NNT/NL : 0000AIXM0000/000ED000

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue à Aix-Marseille Université
le 16 décembre 2022 par

Arnaldo Ferreira Gomes Da Silva

Evaluation dynamique et fonctionnelle de l'inhibition périsomatique dans le circuit hippocampique au cours du développement normal et pathologique chez la souris *in vivo*

Discipline
Biologie Santé

Spécialité
Neurosciences

École doctorale
ED62-SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Laboratoire/Partenaires de recherche
INSERM-U1249 - INMED Institut de Neurobiologie de la Méditerranée

Composition du jury

Pascal BRANCHEREAU Univ. Bordeaux & CNRS - UMR 5287	Rapporteur / Président du jury
Sabine LEVI INSERM - UMR-S 1270	Rapporteuse
Hélène MARIE CNRS-UCA - UMR 7275	Examinatrice
Michel PICARDO INSERM U1249 - INMED	Examinateur
Xavier LEINEKUGEL INSERM U1249 - INMED	Directeur de thèse

Affidavit

Je soussigné, Arnaldo Ferreira Gomes Da Silva, déclare par la présente que le travail présenté dans ce manuscrit est mon propre travail, réalisé sous la direction scientifique de Xavier Leinekugel, dans le respect des principes d'honnêteté, d'intégrité et de responsabilité inhérents à la mission de recherche. Les travaux de recherche et la rédaction de ce manuscrit ont été réalisés dans le respect à la fois de la charte nationale de déontologie des métiers de la recherche et de la charte d'Aix-Marseille Université relative à la lutte contre le plagiat.
Ce travail n'a pas été précédemment soumis en France ou à l'étranger dans une version identique ou similaire à un organisme examinateur.

Fait à Marseille, le 12 octobre 2022

Cette œuvre est mise à disposition selon les termes de la Licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 4.0 International.

Affidavit

I, undersigned, Arnaldo Ferreira Gomes Da Silva, hereby declare that the work presented in this manuscript is my own work, carried out under the scientific direction of Xavier Leinekugel, in accordance with the principles of honesty, integrity and responsibility inherent to the research mission. The research work and the writing of this manuscript have been carried out in compliance with both the French national charter for Research Integrity and the Aix-Marseille University charter on the fight against plagiarism.

This work has not been submitted previously either in this country or in another country in the same or in a similar version to any other examination body.

Place Marseille, date 12 octobre 2022

Cette œuvre est mise à disposition selon les termes de la Licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 4.0 International.

Liste de publications et participation aux conférences

1) Liste des publications[1] réalisées dans le cadre du projet de thèse :

    1. Dubanet O, **Ferreira Gomes Da Silva A**, Frick A, Hirase H, Beyeler A, Leinekugel X. Probing the polarity of spontaneous perisomatic GABAergic synaptic transmission in the mouse CA3 circuit *in vivo*. Cell Rep. 2021 Jul 13;36(2):109381. doi: 10.1016/j.celrep.2021.109381. PMID: 34260906.

    2. Carreño-Muñoz MI, Medrano MC, **Ferreira Gomes Da Silva A**, Gestreau C, Menuet C, Leinekugel T, Bompart M, Martins F, Subashi E, Aby F, Frick A, Landry M, Grana M, Leinekugel X. Detecting fine and elaborate movements with piezo sensors provides non-invasive access to overlooked behavioral components. Neuropsychopharmacology. 2022 Mar;47(4):933-943. doi: 10.1038/s41386-021-01217-w. Epub 2021 Nov 11. PMID: 34764433; PMCID: PMC8882191.

2) Participation aux conférences[2] et écoles d'été au cours de la période de thèse :
    1. Poster : NeuroFrance, May 2019, Marseille, France
    2. Poster: Neuroscience 2019 (SfN), Society for Neurosciences, October 2019, Chicago, US
    3. Poster: Fresh look on inhibition congress, April 2022, Marseille, France
    4. Workshop : Epilepsie, Mai 2019, Marseille, France

[1] Cette liste comprend les articles publiés, les articles soumis à publication et les articles en préparation ainsi que les livres, chapitres de livre et/ou toutes formes de valorisation des résultats des travaux propres à la discipline du projet de thèse. La référence aux publications doit suivre les règles standards de bibliographie et doit être conforme à la charte des publications d'AMU.

[2] Le terme « conférence » est générique. Il désigne à la fois « conférence », « congrès », « workshop », « colloques », « rencontres nationales et/ou internationales » … etc.

Indiquer si vous avez fait une présentation orale ou sous forme de poster.

-2022-

Remerciements

Je souhaite adresser mes remerciements à Monsieur Pascal Branchereau, Professeur à l'Université de Bordeaux ainsi qu'à Madame Sabine Lévi, Directrice de recherche à l'institut de Fer à moulin à Paris, qui me font l'honneur d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mon travail de thèse. J'exprime également ma gratitude à Madame Helène Marie, Directrice de recherche à l'IPMC (Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire), et à Monsieur Michel Picardo, Chercheur à l'INMED d'avoir bien voulu examiner ce travail.

Ce travail de thèse a débuté au sein du Neurocentre Magendie à Bordeaux dirigé par le Dr. Stéphane Oliet durant les 15 premiers mois de ma thèse. La suite a été effectuée à l'INMED (l'Institut de Neurobiologie de la Méditerranée), institut dirigé par le Dr. Rosa Cossart, que je remercie chaleureusement d'avoir permis que je puisse m'épanouir rapidement après cette période de transition dans des conditions sanitaires délicates.

Xavier, je te remercie grandement pour cette formidable aventure. Merci pour la passion que tu portes à ce métier (je crois que tu m'as contaminé), merci pour ta bonne humeur, ta disponibilité sans limites, merci pour tes conseils, pour toutes ces discussions sans fin qui n'ont cessé de me faire grandir. Je n'aurai jamais pensé évoluer autant scientifiquement en si peu de temps. A travers ces 4 années, si on fait le bilan, on aura fait face à pas mal de choses quand même… mais en tout cas une chose est sure : si c'était à refaire, je n'hésiterai pas une seule seconde ! Pour finir, je me permets un petit reproche, j'ai légèrement été déçu par ton niveau au Risk, jeu dont tu ne cesses de vanter les mérites, je m'attendais à affronter un plus grand stratège… mais bon tu gagneras surement la prochaine fois 😉

Alex, Nico il m'est impossible de ne pas vous remercier. J'ai l'impression de vous devoir énormément. Vous avez consacré un temps considérable pour m'accompagner dans ce nouveau labo (et en dehors). Je me souviens encore de mes premiers ~~jours~~ mois à vous demander toutes les 10 min de l'aide. Vous avez rendu mon intégration si facile alors que les conditions n'étaient clairement pas favorables. Alex, ton style (sans oublier celui d'Ugo) sera toujours une inspiration pour moi ;) Nico, ta sagesse et ton calme sont un véritable exemple. Vous êtes mon coup de cœur marseillais ! (Puisqu'on ne peut pas compter sur l'OM…)

Un grand merci à Philippe, une personne que j'apprécie grandement. Ça a été un réel plaisir de te rencontrer. J'ai vraiment apprécié toutes nos discussions, nos débats sportifs ou encore nos débriefs du lundi. Tu auras quand même réussi à me refaire aimer la F1.

Robin comment ne pas te mentionner alors que je parle de sport. Merci pour les sorties running, mais aussi pour toutes nos conversations et la motivation que tu me donnes dans ce sprint final.

Paul, Herve, c'est un réel plaisir de partager mon bureau au quotidien avec vous. Merci Paul de m'avoir fait découvrir des thés exceptionnels. J'espère qu'un jour (quand tu auras de la barbe) tu laisseras le sucre de côté…

Yasmine, comment ne pas te remercier. Heureusement que tu m'as prévenu des nombreuses embuches qui m'attendaient en cette fin de thèse, j'ai pu en éviter pas mal (même si j'avais encore le temps… ou pas). Merci pour ta gentillesse et aussi pour le thé que j'attends toujours.

Clément et Christian, j'ai appris pas mal de chose intéressante avec vous, j'ai vraiment apprécié votre passion et votre pédagogie en plus de votre gentillesse. Julie, Ambre, (je serais toujours impressionné par vos chirurgies) vous m'avez sauvé de quelques situations relativement urgentes... Merci pour l'aide.

Pierre Pascal, Roustem, Marat, Michel, Agnès, merci pour les conseils, les réponses aux nombreuses questions qui fusent dans ma tête, ou encore les nombreuses discussions/réflexions scientifiques.

Merci également à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à ce projet : Francesca, Aurélie pour la quantité phénoménale de génotypage effectuée, Marie pour toutes les immunos (je regrette de ne pas avoir connu ce service plus tôt…), le personnel de l'animalerie (Séverine, Philippe, Victor, Elodie) qui prennent soins de nos petites souris, et enfin toute l'équipe administrative.

J'aimerai également remercier Ugo, Romain, Mira, Erwan, Gabi, Dani, Alba, Jessica, Phan (my guy), Mélanie, Vinca, Nico Hugues (rdv à The Pub), Célanie, Louison, Lucas G-L, Nagham (NaRRRham ou Naguam ?) que ce soit pour de l'aide ou bien pour des moments passés ensemble.

Une pensée pour Olivier, joueur passable de brawl-star, et guitariste de renommé à ses heures perdues. Merci d'avoir pris le temps de me former à des techniques relativement délicates. Merci également à Anna d'avoir été disponible scientifiquement mais aussi de m'avoir intégré aisément dans ton équipe, même si ce fut de courte durée... J'ai vraiment apprécié le début de ma thèse grâce à vous. Je remercie également tous les étudiants qui sont passés dans notre équipe pour les moments partagés durant ma thèse : Sidi, Erwan, Lucien le magicien, Ariane, Léna et bien sûr Marina.

Yann, Xavier, on a débuté l'aventure ensemble avant de se séparer chacun de notre côté. C'est grâce à votre influence que j'ai pu en arriver là. Quelle chance j'ai eu de vous rencontrer, on est bien d'accord hein ;)

Enfin, je voudrais remercier chaleureusement les personnes qui me sont chers, à commencer par mes parents, Arnaldo (au soutien inégalable, et oui du coup je suis Arnaldo Jr.) et Sandrine (maman la plus forte !), et ma grand-mère Marie-Line. C'est grâce à vous que je suis la aujourd'hui et j'en suis fière. Oreste et José, votre soutien et aide aura été précieux et indispensable à ma réussite. Mon frère et ma sœur, Emmanuel la personne que j'idéalise le plus, et Isaura mon sosie démoniaque féminin avec qui je partage une complicité sans égale. Je pense que vous savez ce que je pense de vous, mais je voudrais tout de même vous remercier de toujours être présent, et encore plus dans les moments difficiles comme celui-ci.

Merci aussi à Nico, pour tous les moments passés, les échanges téléphoniques quotidiens à n'en pas finir, les fous-rires, les visites régulières, merci d'être comme tu es ! Rafa, merci d'être toujours présent même à 1500km de Marseille. Merci pour toute l'attention que tu me portes, pour la motivation dans les moments compliqués mais aussi pour tous les délires qu'on a et les bêtises qu'on a pu faire ensemble.

Je souhaite dédier cette thèse à ma famille et plus particulièrement à Manuel, Maria (O mae), et Michel pour qui mes études étaient une grande fierté et dont j'aurai tellement aimé qu'ils soient témoins de cet accomplissement, mais aussi au p'tit nouveau qui nous a rejoint très récemment : Eli.

Le meilleur pour la fin, un immense merci à la personne qui me facilite tout et qui me comprend mieux que quiconque, Léa. Tu fais partie des plus belles choses qui me soit arrivé et je me sens tellement chanceux de t'avoir à mes côtés. Merci de me combler de bonheur et de rendre chaque moment merveilleux. Je n'ai qu'une hâte, c'est qu'on puisse enfin être réunis et vivre notre meilleure vie qu'importe la destination, tant qu'elle est faite d'amour et de science !

Résumé

L'hippocampe est une structure essentielle pour les processus d'apprentissage et la mémoire, y compris dans les sphères émotionnelles et les relations sociales. Le fonctionnement de ce circuit neuronal repose sur des interactions complexes entre cellules pyramidales glutamatergiques excitatrices et divers types d'interneurones GABAergiques inhibiteurs, dont on connait mal les rôles exacts car il est très difficile d'étudier *in vivo* la fonction inhibitrice issue d'interneurones spécifiques. L'altération des interactions synaptiques entre cellules pyramidales et interneurones de l'hippocampe est de plus à la base de nombreuses pathologies telles que l'épilepsie, l'autisme, ou la maladie d'Alzheimer. Ce travail de thèse porte sur le développement de la fonction inhibitrice périsomatique et sur les altérations du circuit hippocampique et du phénotype comportemental associés aux troubles neurodéveloppementaux chez la souris.

Parmi les différents types d'interneurones, ceux dont l'axone projette sur les corps cellulaires (inhibition périsomatique) des cellules pyramidales sont particulièrement efficaces pour bloquer la décharge de potentiels d'action. C'est la raison pour laquelle on considère qu'ils jouent un rôle particulièrement important non seulement dans le codage de l'information (en contrôlant quelle cellule est en mesure ou non de décharger) mais aussi dans l'équilibre du circuit, pour éviter que l'excitation réciproque entre cellules pyramidales ne dégénère en crise d'épilepsie. L'efficacité de cette inhibition dite périsomatique dépend largement du gradient électrochimique des ions chlorure (Cl-), c'est-à-dire la combinaison entre le potentiel membranaire et la répartition des ions Cl- entre l'intérieur et l'extérieur du neurone cible. Or, ces paramètres ne cessent de changer au fil de l'activité neuronale, et il a même été démontré que le gradient Cl- pouvait s'inverser, générant un effet paradoxalement excitateur de la transmission GABAergique. Ce phénomène, qui participerait à la mise en place physiologique des circuits neuronaux immatures, est aujourd'hui également considéré comme une source majeure de dérèglement des circuits neuronaux dans diverses pathologies comme l'épilepsie, l'autisme ou la schizophrénie. Il s'agit donc d'un champ de recherche aux implications cliniques directes. La première et principale partie de ma thèse a consisté à l'évaluation de cette hypothèse par une nouvelle approche, directe et non invasive, dans les conditions naturelles, *in vivo*, qui n'avait pas été réalisée jusque-là par manque de solution technique adaptée. Sur la base d'enregistrements électrophysiologiques sophistiqués sur l'animal anesthésié ou en comportement, j'ai pu quantifier la transmission GABAergique périsomatique au cours du développement normal et sur plusieurs modèles de pathologies du spectre autistique et du retard mental (souris Vangl2-KO, Dp1Yey, FMR1-KO, BTBR, VPA). Mes résultats indiquent l'expression d'altérations inattendues de la transmission inhibitrice périsomatique dans ces conditions.

Un autre objectif fondamental consiste à caractériser les altérations comportementales associées aux dysfonctionnements des circuits neuronaux. De nombreux tests standardisés sont couramment utilisés pour une évaluation rapide et efficace des principales composantes cognitives, motrices et émotionnelles, mais les progrès technologiques récents et l'intérêt croissant pour une description moins réductrice du comportement ont fortement contribué au développement d'une approche plus éthologique du phénotypage comportemental. Aussi,

dans la seconde partie de ma thèse, j'ai contribué à la validation d'un nouveau dispositif de phénotypage comportemental qui permet, à travers la caractérisation fine des dynamiques temporelles des mouvements (toilettage, locomotion, rythmes cardio-respiratoires...), de détecter l'expression d'altérations motrices et émotionnelles dans les troubles neurodéveloppementaux.

