitrice antérograde (ou feed-forward inhibition) sur le couplage entre une entrée synaptique excitatrice et l'émission d'un potentiel d'action (couplage EPSP-Spike). Jusqu'à présent, cette inhibition antérograde a été montrée comme amélioratrice de la précision temporelle de la décharge neuronale évaluée lors du couplage entre une entrée synaptique excitatrice et l'émission d'un potentiel d'action (couplage EPSP-Spike) (Pouille and Scanziani, 2001). Nos travaux ont montré d'une part que cette inhibition antérograde était sensible aux endocannabinoïdes, et d'autre part que l'inhibition antérograde améliorait ou dégradait la précision temporelle du couplage EPSP-Spike selon la probabilité de couplage initiale.

En conclusion, nos travaux suggèrent que l'activité des cellules de lieu de la région CA1 de l'hippocampe peut provoquer, par la synthèse et la libération rétrograde d'endocannabinoïdes, une diminution à court-terme de l'activité GABAergique reçue par ces cellules avec pour conséquence des modifications de la précision temporelle de la décharge neuronale.

Summary

Pyramidal neurons are constantly bombarded by spontaneous GABAergic activity that regulates their firing behaviour. Recent results have shown that this spontaneous GABAergic activity can modulate both the excitability and the temporal fidelity of action potential discharge (Caillard, 2011). Many studies have characterized the existence of short-term plasticity of GABAergic activity mediated by endocannabinoids. This phenomenon, known as DSI (Depolarization-induced Suppression of Inhibition) has been described in many brain structures such as the cerebellum, cortex or hippocampus (for review see Freund et al., 2003; Kano et al. 2009).

During my PhD thesis, I have evaluated the functional consequences of the endocannabinoid production on neuronal activity and in particular on the spike-time precision of the CA1 pyramidal neurons. As a first step we have shown that the *in vivo* firing pattern of place cells could induce, when replayed *in vitro*, a decrease in spontaneous GABA release by the endocannabinoid signalling pathway. We then observed that this transient depression of GABAergic transmission improved spike-time precision of CA1 pyramidal neurons.

In addition, we studied the impact that could have plasticity of feed-forward inhibition on Excitatory Post-Synaptic Potential (EPSP)-Spike coupling. So far, feed-forward inhibition has shown an enforcement of temporal fidelity in CA1 pyramidal neurons during EPSP-Spike coupling (Pouille and Scanziani, 2001). Our work has shown first that feed-forward inhibition was sensitive to endocannabinoids; second that feed-forward inhibition improved or degraded the EPSP-Spike temporal precision according to the initial probability of EPSP-Spike coupling.

In conclusion, our work suggests that, in the hippocampus, CA1 place cell firing can induce, following the synthesis and retrograde release of endocannabinoids, a short-term decrease in the GABAergic activity received by these cells that consequently affects their spike-time precision.