Mots clés : électrophysiologie, interneurones GABAergiques, hippocampe, souris, développement, assemblées neuronales

Abstract

The hippocampus is an essential structure for learning processes and memory, including emotional and social spheres. The functioning of this neuronal circuit is based on complex interactions between excitatory glutamatergic pyramidal cells and various types of inhibitory GABAergic interneurons. The precise roles performed by interneurons subtype is poorly understood because it is very challenging to study the inhibitory function of specific interneurons *in vivo*. Alterations of synaptic interactions between pyramidal cells and hippocampal interneurons also underlies many pathologies such as epilepsy, autism, or Alzheimer's disease. This thesis work focuses on the development of perisomatic inhibitory function and on alterations in the hippocampal circuit and behavioral phenotype associated with neurodevelopmental disorders in mice.

Among the different types of interneurons, those whose axons project onto the cell bodies (perisomatic inhibition) of pyramidal cells are particularly effective in blocking action potentials of their target cells. This is the reason why they are considered to play an important role not only in the coding of information (by controlling which cell is able to discharge or not) but also in the balance of the circuit, to prevent reciprocal excitation between pyramidal cells from degenerating into epileptic seizure. The effectiveness of perisomatic inhibition depends directly on Cl- electrochemical gradient, i.e. the combination of the membrane potential and Cl- distribution across the membrane of the target neuron. However, these parameters are constantly changing during neuronal activity, and it has even been shown that the Cl- gradient can be reversed, resulting in paradoxically excitatory GABAergic transmission. This phenomenon, which contribute to the development of immature neuronal circuits, is also considered to be a major source of disruption of neuronal circuits in various pathologies such as epilepsy, autism or schizophrenia. It is therefore a field of research with direct clinical implications. The first and main part of my thesis consisted in the evaluation of this hypothesis by a new approach, direct and non-invasive, in natural conditions, *in vivo*, which had not been carried out until now due to the lack of suitable technical solution. On the basis of sophisticated electrophysiological recordings on anaesthetised or behaving animals, I was able to quantify perisomatic GABAergic transmission during normal development and in several models of autism spectrum disorders and mental retardation (Vangl2-KO, Dp1Yey, FMR1-KO, BTBR, VPA mice). My results indicate the expression of unexpected alterations in perisomatic inhibitory transmission under these conditions.

Another fundamental goal is to characterise the behavioural alterations associated with neural dysfunction. Many standardised tests are commonly used for a quick and efficient evaluation of the main cognitive, motor and emotional components, but recent technological advances and the growing interest in a less reductive description of behaviour have strongly contributed to the development of a more ethological approach of behavioural phenotyping. Thus, in the second part of my thesis, I contributed to the validation of a new behavioural phenotyping device that allows, through the fine characterisation of temporal dynamics of movements (grooming, locomotion, cardio-respiratory rhythms...), to detect the expression of motor and emotional alterations in neurodevelopmental disorders.

Keywords : electrophysiology, GABAergic interneurons, hippocampus, mouse, development, neuronal assemblies

Table des matières

Abréviations 1
Table des figures 4
INTRODUCTION GENERALE 6
PARTIE 1 : L'hippocampe : structure clé pour la mémoire et le codage 7
I- Description anatomique de l'hippocampe 7
II- La connectivité intrinsèque de l'hippocampe 8
III- La connectivité extrinsèque de l'hippocampe 9
IV- Les cellules pyramidales de l'hippocampe 10
V- Les interneurones GABAergiques de l'hippocampe 12
1. Inhibition dendritique GABAergique 12
2. Inhibition périsomatique GABAergique 14
3. Inhibition peri-axonique GABAergique 16
PARTIE 2 : La neurotransmission dans l'hippocampe 17
I- La neurotransmission glutamatergique 17
1. Les récepteurs ionotropiques glutamatergiques (iGluRs) 17
a. Les récepteurs AMPA 17
b. Les récepteurs KA 17
c. Les récepteurs NMDA 18
2. Les récepteurs métabotropiques glutamatergiques (mGluRs) 18
3. Plasticité de la transmission glutamatergique 18
4. Propriétés fonctionnelles de la transmission excitatrice vers les cellules pyramidales et les interneurones 19
II- La neurotransmission GABAergique 20
1. Les récepteurs GABA-B métabotropiques 21
a. Structure 21
b. Mécanisme d'action 21
2. Les récepteurs GABA-A ionotropiques, perméables aux ions chlorures 23
a. Structure : 23
b. Mécanisme d'action : 24
c. Différents types d'inhibition des récepteurs GABA-A 25

3. Les récepteurs GABA-C 29
III- L'homéostasie des ions chlorures 29
1. Les canaux Cl- 30
2. Les transporteurs du Cl- 31
3. NKCC1 32
4. KCC2 33
5. La séquence développementale du GABA : effet dépolarisant et excitateur 37
PARTIE 3 : Fonctionnement du circuit hippocampique 42
I- Le circuit hippocampique chez l'adulte 42
1. Le modèle hebbien des assemblées neuronales pour le codage et la mémoire associative 42
2. Mémoire épisodique et codage spatial dans l'hippocampe 44
3. Encodage et consolidation : deux processus distincts du circuit hippocampique 45
4. Dynamiques temporelles de l'activité dans l'encodage et la plasticité : les rythmes cérébraux 46
II- Le circuit hippocampique durant le développement 51
1. L'activité spontanée non corrélée 51
2. Les activités de type plateaux d'assemblées synchrones (SPA) 51
3. Les potentiels géants dépolarisants (GDPs) 52
4. Les early sharp-waves (eSW) 53
5. L'innervation GABAergique périsomatique 54
PARTIE 4 : Déficit inhibiteur et régulation du Cl- dans la pathologie 55
I- Pathologies neurodéveloppementales : 55
1. Trouble du spectre autistique 55
2. La voie de la polarité cellulaire planaire 56
3. Epilepsie 56
II- Epilepsie, maladies neurodéveloppementales et GABA excitateur : un gradient Cl- inversé ? 59
III- Espoirs et difficultés dans la question de l'évaluation de la fonction inhibitrice et de la régulation du Cl- dans la pathologie 60
PARTIE 5 : Le phénotypage comportemental 62
Objectifs de thèse 65
RESULTATS 66
Articles publiés 67
I- Article 1 : 67

Probing the polarity of spontaneous perisomatic GABAergic synaptic transmission in the mouse CA3 circuit *in vivo* (Dubanet et al., 2021, Cell Reports) 67

II- Article 2 : 68

Detecting fine and elaborate movements with piezo sensors provides non-invasive access to overlooked behavioral components (Carreño-Muñoz et al., 2021, Neuropsychopharmacology)..... 68

Résultats 69

DISCUSSION GENERALE 79

BIBLIOGRAPHIE 85

Abréviations

A	Antérieur
AE	Échangeurs anions : Cl--HCO3-
AI	Anomalies interictales
AMPA	Acide alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionique
BiCs	Neurones bistratifiés
BLA	Amygdale basolatéral
BZ	Benzodiazépines
CA	Corne d'Ammon
Ca^{2+}	Calcium
CACA	Cis-aminocrotonic acid
CaCC	Canaux activés par le calcium
CamKII	Protéine kinase 2 calcium/calmoduline dépendante
CB1	Cannabinoïde de type 1
CCC	Cotransporteurs cation-Chlorure
CCKBCs	Neurones en panier qui expriment la cholécystokinine
CE	Cortex entorhinal
CFTR	Canaux activés par l'AMPc
[Cl-]i	Concentration intracellulaire de chlorure
CSD	Densité de source de courant
D	Dorsal
DG	Gyrus denté
E	Embryonnaire
E_{cl}	Potentiel d'équilibre du Cl-
EEG	Électroencéphalogramme
ELT	Épilepsie du lobe temporal
eSW	early Sharp-Waves
GABA	Acide gamma-amino butyrique
GDP	Potentiels géants dépolarisants
GIRK	Courant potassique rectifiant activé par les protéines G
HCO^{3-}	Bicarbonate

iGluRs	Récepteurs ionotropiques glutamatergiques
IPSC	Courants post-synaptiques inhibiteurs
ISIs	Interneurones sélectifs des Interneurones
IvCs	Neurones en forme de lierre
K^+	Potassium
KA	Kaïnate
KCC	Cotransporteur K^+-Cl^-
LGAC	Canaux ioniques activés par un ligand
LS	Septum latéral
mGluRs	Récepteurs métabotropiques glutamatergiques
MMB	Corps mamillaires médians
MS	Septum médial
NA	Noyau accumbens
NCC	Cotransporteur Na^+-Cl^-
NDCBE	Échangeur Cl^--HCO^{3-} dépendant du Na^+
NGFs	Neurones en forme de glie
NKCC	Na^+-K^+-Cl^-
NMDA	N-methyl-D-aspartate
NPY	Neuropeptide Y
O-LM	Neurones Oriens-Lacunosum Moleculare
P	Postérieur
PCP	Polarité cellulaire planaire
PDS	Dépolarisation paroxysmale
PFC	Cortex préfrontal
PKC	Protéine kinase C
PLT	Potentialisation à long terme
PPAs	Neurones associés à la voie perforante
PPSE	Potentiel post synaptique excitateur
PPSIEs	Potentiel post synaptique inhibiteur extracellulaire
PRh	Cortex perirhinal
PV	Parvalbumine
PVBCs	Neurones en panier qui expriment la parvalbumine
RSC	Cortex retrosplénial
RVD	Diminution du volume réglementaire

RVI	Augmentation du volume réglementaire
SCAs	Neurones associés aux collatérales de Schaffer
SHF	Stimulation à haute fréquence
sl	Stratum lucidum
Slc	Solute Carrier
slm	Stratum lacunosum moleculare
so	Stratum oriens
sp	Stratum pyramidale
SPA	Activités de type plateaux d'assemblées synchrones
SPWR	Sharp Waves Ripples
sr	Stratum radiatum
SST	Somatostatine
SUB	Subiculum
SuM	Noyaux supramammillaires
SW	Sharp Waves
TM	Domaine transmembranaire
TSA	Trouble du spectre autistique
V	Ventral
VGlut	Transporteur vésiculaire du glutamate
VIP	Polypeptide intestinal vasoactif
Vm	Potentiel de membrane
VRAC	Canaux activés par le volume cellulaire

Table des figures

Figure 1 : Anatomie de l'hippocampe

Figure 2 : Circuit trisynaptique

Figure 3 : Connectivité intrinsèque et extrinsèque de l'hippocampe

Figure 4 : Cellule pyramidale de CA3a

Figure 5 : Diversité des neurones GABAergiques du CA1 hippocampique

Figure 6 : Caractéristiques morpho-physiologiques des interneurones PV en panier (PVBCs).

Figure 7 : Structure des sous unités du récepteurs GABA-B

Figure 8 : Structure des récepteurs GABA-A et localisation neuronale

Figure 9 : Schéma représentant l'inhibition shunt

Figure 10 : Schéma de la transmission GABAergique phasique dans le SNC

Figure 11 : Schéma de la transmission GABAergique tonique dans le SNC

Figure 12 : La signalisation cellulaire du Cl-

Figure 13 : Structure bidimensionnelle du cotransporteur NKCC1

Figure 14 : Structure bidimensionnelle du cotransporteur KCC2

Figure 15 : Régulation du volume cellulaire par les cotransporteurs cation-chlorure

Figure 16 : Changement de polarité de la réponse GABAergique au cours du développement

Figure 17 : Théorie des assemblées cellulaires de Hebb

Figure 18 : Représentation schématique du « binding problem »

Figure 19 : Les oscillations du réseau hippocampique

Figure 20 : Les Sharp Waves Ripples dans le réseau hippocampique

Figure 21 : La précession de phase

Figure 22 : Chronologie du développement de l'activité *in vitro* dans la région de CA1

Figure 23 : Activités synchrones récurrentes observées dans la région CA1 de l'hippocampe lors de stades précoces de développement (P4-P6)

Figure 24 : Spontaneous extracellular field inhibitory postsynaptic potentials (fIPSPs) *in vivo* in several cerebral regions

Figure 25 : Developmental emergence of fIPSPs in CA3

Figure 26 : Developmental emergence of ripples in CA3

Figure 27 : Developmental emergence of ripples in CA1

Figure 28 : Suppression of ripples by chemogenetic inactivation of PV interneurons in CA1
Figure 29 : Les paramètres de détection des fIPSPs utilisés avec le logiciel Mini Analysis
Figure 30 : Emergence de l'innervation de l'inhibition perisomatique GABAergique dans le CA3
Figure 31 : Différence de maturité des ripples à p10

INTRODUCTION GENERALE

PARTIE 1 : L'hippocampe : structure clé pour la mémoire et le codage

I- Description anatomique de l'hippocampe

Le système limbique est composé d'un ensemble de structures cérébrales qui jouent un rôle crucial dans l'apprentissage, la mémoire et les émotions. On distingue, parmi les structures qui le composent la formation hippocampique. Il s'agit d'une structure corticale bilatérale qui est située dans la partie médiane des lobes temporaux. Elle se compose de l'hippocampe et du cortex entorhinal reliés par le subiculum.

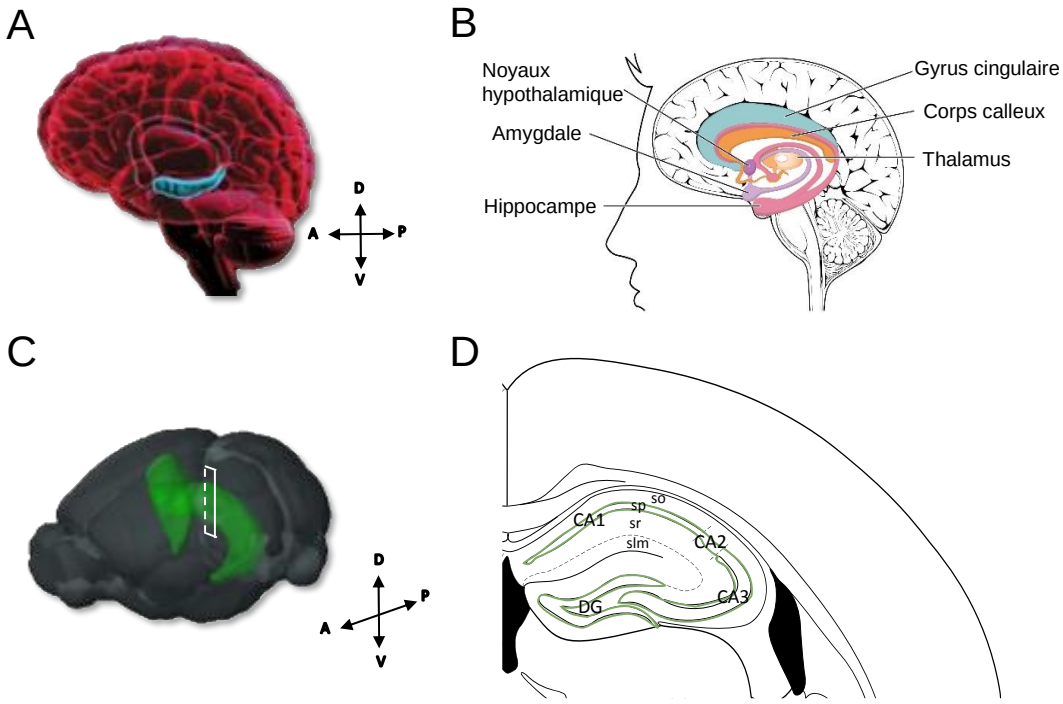


Figure 1 : Anatomie de l'hippocampe. A. Représentation schématique montrant la localisation de l'hippocampe (en bleu) chez l'homme, **B.** et au sein du système limbique. **C.** Représentation schématique montrant la localisation de l'hippocampe (en vert) au sein du cerveau chez la souris. **D.** Coupe coronale de la partie dorsale de l'hippocampe (rectangle blanc **C.**) illustrant les différentes couches de cette structure. A : antérieur ; P : postérieur ; D : dorsal ; V : ventral ; so : stratum oriens ; sp : stratum pyramidale ; sr : stratum radiatum ; slm : stratum lacunosum moleculare. C. Adapté de Allen Mouse Brain Atlas ; D. Adapté de 3D Brain Explorer

L'hippocampe, qui fait partie des structures cérébrales les plus étudiées, fut décrit pour la première fois par Ramon y Cajal. Il a été le premier à mettre en évidence l'existence de types cellulaires distincts, individualisés et organisés en différentes couches posant ainsi les bases de la connectivité neuronale de l'hippocampe (Ramón y Cajal 1909). L'hippocampe se décline en deux parties : le gyrus denté (DG) et la corne d'Ammon (CA) elle-même subdivisée en trois régions, CA1, CA2 et CA3. Ces dernières sont

organisées en plusieurs couches ou stratum. En partant de l'hippocampe dorsal vers le ventral on retrouve successivement, le stratum oriens (so), le stratum pyramidale (sp), le stratum radiatum (sr) ainsi que le stratum lacunosum moleculare (slm). La région CA3 possède spécifiquement une couche supplémentaire, le stratum lucidum (sl) situé entre le sp et le sr (**Figure 1**).

II- La connectivité intrinsèque de l'hippocampe

On distingue majoritairement deux populations neuronales dans l'hippocampe. Les interneurones qui jouent un rôle inhibiteur sont faibles en proportion et leur connectivité est en grande partie locale, et les neurones principaux qui sont excitateurs, dont la connectivité est en partie en dehors de leur région spécifique.

Ces neurones principaux représentent approximativement 80% de la population neuronale de l'hippocampe et exercent une neurotransmission glutamatergique excitatrice. On les retrouve dans deux régions sous forme d'une couche cellulaire dense appelée stratum pyramidale dans la Corne d'Amon (neurones pyramidaux) et stratum granulosum dans le Gyrus Denté (neurones granulaires). Ces neurones reçoivent leurs afférences excitatrices uniquement au niveau de leurs dendrites, tandis que les afférences inhibitrices peuvent se localiser à divers endroits suivant le type d'interneurone qui les connecte : sur leur soma, sur les dendrites proximales et sur le cône d'émergence de l'axone. Ces neurones principaux forment une boucle synaptique, appelé circuit tri-synaptique, mettant en jeu quatre groupes de neurones dans différentes structures intra et extra hippocampiques. Dans ce circuit, les neurones granulaires du Gyrus Denté reçoivent des afférences en provenance de la couche II du cortex entorhinal (CE) via la voie perforante, l'information transite ensuite vers les neurones principaux du CA3 via les fibres moussues (Claiborne, Amaral, et Cowan 1986) avant de rejoindre le CA1 par l'intermédiaire des collatérales de Schaffer (Shepherd et Harris 1998). Les neurones pyramidaux du CA1 projettent finalement dans la couche profonde du subiculum, principale voie de sortie de l'information, ainsi que dans les couches 5 et 6 du cortex entorhinal, bouclant ainsi le circuit trisynaptique (EC -> DG -> CA3 -> CA1) (Amaral et Witter 1989) (**Figure 2**). La mise en place de ce circuit se fait progressivement durant le développement comme cela a été décrit pour les neurones pyramidaux du CA3 vers le CA1 ou les connexions émergent à P2 pour devenir matures vers P7, les synapses ont été décrites comme étant purement NMDA sans composante AMPA (synapses silencieuses) (Durand, Kovalchuk, et Konnerth 1996; Gomez-Di Cesare et al. 1997). De façon intéressante il a été montré que la composante AMPA, nécessaire pour l'activation des récepteurs NMDA, pouvait être palliée par la transmission GABAergique excitatrice donnant ainsi lieu à une synergie entre récepteurs GABA et NMDA (Ben-Ari 1997; Leinekugel et al. 1997). De plus, les deux hippocampes, droit et gauche, sont également connectés entre eux au niveau du CA3 via la fimbria. Au-

delà des connexions entre sous-régions, il est intéressant de noter que les cellules pyramidales, surtout dans le CA3, font des connexions locales entre elles, aussi appelées collatérales récurrentes excitatrices.

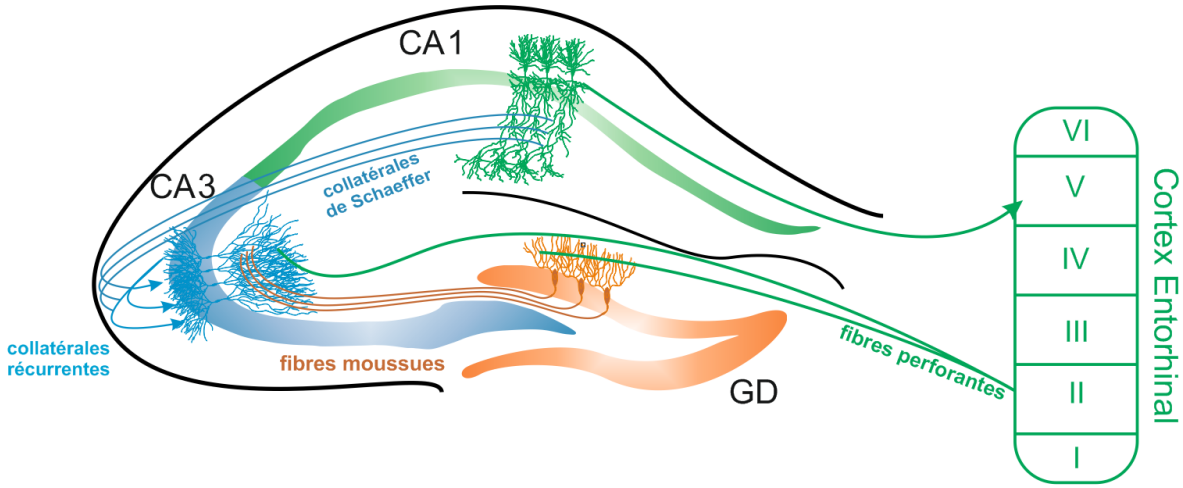


Figure 2 : Circuit trisynaptique. La voie perforante du cortex entorhinal projette sur le gyrus denté (et le CA3), qui projette sur le CA3 via les fibres moussues. Le CA3 projette sur le CA1 via les collatérales de Schaffer. Enfin, le CA1 projette à son tour vers le cortex entorhinal.

III- La connectivité extrinsèque de l'hippocampe

La théorie du circuit trisynaptique, modèle de connectivité intra-hippocampique, qui a participé au succès de l'hippocampe comme modèle expérimental par sa simplicité tend à être remise en cause et complexifiée. Il existe des connexions externes à l'hippocampe qui jouent un rôle tout aussi important que le circuit interne. Comme décrit dans une thèse (Leprince, 2022), l'hippocampe reçoit un très grand nombre d'afférences provenant des régions corticales et sous corticales telles que le septum, le subiculum, le thalamus, l'hypothalamus, l'amygdale ou encore le cortex entorhinal (**Figure 3**). Ce dernier est une structure qui est hautement interconnectée avec l'hippocampe (van Strien, Cappaert, et Witter 2009; Witter 1993; Witter et al. 2000). Du CE vers l'hippocampe, ces connexions se font via deux voies de projection, une voie indirecte et une voie directe. La voie indirecte, comme vu précédemment, consiste en la connexion entre les neurones de la couche II du CE et la couche moléculaire du DG via une voie appelée voie perforante (Hjorth-Simonsen 1972; Hjorth-Simonsen et Jeune 1972). On retrouve en plus une connexion directe appelée voie temporoammonique connectant les neurones excitateurs de la couche 3 du cortex entorhinal aux neurones pyramidaux de la région de CA1 via des contacts synaptiques au niveau du slm de CA1 (Witter, Kleven, et Flatmoen 2017). D'un point de vue fonctionnel, cette connectivité du CE vers l'hippocampe supporte un transfert d'informations sensorimotrices et spatiales nécessaires au rôle de l'hippocampe dans la formation de représentations mentales de son environnement par l'animal (Zhang et al. 2014). On distingue également

la projection directe de la couche II du cortex entorhinal vers le CA3 via la voie perforante. Ces connexions entre le CE et l'hippocampe se mettent en place relativement tôt lors du développement chez la souris. En utilisant des injections intra-hippocampiques de DiI, permettant de marquer les régions qui s'y projettent, il a été montré que des connexions en provenance du CE sont présentes à partir du jour embryonnaire (E) 15 avec une arborisation dans la lm à partir de E17 (Supèr et Soriano 1994).

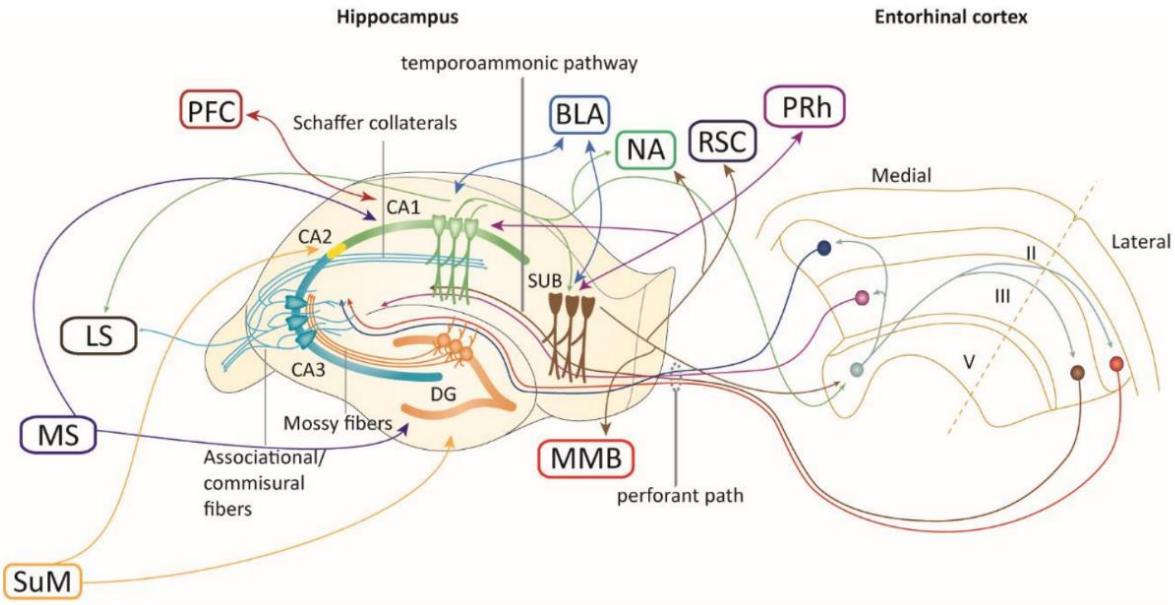


Figure 3 : Connectivité intrinsèque et extrinsèque de l'hippocampe. L'hippocampe (Hippocampus) reçoit ses afférences majeures des couches superficielles du CE (entorhinal cortex) qui cible le DG et le CA3 via la voie perforante (performant path) et le CA1 ou le subiculum (SUB) via la voie temporoamonique (temporoamonic pathway). Le CA1 projettent vers la couche V du CE et le SUB. Une liste non-exhaustive de nombreuse afférences et efférences sont détaillés dans les box colorées. Abréviations : PFC : cortex préfrontal ; BLA : amydgale basolatéral ; NA : noyau accumbens ; RSC : cortex retrosplénial ; PRh : cortex perirhinal ; LS : septum latéral ; MS : septum medial ; SuM : noyaux supramammillaires ; MMB : corps mamillaires médians. Tiré de (Zitan 2020).

IV- Les cellules pyramidales de l'hippocampe

La région de CA1 est une des cibles principales des axones des cellules pyramidales de CA3 via les collatérales de Schaffer. Les corps cellulaires des neurones de CA1 sont organisés en couche dense, et leurs dendrites apicales sont orientés de façon parallèle dans les strata radiatum et lacunosum moleculare, proches de la fissure hippocampique. L'axone émerge de la partie apicale du corps cellulaire et s'oriente vers l'alveus. Les cellules pyramidales de CA1 projettent principalement au niveau du subiculum et du cortex entorhinal, mais également vers d'autres structures corticales comme le septum latéral, le noyau accumbens ou le bulbe olfactif. La région CA1, avec le subiculum, peut donc être considérée comme la voie de sortie principale de l'hippocampe vers le cortex entorhinal et indirectement vers la plupart des aires corticales associatives. Le corps cellulaire des cellules pyramidales de la région CA3 est plus volumineux que ceux des neurones de la région de CA1 (**Figure 4**). On distingue les régions CA3a, portion adjacente à CA2, de CA3b puis CA3c au niveau du hilus. Les dendrites apicales

des cellules pyramidales de CA3 sont orientées radialement, se ramifient dans les strata radiatum et lacunosum moleculare, jusqu'à la fissure hippocampique pour les cellules des régions CA3a et CA3b ou la limite du hilus pour celles de la région CA3c (Ramón y Cajal 1909). Leur arborisation axonale est extensive. On estime qu'une cellule pyramidale de CA3 pourrait contacter entre 30000 et 60 000 cellules cibles dans l'hippocampe, par des synapses qui sont rarement multiples (Li et al. 1994; Sik, Tamamaki, et Freund 1993).

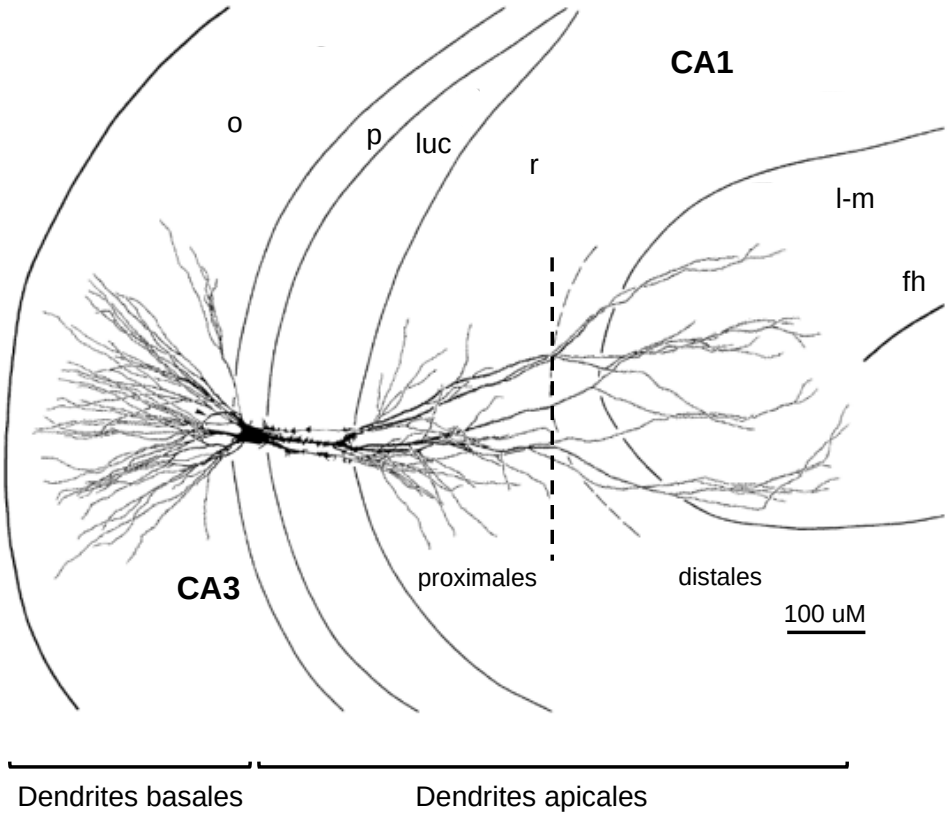


Figure 4 : Cellule pyramidale de CA3a. Pratiquement toutes les branches latérales des dendrites proximales sont situées dans les parties les plus profondes du stratum radiatum. Les ramifications de l'arborisation dendritique recommencent dans le lacunosum moleculare. De plus, on observe un grand nombre d'excroissances épineuses sur la partie proximale des dendrites apicales de ce neurone dans le stratum lucidum. L'axone de ce neurone est marqué avec une tête de flèche dans le stratum oriens. Abréviations :o : stratum oriens ; p : stratum pyramidale ; r : stratum radiatum ; l-m : lacunosum moleculare ; luc : stratum lucidum ; hf : fissure hippocampique. Adapté de (Ishizuka, Cowan, et Amaral 1995)

Une des particularités des cellules pyramidales de CA3, par rapport aux autres aires de l'hippocampe, est d'être en partie connectée les unes aux autres via des collatérales excitatrices récurrentes. Ainsi, chaque pyramide de CA3 est connectée directement avec environ 2% des autres pyramides de CA3 (Miles et Wong 1986). De plus, les deux régions de CA3 (de chaque hémisphère) sont également interconnectées via les fibres commissurales de la fimbria. Cette différence de connectivité entre CA3 et CA1 laisse penser que ces deux régions ont des caractéristiques fonctionnelles différentes. L'activation simultanée de neurones interconnectés est indispensable à la création

d'assemblées cellulaires qui constituent le substrat physiologique des représentations mentales et de la mémoire associative (Harris et al. 2003; Klausberger et Somogyi 2008; Lansner 2009). La structure anatomique de la région CA3, avec ses connexions collatérales récurrentes excitatrices, répond donc aux conditions de base de la théorie hebbienne que nous décrirons plus tard (cf. VII.1) (Marr 1971; Nakazawa et al. 2002). Cependant, la contrepartie de cette connectivité récurrente excitatrice est la tendance naturelle à l'hypersynchronie dont la conséquence clinique est la crise d'épilepsie (Cossart, Bernard, et Ben-Ari 2005; Marr 1971). Ce système nécessite donc une inhibition puissante qui est exercée par un deuxième type neuronal très hétérogène : les interneurones GABAergiques.

V- Les interneurones GABAergiques de l'hippocampe

Les interneurones forment une population qui est très hétérogène. Ils exercent une neurotransmission inhibitrice via la libération de GABA (acide gamma-amino butyrique). Ils peuvent contacter différentes parties de la cellule pyramidale. Par exemple, certains vont innerver préférentiellement le segment initial de l'axone, les dendrites et d'autres le soma des pyramides, exerçant des actions post-synaptiques différentes, qui répondent à des spécificités fonctionnelles distinctes. De façon générale, l'étude des différentes sous-populations d'interneurones a été principalement réalisée dans l'aire CA1 (Freund et Buzsáki 1996; Somogyi et Klausberger 2005). Cependant, l'aire CA3 est très différente fonctionnellement comme nous avons pu le voir. On peut donc s'attendre à ce que les propriétés fonctionnelles des interneurones y soient également différentes, méritant d'être étudiées plus précisément. La classification des interneurones se fait selon plusieurs critères : la localisation de leur corps cellulaire, leurs zones de projection axonale et dendritique, et les différents peptides qu'ils expriment (**Figure 5**).

1. Inhibition dendritique GABAergique

On distingue plusieurs types d'interneurones situés dans différentes couches de l'hippocampe ciblant les dendrites distales des cellules pyramidales. Parmi eux on retrouve les interneurones Oriens-Lacunosum Moleculare qui doivent leur nom à la localisation de leur corps cellulaire dans le stratum oriens où ils sont stimulés par les collatérales de Schaffer, ainsi qu'à leur axone qui contacte les dendrites des cellules pyramidales dans le stratum lacunosum moleculare afin d'exercer un rétrocontrôle inhibiteur (McBain, DiChiara, et Kauer 1994). Ils ont la particularité d'exprimer fortement la somatostatine (SST) et dans une moindre mesure la parvalbumine (PV) (Bezaire et Soltesz 2013; Freund et Buzsáki 1996; Pelkey et al. 2017). Il a été proposé que ces interneurones sont principalement actifs au niveau du creux de l'oscillation thêta, juste avant les cellules pyramidales et inactifs lors de « sharp-wave ripples » (Klausberger et al. 2003). Les interneurones bistratifés voient leur corps cellulaire situé dans le sp et leurs dendrites s'étendent du so au sr. C'est également dans le so et le sr que les

interneurones bistrafiés vont contacter les dendrites des cellules pyramidales. Ces derniers expriment majoritairement la PV mais également la SST ainsi que le neuropeptide Y (NPY) et déchargent de manière rapide et soutenue (« fast spiking »). Les interneurones en forme de lierre (Ivy cells), tout comme les interneurones bistratifiés, ciblent également principalement les dendrites des pyramides (dans le sr et so), et leur soma est aussi localisé dans le sp. Ils expriment l'oxyde nitrique synthase neuronale (nNos) et le NPY, et, contrairement aux interneurones bistratifiés, ils ont un profil de décharge dit en retard (« late spiking ») avec l'observation d'un délai entre le début de la dépolarisation et le premier potentiel d'action (Tricoire et al. 2010).

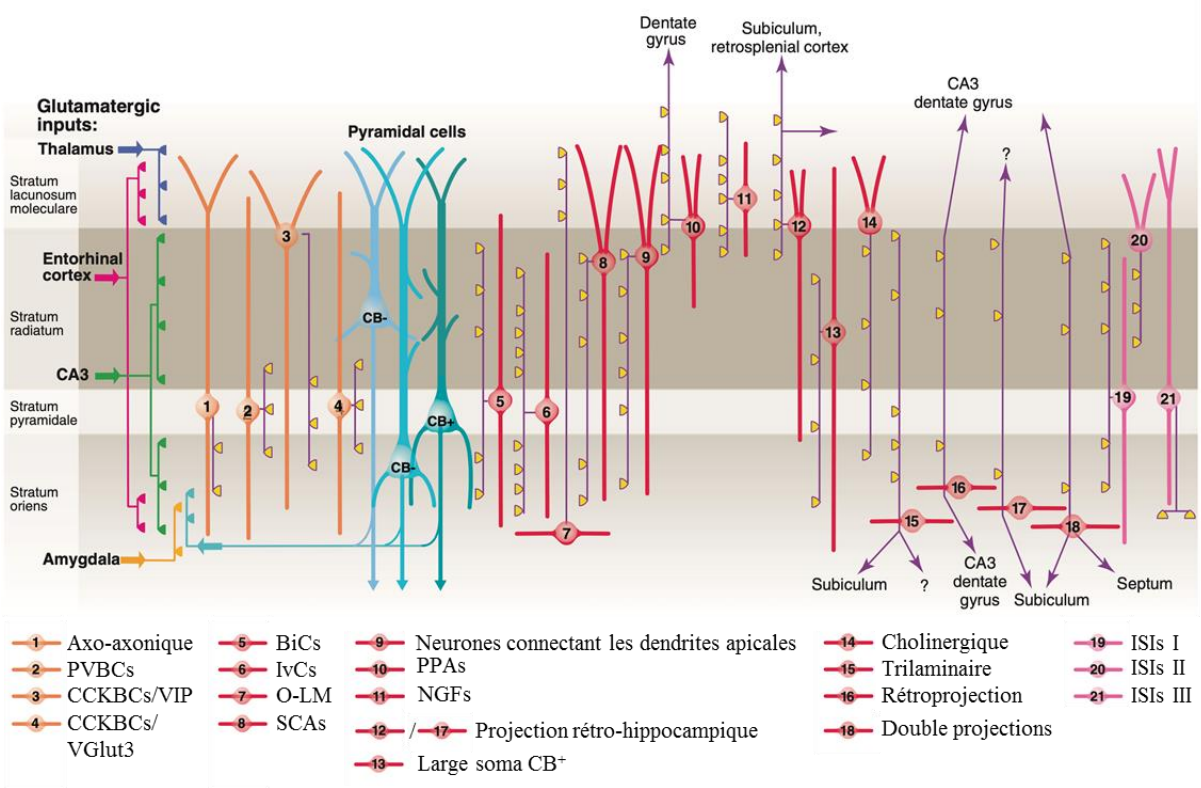


Figure 5 : Diversité des neurones GABAergiques du CA1 hippocampique. Les interneurones qui ciblent spécifiquement les cellules pyramidales (en bleu) sont en rouge et orange, et les interneurones qui ciblent d'autres interneurones sont en rose. Les axones sont en violet avec leurs terminaisons principales en jaune. Les afférences principales du cortex entorhinal, du thalamus, de l'amygdale et des cellules glutamatergiques de CA3 sont représentées à gauche. PVBCs : neurones en panier qui expriment la Parvalbumine (« PV basket cells ») ; CCKBCs : neurones en panier qui expriment la Cholécystokinine (« CCK basket cells ») ; VIP : polypeptide intestinal vasoactif ; VGlut : transporteur vésiculaire du glutamate ; BiCs : neurones bistratifiés (« Bistratified cells ») ; IvCs : neurones en forme de lierre (« Ivy cells ») ; O-LM : neurones Oriens-Lacunosum Moleculare ; SCAs : neurones associés aux collatérales de Schaffer (« Schaffer collateral- associated ») ; PPAs : neurones associés à la voie perforante (« Perforant path-associated ») ; NGFs : les neurones en forme de glie (« Neurogliaform », NGFs) ; ISIs I : Interneurones sélectifs des Interneurones (« Interneuron Selective Interneuron ») de type I ; ISIs II : Interneurones sélectifs des Interneurones de type II ; ISIs III : Interneurones sélectifs des Interneurones de type III. D'après (Klausberger et Somogyi 2008)

L'inhibition dendritique, du fait de la distance de leurs synapses avec le site d'initiation des potentiels d'action, influence peu le contrôle direct de la décharge des pyramides, par opposition à l'inhibition périsomatique rapide et phasique. Par contre, elle est localisée de façon stratégique proche des épines et des synapses glutamatergiques, dont elle contrôle les courants et les interactions locales. Les courants inhibiteurs induits par les interneurones à innervation dendritique, enregistrés au niveau du soma, sont de faibles amplitudes et de cinétiques lentes (> 20 ms) (Elfant et al. 2008; Maccaferri et al. 2000; Szabadics, Tamás, et Soltesz 2007), mais ils exercent un contrôle puissant du transfert entre soma et dendrites, où se trouvent les synapses excitatrices et la plasticité synaptique. La propagation rétrograde des potentiels d'action dans les dendrites, lorsqu'ils coïncident avec les inputs synaptiques, pourrait jouer un rôle crucial dans l'induction de la plasticité synaptique (Magee et Johnston 1997; Markram et al. 1997; Paulsen et Moser 1998). Les interneurones qui ciblent les dendrites des cellules principales peuvent fournir un contrôle spatial de cette rétropropagation et donc jouer un rôle important de contrôle de la plasticité synaptique (Buzsáki et al. 1996; Miles et al. 1996; Tsubokawa et Ross 1996).

2. Inhibition périsomatique GABAergique

Tout comme les interneurones axo-axoniques, les interneurones GABAergiques en panier ont leur soma dans ou à proximité de la couche pyramidale et projettent sur la région périsomatique des cellules pyramidales par un axone fortement ramifié. Elles contactent une grande proportion des cellules dans leur champ de projection, et leurs synapses sont localisées de façon stratégique pour bloquer la décharge de leurs cellules cibles. On distingue deux catégories, la première qui exprime la PV et la seconde qui exprime la Cholécystokinine (CCK) (Freund et Buzsáki 1996; Pelkey et al. 2017).

Le soma des interneurones PV en panier est principalement localisé à la frontière entre le stratum pyramidale et le stratum oriens et leurs dendrites s'étendent de l'alveus au stratum lacunosum moleculare (Freund et Buzsáki 1996; Pelkey et al. 2017) (**Figure 5, Figure 6**). Ces neurones ont un mode de décharge à haute fréquence. La densité de projection axonale des interneurones PV périsomatiques en panier leur permet d'exercer leur effet inhibiteur sur une large proportion de cellules pyramidales locales et la grande efficacité de leur synapse aux sites multiples de libération contrôle efficacement la fenêtre d'excitabilité des pyramides (Bartos, Vida, et Jonas 2007; Buzsáki 2002; Csicsvari et al. 2003 ; Pouille et Scanziani 2001). En moyenne, chaque interneurone PV en panier contrôle 1500-2000 cellules pyramidales, en établissant 5 à 7 contacts synaptiques par neurone (Pelkey et al. 2017). Par conséquent, il est généralement considéré que ce type d'interneurones via leurs propriétés anatomiques et fonctionnelles joue un rôle prépondérant dans le contrôle qualitatif de la décharge des cellules pyramidales (qui doit décharger et quand) et le maintien de l'homéostasie du circuit (maintien du réseau dans les limites physiologiques).

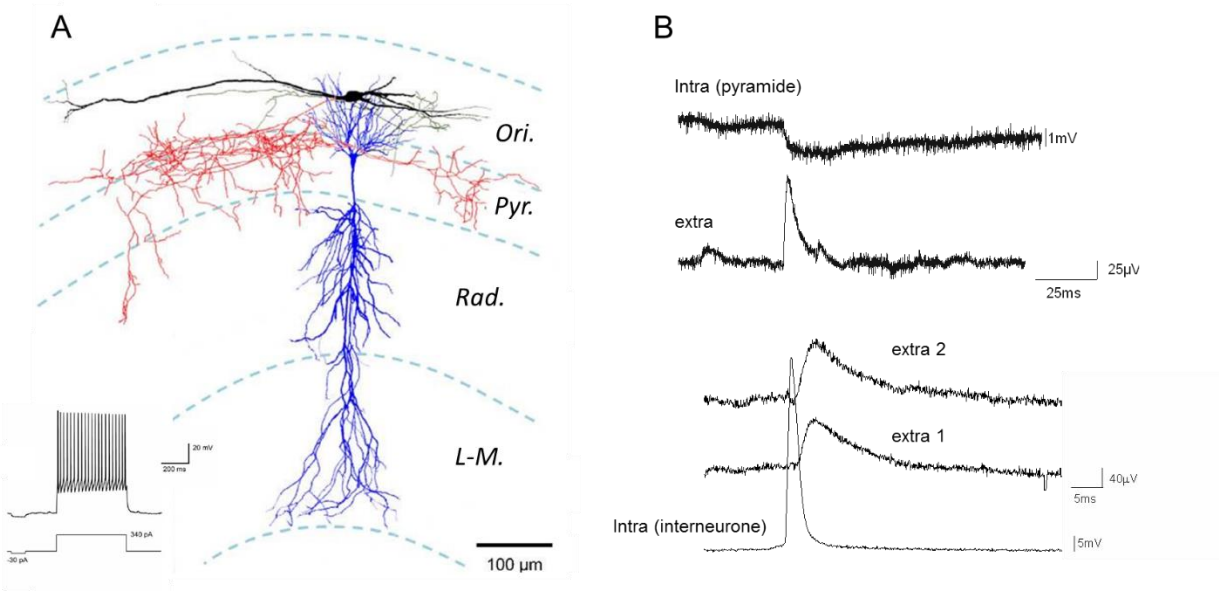


Figure 6 : Caractéristiques morpho-physiologiques des interneurones PV en panier (PVBCs). A. Reconstruction d'un neurone PVBC (soma et dendrites en noir, axone en rouge) et d'une cellule pyramidale (bleu) dans le CA1. L'axone des PVBCs se projette très densément dans le sp. Partie inférieur gauche : Motif de décharge des PVBCs qui se caractérise par une fréquence de décharge soutenue. **B.** On observe dans la partie supérieur un enregistrement simultané intracellulaire (cellule pyramidale) et extracellulaire (extra) d'un événement synaptique inhibiteur. Dans la partie inferieur, il est représenté un enregistrement extracellulaire simultané (e1 et e2, séparés d'environ 150 mm) des PPSIEs (potentiel post synaptique inhibiteur extracellulaire) évoqués par le déclenchement spontané d'un seul potentiel d'action provenant d'un interneurone enregistré en intracellulaire, dont le soma était situé à la frontière oriens/pyramidale. Adapté de : A : (Booker et Vida 2018; Trantham-Davidson, Kröner, et Seamans 2008) ; B : (Beyeler et al. 2013)

En électrophysiologie, les interneurones PV sont actifs lors de la phase descendante de l'oscillation thêta et fortement activés dans les creux des oscillations des ripples (Klausberger et al. 2003). Au niveau du développement, l'expression de la PV dans la cellule ne peut être détectée avant P11 dans le CA3, et P14 dans le CA1. Cette expression augmentera progressivement jusqu'à P30 (Donato et al. 2017).

Les neurones GABAergiques en panier CCK ont la particularité d'exprimer le récepteur au cannabinoïde de type 1 (CB1). Certains interneurones CCK coexpriment le VIP (Polypeptide Intestinal Vasoactif) et d'autres les transporteurs vésiculaires du glutamate VGluT3. Au niveau électrophysiologique, ils présentent une adaptation de leur fréquence de décharge (« adaptating cells ») : leur fréquence de décharge est initialement élevée mais décroit rapidement lors d'une dépolarisation soutenue (Parra, Gulyás, et Miles 1998). *In vivo*, il a été montré que ces interneurones sont actifs lors de la phase ascendante du cycle thêta (Klausberger et al. 2004).

Ces deux types d'interneurones baskets ont un rôle en miroir durant le cycle thêta et les ripples (Dudok et al. 2021). Chez l'animal mobile, il est montré avec l'aide d'imagerie biphotonique que les neurones PV sont actifs lors du déplacement de l'animal et durant les ripples et, inversement, l'activité

des neurones CCK est augmentée lorsque l'animal est immobile, excepté durant les ripples où elle est réduite.

3. Inhibition peri-axonique GABAergique

On distingue un seul type cellulaire dans cette famille de neurones GABAergiques : les neurones axo-axoniques ou plus communément neurone en chandelier pour la forme de son arbre axonal (E. H. Buhl et al. 1994; Somogyi et al. 1983). Leur soma se situe principalement dans le sp et leurs dendrites s'étendent de l'alveus au slm. Leur axone projette principalement dans le so mais aussi dans la couche profonde du sp et contacte principalement le segment initial de l'axone des neurones pyramidaux (Freund et Buzsáki 1996; Pelkey et al. 2017). Sur le plan moléculaire, les cellules axo-axoniques expriment la PV (Baude et al. 2007). Elles reçoivent des afférences GABAergiques (des neurones en panier) et glutamatergiques des collatérales de Schaffer principalement dans le CA1 (Halasy et al. 1996). Electrophysiologiquement, ils déchargent de manière soutenue (« fast spiking ») (Eberhard H. Buhl, Halasy, et Somogyi 1994; Pelkey et al. 2017; Povysheva et al. 2013) et contrôlent efficacement l'émission des potentiels d'action des neurones pyramidaux (Glickfeld et al. 2009).

PARTIE 2 : La neurotransmission dans l'hippocampe

I- La neurotransmission glutamatergique

Le glutamate est le neurotransmetteur excitateur majeur dans le système nerveux central. Ce neurotransmetteur active deux catégories de récepteurs glutamatergiques : les récepteurs glutamatergiques ionotropiques et les récepteurs glutamatergiques métabotropiques.

1. Les récepteurs ionotropiques glutamatergiques (iGluRs)

Ils sont majoritairement sous-divisés en trois types en fonction de l'agoniste qui a permis leur mise en évidence : on distingue les récepteurs activés par le N-methyl-D-aspartate (NMDA), les récepteurs activés par l'acide alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionique (AMPA) et les récepteurs Kaïnate (KA) activés par l'acide kaïnique. Chaque iGluRs est composé de 4 sous-unités protéiques organisées autour d'un pore central perméable aux cations sodium et potassium. De plus, l'ensemble des récepteurs NMDA sont perméables aux ions calcium (Ca^{2+}) tandis que pour les récepteurs AMPA et KA seulement une faible proportion est perméable aux ions Ca^{2+} (les récepteurs qui ne contiennent pas la sous-unité GRIA2). La diversité des combinaisons possibles entre les différentes sous-unités amène donc à un grand nombre d'isoformes avec des propriétés fonctionnelles variées (Ozawa, Kamiya, et Tsuzuki 1998).

a. Les récepteurs AMPA

Ce sont des hétéro ou homotétramères de sous-unités GluR1-4, sachant que chaque sous-unité existe sous deux formes différentes alternatives. De plus, l'ARN codant pour la sous-unité GluR2 est soumise à l'édition site spécifique sur deux sites : Q/R et R/G aux positions 586 et 743 respectivement (Burnashev et al. 1992; Lomeli et al. 1994). L'édition au site Q/R est d'une importance particulière car, en remplaçant un résidu glutamine (de charge neutre) par un résidu arginine (chargé positivement), elle rend le récepteur imperméable au calcium. Ces récepteurs sont responsables de la neurotransmission excitatrice rapide dans la majorité des synapses du système nerveux central.

b. Les récepteurs KA

Ils sont composés de cinq sous-unités allant de GluK1 à GluK5. D'un point de vue fonctionnel les récepteurs kaïnate peuvent être localiser en pré- ou post-synaptiques et leur activation par le glutamate entraine soit une réponse ionotropique, en générant des courants post-synaptiques lents et de faible

amplitude, soit une réponse métabotropique, en modulant l'excitabilité neuronale (Crépel et Mulle 2015).

c. Les récepteurs NMDA

Ce sont des tétramères formés de deux sous-unités NR1 et de deux sous-unités NR2 (NR2A, NR2B, NR2C ou NR2D) responsables des caractéristiques fonctionnelles du récepteur. Fonctionnellement, les récepteurs NMDA sont bloqués au potentiel de repos par les ions magnésium qui occupent l'entrée du pore. Ce blocage par le magnésium est levé par la dépolarisation de la membrane. Ces récepteurs sont activés lorsqu'ils sont fixés à la fois par le glutamate et son co-agoniste, la glycine. L'entrée de calcium dans le neurone post-synaptique via ce récepteur permet l'induction de plasticité synaptique.

2. Les récepteurs métabotropiques glutamatergiques (mGluRs)

Le glutamate active également des récepteurs métabotropiques qui, par définition, sont couplés à des protéines G. Il a été identifié huit membres différents. Ils fonctionnent sous forme de dimères et sont divisés en trois groupes suivant leur homologie de séquence (Pin et Duvoisin 1995) : le groupe 1 (mGluR1 et 5) sont couplés à la protéine Gαq et sont principalement post-synaptiques, le groupe 2 (mGluR2 et 3) et le groupe 3 (mGluR4,6,7,8) sont couplés à la protéine Gi/o et sont pré-synaptiques. Leurs rôles physiologiques sont variés. Ils inhibent la libération de glutamate au niveau pré-synaptique et participent à certaines formes de plasticité en post-synaptique.

3. Plasticité de la transmission glutamatergique

Comme détaillé dans le manuscrit de thèse de O.Dubanet, 2019, l'apprentissage et la mémoire sont sous-tendus par des modifications de longue durée de la transmission synaptique par la potentialisation à long terme (LTP), dépendante de l'activation des récepteurs NMDA (Malenka 1994). Celle-ci requiert la libération de glutamate (pré-synaptique) et la dépolarisation post-synaptique pour lever le blocage par les ions magnésium. Expérimentalement, l'induction de la LTP est typiquement réalisée par l'application d'un protocole de stimulation à haute fréquence (SHF), soit un ou plusieurs trains de stimulations dites tétaniques (classiquement 100 Hz, pendant 1 seconde). Dans le protocole de SHF, le recrutement des interneurones chute rapidement et l'activation des récepteurs AMPA crée une dépolarisation de la membrane post-synaptique qui lève le blocage du canal ionique des récepteurs NMDA par les ions magnésium. Une fois le canal ouvert, des ions calcium et sodium entrent dans la cellule alors que des ions potassium sortent. L'entrée d'ions calcium est un élément clé dans l'induction de la LTP. En effet, l'inhibition des variations de calcium intracellulaire, par l'utilisation de chélateurs des ions calcium, bloque l'induction de la LTP (Lynch et al. 1983). A l'inverse, l'augmentation de la concentration en calcium est capable d'induire une augmentation durable de la transmission synaptique

(Malenka et al. 1988). L'entrée importante de calcium, et ce de manière brève, va notamment induire l'activation de la protéine kinase 2 dépendante du complexe calcium/calmoduline (CamKII) (Lisman, Schulman, et Cline 2002) qui va subir une autophosphorylation et enclencher une cascade de signalisation nécessaire à l'induction de la LTP.

L'expression de la LTP se caractérise par une augmentation durable de la transmission synaptique. Cette potentialisation est causée principalement par des changements post-synaptiques visant les récepteurs AMPA. Premièrement, la conductance des récepteurs AMPA est augmentée (Barria et al. 1997). Deuxièmement, le nombre de récepteurs AMPA synaptiques augmente via une modification du trafic des récepteurs suite à leur insertion à la membrane via un processus d'exocytose. C'est cette augmentation de la diffusion latérale des récepteurs AMPA qui est considérée comme le mécanisme majeur de l'expression de la LTP. Le maintien de la LTP pendant plusieurs heures, voire plusieurs jours, nécessite la synthèse de nouvelles protéines, y compris localement au niveau des dendrites, qui vont subir des modifications morphologiques qui ont pour conséquences d'augmenter les courants synaptiques reçus (Yuste et Bonhoeffer 2001).

4. Propriétés fonctionnelles de la transmission excitatrice vers les cellules pyramidales et les interneurones

Les propriétés de la transmission excitatrice entre pyramides et interneurones sont très différentes. En effet, un PPSE (potentiel post-synaptique excitateur) évoqué dans les interneurones de CA1 est rapidement suivi d'une hyperpolarisation, limitant fortement la fenêtre d'opportunité pour une décharge post-synaptique. Le recrutement des interneurones est donc circonscrit aux quelques ms qui suivent l'input excitateur. A l'opposé, l'activation d'une cellule excitatrice tend à être suivie d'une dépolarisation plusieurs centaines de ms. Il en résulte une réponse évoquée (couplage EPSP-spike) beaucoup moins contrainte dans le temps (Fricker et Miles 2000).

Les interneurones expriment différents types de récepteurs ionotropiques du glutamate (Dingledine et al. 1999), qui peuvent être liés à des voies afférentes spécifiques (Tóth et McBain 1998). Les récepteurs KA et NMDA ont des cinétiques plus lentes que les récepteurs AMPA : plusieurs dizaines de millisecondes pour les récepteurs KA, plusieurs centaines de millisecondes pour les récepteurs NMDA. Les propriétés dynamiques de la transmission synaptique glutamatergique excitatrice diffèrent selon les interneurones. Sur le plan fonctionnel, les cellules PV (périsomatiques) et SST (dendritiques) jouent des rôles complémentaires dans la régulation de l'excitabilité du réseau cortical. Ils sont recrutés de manière séquentielle pour produire un changement d'inhibition récurrente le long de l'axe somato-dendritique (Pouille et Scanziani 2004). Les interneurones PV sont recrutés de façon transitoire au début

d'un train de décharge et induisent une inhibition rapide, forte et décroissante tandis que les interneurones SST sont recrutés plus tard et induisent une inhibition tardive mais croissante.

On distingue également l'inhibition récurrente (ou feed-back inhibition) et l'inhibition antérograde (ou feed-forward inhibition). L'inhibition récurrente est une inhibition di-synaptique des neurones pyramidaux qui, suite à leur activation, vont entraîner l'excitation des interneurones qui les contactent ayant comme conséquence une inhibition en retour des neurones pyramidaux. Dans la région CA1 de l'hippocampe, cette feed-back inhibition implique plusieurs sous-types d'interneurones comme les neurones en panier exprimant la PV ou la CCK et les interneurones chandeliers/axo-axoniques (Kullmann 2011) responsables de l'inhibition périsomatique des neurones pyramidaux (Glickfeld, Atallah, et Scanziani 2008). L'inhibition antérograde (ou feed-forward inhibition) est une inhibition di-synaptique des neurones pyramidaux qui accompagne leur excitation mono-synaptique. Par exemple, les collatérales de Schaffer provenant de la région CA3 peuvent contacter à la fois un neurone pyramidal de la région CA1, créant dans un premier temps un PPSE dans le neurone cible, mais aussi un interneurone lui-même connecté au neurone cible créant un potentiel post-synaptique inhibiteur (PPSI). Au début des années 2000, le groupe de Scanziani a émis l'hypothèse que cette inhibition feed-forward était responsable d'une amélioration de la précision temporelle de la décharge neuronale dans les neurones CA1 de l'hippocampe (Pouille et Scanziani 2001). Dans cette étude, les auteurs montrent, qu'après le blocage pharmacologique de la composante inhibitrice de la séquence PPSE-PPSI réalisé 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.

II- La neurotransmission GABAergique

Dans le cerveau, le principal neurotransmetteur responsable de l'inhibition de l'activité neuronale est le GABA. Il joue un rôle crucial dans la formation des circuits durant le développement. Il agit sur deux types de récepteurs : les récepteurs métabotropiques GABA-B qui modulent l'ouverture des canaux calciques et potassiques grâce à des seconds messagers impliquant une protéine G et les récepteurs ionotropiques GABA-A et GABA-C qui augmentent la perméabilité membranaire aux ions chlorures et bicarbonates.

1. Les récepteurs GABA-B métabotropiques

a. Structure

Comme décrit précédemment, ces récepteurs métabotropiques sont associés à une protéine G qui est une protéine liant le GTP (Gαi et Gαo) qui va mener, après activation de cette dernière, à une inhibition. Ces récepteurs influencent la transmission synaptique dans une échelle de temps plus lente. On distingue deux sous-unités différentes de ce récepteur métabotropique : la sous-unité GABA-B1 (existant sous 2 isoformes, GABA-B1a and GABA-B1b) et GABA-B2. Les récepteurs GABA-B sont des hétérodimères constitués de 2 sous-unités homologues, GABA-B1 et GABA-B2. Ainsi, cette conformation permet la formation d'un récepteur fonctionnel (Galvez et al. 2000). Fonctionnellement, c'est la partie extracellulaire de la sous-unité GABA-B1 qui va se lier au GABA alors que la partie intracellulaire de la sous unité GABA-B2 est nécessaire pour les interactions avec les protéines G. Les deux sous-unités sont constituées d'un domaine transmembranaire à 7 hélices (**Figure 7**).

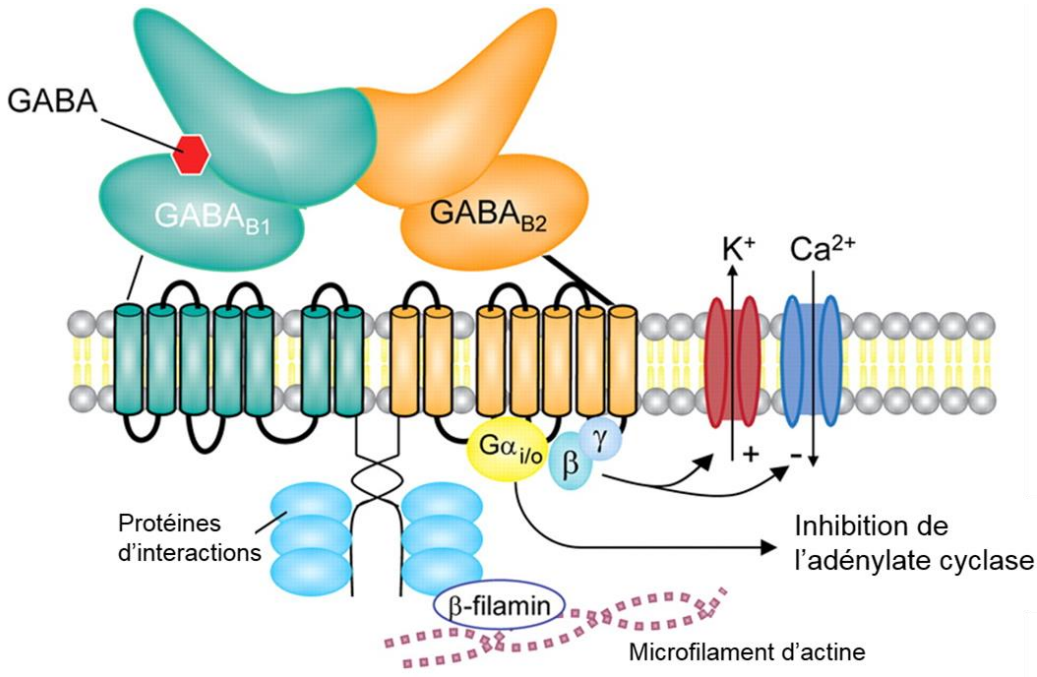


Figure 7 : Structure des sous unités du récepteurs GABA-B. Les sous-unités des récepteurs GABA-B1 et GABA-B2 interagissent avec de nombreuses protéines extracellulaires et intracellulaires qui participent au trafic, à l'ancrage et à la signalisation en aval du récepteur. Les récepteurs GABA-B exercent leur rôle via l'inhibition des canaux Ca^{2+} pré-synaptiques, via l'activation des canaux K^+ ou encore via l'inhibition de l'adénylate cyclase. Adapté de (Benarroch 2012)

b. Mécanisme d'action

Les récepteurs GABA-B sont exprimés en pré et post-synaptique, à la fois dans les terminaisons glutamatergiques et GABAergiques. En fonction de leur localisation, l'activation des récepteurs GABA-

B va induire une cascade de signalisation différente. Pharmacologiquement, ces derniers peuvent être bloqués par du CGP55845 qui est un antagoniste spécifique de ces récepteurs. Les récepteurs pré-synaptiques sont généralement couplés à des canaux calciques. Par l'intermédiaire de la protéine Gβγ, ils vont venir inhiber l'entrée de calcium dans les terminaisons pré-synaptiques excitatrices empêchant l'exocytose des neurotransmetteurs en bloquant la machinerie responsable de la fusion membranaire (Pinard, Seddik, et Bettler 2010; Poncer et al. 1997). L'inhibition de la machinerie de fusion vésiculaire peut également se faire par l'intermédiaire de l'activation de la protéine Gαi/o qui va venir inhiber l'adénlyate cyclase, menant à une diminution de l'activité et des niveaux intracellulaires d'AMP cyclique. Cette diminution d'AMPc va logiquement entrainer une réduction de la libération spontanée de neurotransmetteurs pré-synaptiques (Rost et al. 2011). Du coté post-synaptique, les récepteurs GABA-B exercent leur inhibition via des canaux potassiques couplés aux protéines G à rectification entrante (GIRK). Fonctionnellement, ce couplage semble induire une augmentation de la conductance aux ions potassiques, se traduisant par une sortie d'ion potassium (K^+) et donc une hyperpolarisation du neurone post-synaptique (Kulik et al. 2006). Les récepteurs GABA-B pré- et post-synaptiques sont connus pour réguler l'expression de la potentialisation à long terme (LTP) en réduisant directement ou indirectement l'excitabilité du neurone post-synaptique, ce qui influence l'activité des récepteurs NMDA et l'induction de la LTP (Davies et al. 1991). De plus, il a été proposé que les récepteurs GABA-B post-synaptiques peuvent moduler les processus de LTP en inhibant directement la perméabilité aux ions calcium des récepteurs NMDA par une voie de signalisation de la protéine kinase A qui est aussi influencée par une diminution de l'activité de l'adénylate cyclase (Chalifoux et Carter 2011). Il est de plus en plus reconnu que ces récepteurs ont un rôle important dans le contrôle de l'activité de réseau spontanée ce qui est fondamental pour les processus cognitifs. Durant une activité de réseau synchronisée, les populations de neurones oscillent entre états actifs et états de repos. Les récepteurs GABA-B sont activés pendant les états actifs, lorsque les interneurones déchargent de manière synchrone, et contribuent à y mettre fin. Le contrôle des oscillations du réseau implique les récepteurs GABA-B post-synaptiques (Menendez de la Prida et al. 2006). Dans des conditions physiologiques, les récepteurs GABA-B peuvent seulement être recrutés durant une activité synchrone des interneurones, comme cela se produit par exemple durant un rythme thêta. Il a été montré que l'activation de ces récepteurs a un rôle dans l'activité rythmique dans l'hippocampe en contrôlant la fréquence d'oscillations (Scanziani 2000). Durant le développement, ces récepteurs occupent une place centrale où ils exercent un contrôle au sein du réseau excitateur. Ils jouent également un rôle essentiel dans la transmission synaptique où l'assemblage en hétérodimère est nécessaire. Dans l'hippocampe, les composantes pré et post-synaptiques se développent à une vitesse différente. En effet, les courants post-synaptiques médiés par les récepteurs GABA-B apparaissent durant la deuxième semaine de vie post-natale (Luhmann et Prince 1991; Nurse et Lacaille 1999). De l'autre côté, l'activité fonctionnelle des récepteurs GABA-B pré-synaptique a été relevée bien plus tôt, durant la fin de première semaine post-natale pour le CA1 ou à la naissance pour le CA3 (Bassetti 2022; Gaiarsa et al. 1995).

2. Les récepteurs GABA-A ionotropiques, perméables aux ions chlorures

a. Structure :

Les récepteurs GABA-A sont des hétéropentamères composés à partir d'un répertoire de 19 sous-unités connues : α1−α6; β1−β3, γ1−γ3, ρ1−ρ3; ε, δ, θ et π (Miller et Aricescu 2014; Olsen et Sieghart 2009). La stœchiométrie la plus générale observée dans les récepteurs GABA-A est composée de 2 sous-unités α, 2 sous-unités β et une sous-unité γ pouvant être remplacée par ε, δ, θ et π. Toutes les sous-unités sont composées de 4 domaines transmembranaires (TM1-4), où TM2 forme le pore central du canal perméable aux ions chlorures et bicarbonates (HCO3-). De plus, les domaines C- terminal et N-terminal sont localisés dans le milieu extracellulaire. Ce dernier est le site de fixation du ligand où il existe 2 sites de liaison au GABA situés à la jonction entre la sous-unité α et β. L'activation du canal Cl- peut avoir lieu lorsqu'un de ces deux sites est occupé mais elle est favorisée d'environ 60 fois lorsque les deux sites sont occupés sachant que le deuxième a une affinité trois fois plus forte (Baumann, Baur, et Sigel 2003). Des drogues telles que les barbituriques ou benzodiazépines permettent de moduler l'ouverture du canal, la fixation se réalise à l'interface entre les sous-unités α et γ (**Figure 8**).

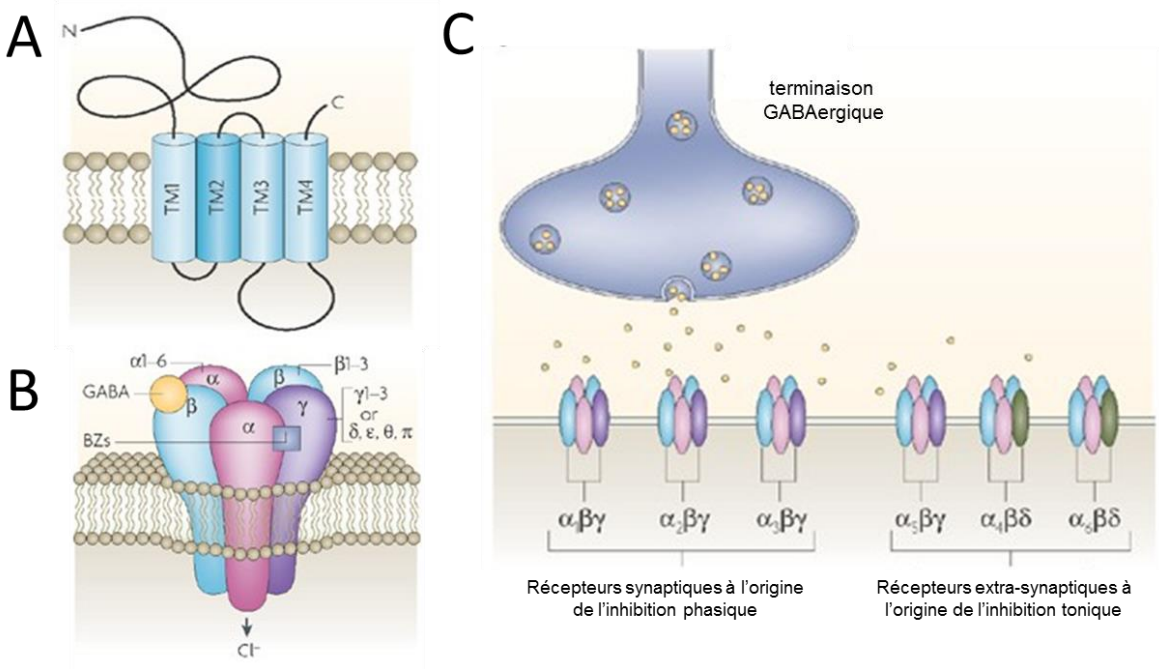


Figure 8 : Structure des récepteurs GABA-A et localisation neuronale. A. Les sous-unités GABA-AR sont constituées de quatre domaines transmembranaires hydrophobes (TM1-4), le TM2 étant censé recouvrir le pore du canal. **B.** Organisation d'un GABA-AR avec les différents sites de fixation du GABA et aux benzodiazépines (BZs). **C.** La localisation des GABA-AR dépend de la composition en sous-unités : ceux composés des sous-unités α(1-3)β sont au niveau post synaptique tandis que les récepteurs composés des sous-unités α(4/6)βδ ou α5βγ sont préférentiellement extra-synaptiques. Adapté de (Jacob, Moss, et Jurd 2008)

La combinaison du grand nombre de sous-unités permet une variété de sous-types importante. Cette hétérogénéité moléculaire est à l'origine d'une diversité fonctionnelle où chaque sous-types a une localisation spécifique, ainsi qu'un profil physiologique et pharmacologique distincts (D'Hulst, Atack, et Kooy 2009; Mody et Pearce 2004; Rudolph et Knoflach 2011). On retrouve tout de même des associations préférentielles entre les différentes sous-unités. Par exemple, les sous-unités α1−3 semblent s'associer aux sous-unités βn et γ2 et ont la particularité d'être principalement synaptiques, tandis que les sous-unités α4−6 se combinent préférentiellement avec les sous-unités δ et β2-3 et sont majoritairement localisées en péri- ou extra-synaptiques (Belelli et al. 2009; Farrant et Nusser 2005; Glykys et Mody 2007). La sous-unité δ a une expression plus confinée dans des parties du cerveau comme l'hippocampe, le cervelet et le thalamus. L'expression des différents sous-types de récepteurs est régulée au cours du développement et en fonction de la région du cerveau (Olsen et Sieghart 2009).

b. Mécanisme d'action :

Fonctionnellement, la transduction du signal débute par la liaison du GABA sur le récepteur qui va permettre un influx d'ions chlorures dans le milieu intracellulaire. Cette entrée de Cl- va produire une hyperpolarisation et donc l'inhibition du neurone cible. Pour ce faire, les récepteurs GABA-A possèdent 2 mécanismes d'action. On a premièrement les mouvements d'anions interne ou externe à la membrane plasmique (en fonction du gradient électrochimique). En effet, chez l'adulte, l'activation des récepteurs GABA-A est à l'origine d'une hyperpolarisation comme décrit juste avant. En revanche, durant la première semaine de développement post-natal, de nombreuses études ont montré l'effet inverse de ces récepteurs avec une dépolarisation du neurone post-synaptique, dû à un gradient chlorure différent. Le deuxième mécanisme par lequel les récepteurs GABA-A peuvent induire une inhibition est l'inhibition shunt (Brickley et al. 2001; O'Neill et Sylantyev 2018; Semyanov et al. 2004). L'ouverture de ces canaux est à l'origine d'une augmentation de la conductance et donc à la diminution de la résistance membranaire. De ce fait, tout courant synaptique évoqué à cet instant n'entraîne qu'un faible changement de potentiel membranaire (loi d'Ohm : V = RI). Ainsi, lorsque le GABA intervient, l'entrée des ions chlorure diminue la résistance d'entrée neuronale. Les courants locaux de la synapse excitatrice se dirigent préférentiellement vers cette zone de moindre résistance en se dissipant partiellement. On peut aussi utiliser l'image de "trous" dans lesquels les courants excitateurs s'engouffrent et sont ainsi court-circuités (**Figure 9**). En conclusion, au potentiel d'inversion des ions chlorures, la transmission GABAergique conserve un effet inhibiteur.

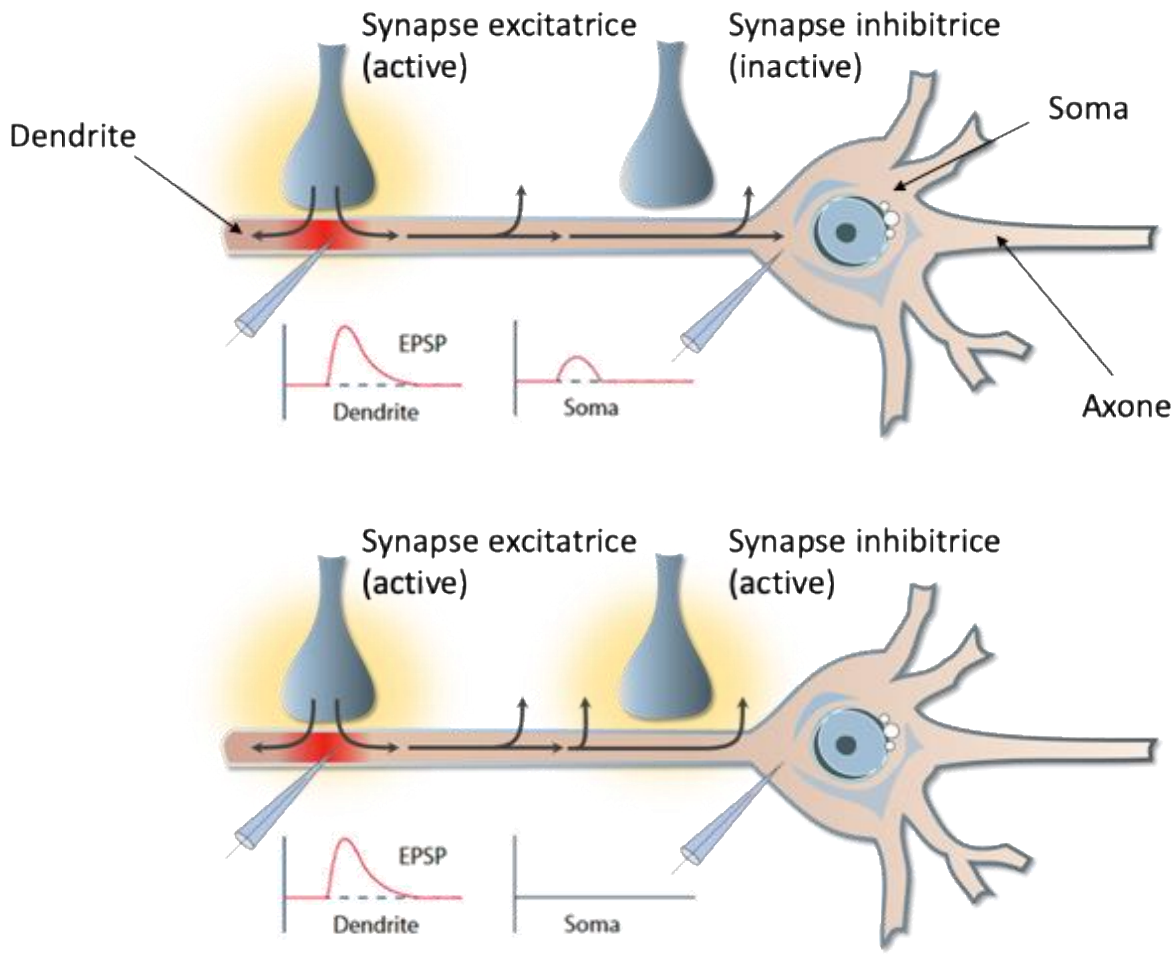


Figure 9 : Schéma représentant l'inhibition shunt. Un neurone recevant 2 contacts synaptiques (un excitateur et un inhibiteur) est représenté dans la partie supérieur. La stimulation de l'afférence excitatrice donne naissance à un courant qui va se propager jusqu'au soma, où il peut être enregistré comme PPSE (potentiel post synaptique excitateur). Dans la partie inferieur, lorsque les afférences excitatrice et inhibitrice sont stimulées en même temps, le courant dépolarisant de la synapse excitatrice « fuit » avant d'atteindre le soma. Adapté de (Lippincott Williams & Wilkins 2007)

c. Différents types d'inhibition des récepteurs GABA-A

Les récepteurs GABA-A sont connus pour être très dynamiques. En effet, ces récepteurs peuvent être externalisés ou bien internalisés très rapidement, ils peuvent aussi changer de position par diffusion latérale. Cette flexibilité permet une modulation du nombre de récepteurs mais aussi des changements de leurs propriétés en fonction des besoins du neurone (Jacob et al. 2008). Ainsi, selon la localisation de ces récepteurs, qu'ils soient synaptiques ou extra-synaptiques, ces derniers vont être responsables de différents types d'inhibitions : l'inhibition phasique ou l'inhibition tonique.

Les récepteurs GABA-A synaptiques et l'inhibition phasique **:** l'une des caractéristiques de ce mode d'activation phasique des récepteurs est la courte durée de l'activation GABA. La communication synaptique médiée par les récepteurs GABA-A est adaptée pour permettre la transmission rapide et

précise de l'activité pré-synaptique en un signal post-synaptique. À l'arrivée d'un potentiel d'action au niveau de la terminaison nerveuse, un influx de calcium local déclenche la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane pré-synaptique au niveau du site de libération. Chaque vésicule libère des molécules de GABA dans la fente synaptique générant un pic de concentration en GABA (Mody et al., 1994). En face du site de libération on retrouve les récepteurs GABA-A (de dix à quelques centaines) (Nusser, Cull-Candy, et Farrant 1997). Ces récepteurs subissent une augmentation rapide de la concentration de GABA et, pour quelques-uns d'entre eux, la liaison du GABA déclenche l'ouverture quasi-synchrone de leurs canaux ioniques se traduisant par des IPSC rapides dont la durée est de quelques millisecondes (Jones et Westbrook 1995). Il s'agit d'une inhibition phasique. L'inhibition phasique dépend de plusieurs paramètres. Elle peut être influencée par la nature de la fusion des vésicules, la taille ou encore le contenu des vésicules, la géométrie de la fente synaptique ainsi que la disposition spatiale des transporteurs GABA et des récepteurs post-synaptiques par rapport au site de libération du transmetteur (**Figure 10**).

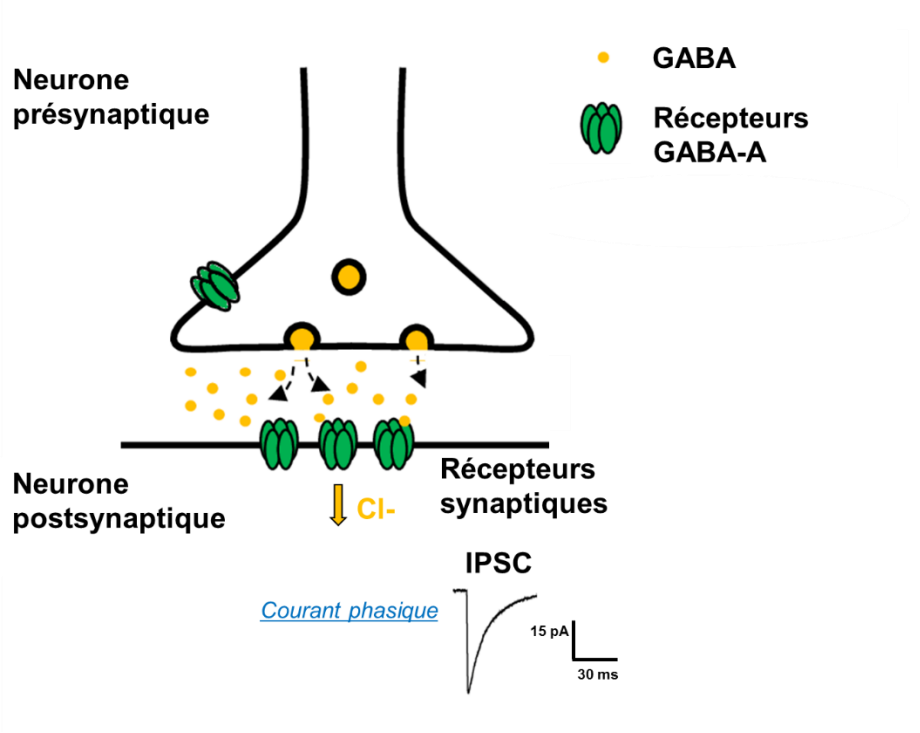


Figure 10 : Schéma de la transmission GABAergique phasique dans le SNC. Le GABA est libéré par les terminaisons nerveuses pré-synaptiques. L'activation des récepteurs GABA-A post-synaptiques résidant dans la synapse donne lieu à des courants post-synaptiques inhibiteurs (IPSC). Les IPSCs sont des évènements très rapides.

Physiologiquement, l'inhibition phasique est importante dans le transfert d'information dans le SNC adulte. Elle joue un rôle essentiel dans les activités cérébrales grâce à son activité qui est précise dans le temps. Un exemple notable est fourni par l'action des baskets cells corticales et/ou hippocampiques qui innervent les régions périsomatiques des cellules pyramidales. Ces interneurones jouent un rôle

essentiel dans la génération et le maintien des oscillations thêta et gamma en synchronisant l'activité de larges populations pyramidales (Cobb et al. 1995; Somogyi et Klausberger 2005). En effet, le temps d'action des récepteurs GABA-A doit être rapide (de l'ordre de 5ms) pour permettre une synchronisation de l'activité à fréquence gamma par exemple (Miles et al. 1996). En résumé, cette inhibition est primordiale pour une intégration temporelle précise de l'information où elle permet de contrôler précisément le patron de décharge des neurones (Farrant et Nusser 2005).

***Les récepteurs GABA-A extra-synaptiques et l'inhibition tonique* :** lorsque le GABA est relâché dans la fente synaptique, on peut observer qu'une quantité de GABA (de quelques dizaines de nM à quelques µM) s'éloignent de la fente synaptique et vont venir activer de manière paracrine les récepteurs péri- et extra-synaptiques. L'activation de ces récepteurs éloignés du site de libération va donner lieu à une inhibition tonique qui est persistante (~ 1s). La composition en sous-unités de ces récepteurs est donc différente des récepteurs à inhibition phasique puisqu'ils n'agissent pas de la même manière. D'une part les récepteurs toniques détectent le GABA ambiant qui est en très faible concentration grâce à une affinité bien plus élevée et d'autre part ils possèdent une désensibilisation qui est plus lente et moins marquée. En revanche, les récepteurs extra-synaptiques n'ont pas la même composition en sous-unités en fonction des régions cérébrales (**Figure 11**).

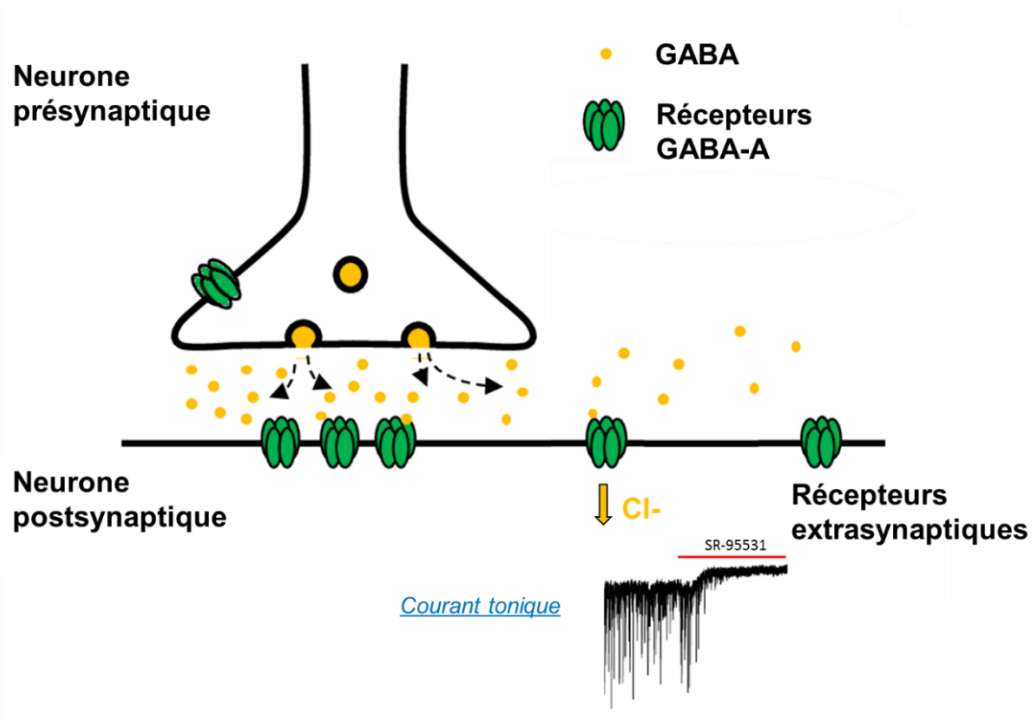


Figure 11 : Schéma de la transmission GABAergique tonique dans le SNC. Le GABA est libéré par les terminaisons nerveuses pré-synaptiques et s'échappe en faible quantité de la fente synaptique pour venir se lier sur les récepteurs extra-synaptiques. L'activation continue par le GABA ambiant des récepteurs GABA-A extra-synaptiques donne lieu à des courants toniques. L'ampleur d'un courant tonique médié par les récepteurs GABA-A peut être révélée en appliquant un antagoniste des récepteurs GABA-A (SR-95531).

Durant le développement, cette inhibition tonique est importante pour la mise en place des synapses (Owens, Liu, et Kriegstein 1999; Valeyev et al. 1993). Elle est également primordiale dans la régulation de l'excitabilité neuronale dans l'hippocampe (Semyanov et al. 2004). En effet, les récepteurs GABA-A extra-synaptiques génèrent un courant hyperpolarisant persistant, ce qui le rend moins susceptible de générer un potentiel d'action. Le courant tonique va donc diminuer la résistance membranaire, ce qui rend le neurone moins sensible et atténue l'effet de l'entrée excitatrice synaptique. Ainsi, l'augmentation du courant tonique GABAergique, via l'ouverture des canaux GABA-A, augmente l'effet de « shunt » qui entraine une diminution de la résistance d'entrée et réduit les variations de potentiel lors de l'activation de conductances synaptiques excitatrices. Lorsqu'une synapse inhibitrice est activée, la résistance d'entrée est réduite localement.

En résumé, l'inhibition phasique médiée par les récepteurs GABA-A se caractérise principalement par une ouverture rapide et synchronisée d'un nombre relativement faible de canaux regroupés à la jonction synaptique, alors que l'inhibition tonique résulte de l'activation aléatoire et dispersée dans le temps de récepteurs qui sont distribués (d'une manière potentiellement non uniforme) sur la surface neuronale. Cette distinction implique une différence profonde dans le contrôle de l'activité des réseaux neuronaux par des formes d'inhibition phasiques et toniques (Farrant et Nusser 2005).

Pharmacologiquement, tous les récepteurs GABA-A sont bloqués par de fortes concentrations de bicuculine et de gabazine. De plus, la transmission phasique peut être bloquée par de faibles concentrations de gabazine (Semyanov et al. 2004) étant donné que ces récepteurs synaptiques ont une plus faible affinité pour le GABA que les récepteurs extra-synaptiques (Stell et Mody 2002). La picrotoxine joue le rôle d'antagoniste spécifique non compétitif. Il est important de souligner que les différents antagonistes ont des mécanismes d'action différents qui présentent certains avantages et inconvénients. En ce qui concerne les agonistes, les benzodiazépines sont largement utilisés comme modulateurs allostériques positifs des récepteurs GABA-A pour leurs effets sédatifs et anxiolytiques. En effet, il a été montré dans le CA1 hippocampique que les potentiels post-synaptiques inhibiteurs (PPSIs) générés dans les cellules pyramidales de CA1 par les interneurones en panier et bistratifiés présentent des réponses pharmacologiques différentes aux benzodiazépines. Le diazépam a peu d'effet sur les PPSIs médiés par les cellules en panier mais module fortement la cinétique de ceux en provenance des interneurones bistratifiés et axo-axoniques (augmentation de 30 à 100% de l'halfwidth des PPSIs) (Pawelzik et al. 1999). En revanche, le zolpidem augmente l'amplitude des PPSIs en provenance des cellules en panier et axo-axoniques mais n'affecte pas l'amplitude des PPSIs en provenance des interneurones bistratifiés (Thomson et al. 2000). Ces résultats suggèrent que les PPSIs en provenance de différents types interneurones pourraient être médiés par différents récepteurs ou combinaisons de récepteurs GABA-A. L'utilisation de ces différents agents permet donc de différencier l'origine des PPSIs dans la cellule post-synaptique (interneurone bistratifié, axo-axonique ou en panier). En fonction

de la composition des sous-unités on utilisera donc le diazépam ou bien le zolpidem. Les stéroïdes sont également utilisés. En effet, l'inhibition tonique s'est révélée être hautement sensible aux stéroïdes neuroactifs endogènes (Wohlfarth, Bianchi, et Macdonald 2002) mais aussi aux anesthésiques intraveineux ou volatiles tels que l'isoflurane.

3. Les récepteurs GABA-C

Les récepteurs GABA-C sont majoritairement exprimés dans la rétine. Ils peuvent être considérés comme une sous-classe de récepteurs GABA-A. En effet, tout comme ces derniers ils sont constitués de cinq sous-unités rho « ρ1-3 » qui s'assemblent pour former un canal ionique laissant entrer les ions chlorures lorsqu'ils sont activés (Chebib 2004). En revanche, contrairement aux récepteurs GABA-A, ils ont des réponses lentes et soutenues (Feigenspan et Bormann 1994). Pharmacologiquement, les récepteurs GABA-C sont peu sensibles à la bicuculline et au baclofen et ne sont pas sensibles à beaucoup de modulateurs des récepteurs GABA-A (comme les benzodiazépines, les barbituriques et les stéroïdes) (Shimada, Cutting, et Uhl 1992). Les récepteurs GABA-C sont activés soit directement par le GABA ou le muscimol mais aussi par son précurseur le « Cis-aminocrotonic acid » (CACA), ce qui n'est pas le cas des deux autres familles de récepteurs GABAergiques (Feigenspan et Bormann 1994).

III- L'homéostasie des ions chlorures

Par définition, l'homéostasie correspond à la capacité d'un système à maintenir l'équilibre de son milieu intérieur, quelles que soient les contraintes externes. Comme vu précédemment, la régulation de Cl- joue un rôle clé dans la transmission GABAergique. Une variation de la concentration intracellulaire de Cl-, même très faible, peut être suffisante pour modifier significativement l'efficacité d'une réponse voire même de la polarité des réponses de cette transmission (inhibition ou excitation de la cellule post-synaptique). La régulation de l'homéostasie des ions chlorures est donc primordiale dans le maintien d'une inhibition fonctionnelle au sein du système nerveux. Il existe plusieurs modes de passage d'ions à travers la membrane. Tout d'abord, le transport du Cl- peut se faire de manière passive par l'intermédiaire des canaux, ce mode de diffusion ne consomme pas d'énergie et se fait en fonction du gradient de concentration. Le deuxième mode de passage est le transport actif, il s'établit par les pompes à Cl- qui sont énergie-dépendantes, consommant l'énergie (issue de l'hydrolyse de l'ATP) pour permettre le flux de Cl- contre son gradient de concentration. Enfin, il y a le transport actif secondaire où la différence de potentiel électrochimique est utilisée. Les deux principales formes de transporteurs sont le symport (ou cotransporteurs) qui transportent au moins deux ions dans la même direction et l'antiport (ou échangeurs) qui transportent des ions dans des directions opposées. Dans les neurones, le transport du Cl- se fait uniquement grâce à la diffusion passive et au transport actif secondaire par l'intermédiaire des transporteurs.

1. Les canaux Cl-

En fonction de leurs caractéristiques biophysiques et de leur mode d'activation, on distingue différents types de canaux Cl^- repartis-en 5 catégories (**Figure 12**).

Les canaux ioniques activés par un ligand (LGAC), sont des récepteurs au GABA-A et à la glycine. Ils ne s'ouvrent que lors de la fixation du ligand (GABA ou glycine) et sont perméables aux ions Cl^- et bicarbonate (HCO_{3-}). Leur expression très précoce leur permet d'intervenir dans différents processus développementaux comme la migration cellulaire et la maturation synaptique. Chez l'adulte, on retrouve ces récepteurs dans le SNC, la moelle et le tronc où ils sont responsables de la majorité de l'inhibition rapide (Avila, Nguyen, et Rigo 2013; Demarque et al. 2002).

Les canaux activés par le volume cellulaire (VRACs) s'ouvrent en réponse à des modifications du volume de la cellule. On les retrouve sur les astrocytes et les neurones du cortex en barils (Inoue et al. 2005). Ils sont également connus pour être activés à la membrane des neurones pyramidaux du CA1 de l'hippocampe en condition ischémique (Zhang et al. 2011).

Les canaux activés par le calcium (CaCC) s'ouvrent lors de la fixation du calcium et induisent des courants Cl^-/Ca^{2+} qui jouent un rôle au cours des stades précoces du développement et régulent la durée des potentiels d'action (Huang et al. 2012; Scott, McGuirk, et Dolphin 1988). On les regrouperait dans 3 familles : les ClCa (chloride channel activated), les bestrophines et les anoctamines. Il a été proposé que le gène TMEM16B, appartenant à la famille des anoctamines, serait exprimé dans les neurones pyramidaux de l'hippocampe, à proximité des canaux calciques et des récepteurs NMDA, et régulerait la durée des potentiels d'action et la réponse synaptique (Huang et al. 2012).

Les canaux activés par l'AMPc (CFTR : cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) : Ils sont largement étudiés, ils permettent la régulation de nombreuses fonctions biologiques comme la régulation du trafic vésiculaire ou le transport d'anions. On les retrouve dans les cellules épithéliales, les poumons, les glandes salivaires et assez largement dans le système nerveux central (Guo et al. 2009). Dans les neurones du SNC, la relevance physiologique reste à déterminer.

Les canaux de la super famille des canaux Cl- (CIC) sont initialement considérés comme des canaux Cl^-, toutefois certains d'entre eux fonctionnent comme des co-transporteurs (Jentsch, 2008). Ils sont sous-divisés en deux groupes : les ClCs 1-2, qui sont exprimés à la membrane plasmique et fonctionnent comme des canaux Cl- voltage-dépendants et les ClCs 3-7 qui fonctionnent comme des échangeurs Cl^-/H^+ et qui sont exprimés à la membrane des organelles intracellulaires. Ils régulent le pH et le volume cellulaire et permettent le contrôle de l'excitabilité cellulaire par la régulation de la concentration intracellulaire de Cl- (Zifarelli et Pusch 2007).

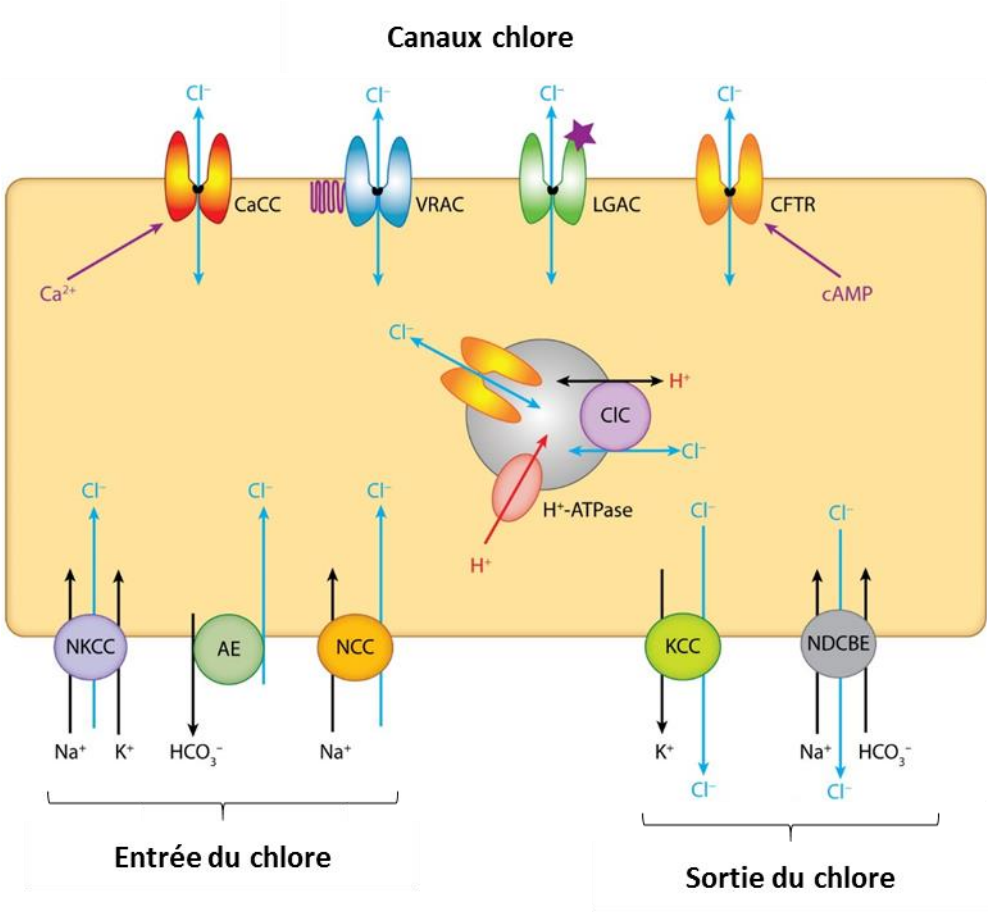


Figure 12 : La signalisation cellulaire du Cl-. Les cellules transportent activement le Cl- à travers la membrane plasmique par des transporteurs qui accumulent le Cl^- au niveau intracellulaire (importeurs : NKCCs : Na^+-K^+-Cl^-, AE : l'échangeur Cl^--HCO^{3-}, et NCC : le cotransporteur Na^+-Cl^-) ou extrudent le Cl- hors de la cellule (KCC : cotransporteur K^+-Cl^- et l'échangeur NDCBE : Cl^--HCO^{3-} dépendant du Na^+). Le Cl^- circule passivement à travers une variété de canaux Cl^- dans la membrane plasmique, tels que les canaux ioniques ligand dépendants (LGAC), les canaux activés par le Ca2+ (CaCC), les canaux activés par l'AMPc (CFTR), les canaux d'anions régulés par le volume cellulaire (VRAC) et les canaux CIC. On retrouve également certains de ces canaux exprimés à la membrane des organelles intracellulaires. Adapté de (Duran et al. 2010)

2. Les transporteurs du Cl-

Chez les mammifères, la famille des CCC (cation-chloride cotransporters) représente les principaux modulateurs de la régulation de l'homéostasie du Cl^-. Neuf membres sont connus, SLCA 1 à 9, qui sont codés par la famille des gènes *SLC12* chez l'Homme et *Slc12* chez la souris (Solute Carrier) (Gamba 2005). Chaque membre se différencie par son profil d'expression cellulaire, subcellulaire et temporelle. Trois de ces membres sont des co-transporteurs couplés au sodium (Na^+) et au potassium (K^+) et permettent l'afflux de Cl^- dans la cellule : le co-transporteur Na+/Cl^- (NCC) et les co-transporteurs Na^+/K^+/Cl^- (NKCC1 et NKCC2). On note en plus de ces derniers que les anions exchangers (AE), échangeurs Cl^--HCO^{3-} sodium indépendants, permettent également le transport du Cl^- vers le milieu interne de la cellule. Quatre autres membres sont eux des co-transporteurs Cl^- et K^+, les KCC 1 à 4. Ils permettent, en plus des échangeurs Cl^--HCO^{3-} sodium dépendants NDCBE et NDCE, l'extrusion du Cl- de la cellule

(Payne 1997). Enfin, les deux derniers membres, CCC8 et CCC9, qui sont des co-transporteurs orphelins. Ce sont des transporteurs secondairement actifs et électroneutres. En effet ils utilisent les gradients produits par la pompe Na^+/K^+ ATPase pour transporter le Cl- à travers la membrane plasmique. Enfin, le canal Cl^- ligand-dépendant GABA-A va dissiper le gradient en induisant une dépolarisation de la membrane ou hyperpolarisation. Les co-transporteurs NKCC1 et KCC2 font l'objet de nombreuses études, ils sont, en effet, les régulateurs principaux de l'homéostasie du Cl^- dans le système nerveux central. De plus, fait intéressant, les séquences de gènes codant pour ces derniers chez l'Homme et le modèle murin ont un taux d'homologie élevé qui est supérieur à 80%.

3. NKCC1

NKCC1 est l'un des membres de la famille CCC les plus étudiés, son rôle est essentiel dans la régulation de l'homéostasie des ions chlorures où il permet de charger la cellule en Cl^-. Il s'agit d'une protéine comportant 12 domaines transmembranaires, dont les extrémités N- et C-terminales sont localisées dans le compartiment intracellulaire et dont la forme fonctionnelle est un homodimère (Moore-Hoon & Turner, 2000) (**Figure 13**). NKCC1 est une protéine ubiquitaire qui est exprimée à la membrane cellulaire (Delpire et al. 1994; Payne et Forbush 1995) au niveau des dendrites, de l'axone et du segment initial de l'axone (Khirug et al. 2008; Russell 2000) et qui joue un rôle important dans la régulation du volume cellulaire et l'excitabilité neuronale.

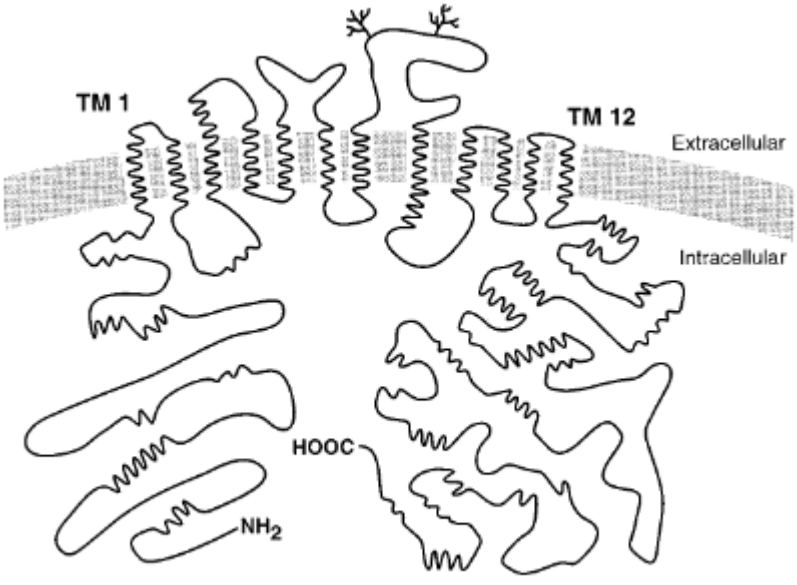


Figure 13 : Structure bidimensionnelle du cotransporteur NKCC1. La protéine NKCC1 est composée de 1 200 acides aminés avec 12 domaines transmembranaires (TM). Des études ont montré que les changements d'affinité cationique résultent de changements du TM2, alors que l'affinité du Cl- est affectée par des changements des TM4 à TM7. La liaison du bumétanide semble être associée aux TM2 à TM7 et TM11 à TM12 transmembranaires. Adapté de (Russell 2000)

En effet, dans la plupart des types de cellules, NKCC1 permet de réguler le volume cellulaire en réponse à un stress hypertonique (**Figure 15**). L'absorption de Cl^- par NKCC1 est couplée à un influx d'eau concomitant, cette association joue un rôle important comme mécanisme de défense majeur contre le rétrécissement cellulaire. De plus, des études ont également montré l'implication de NKCC1 dans les processus de prolifération et de régulation du cycle cellulaire (Capó-Aponte et al. 2007; Fu et al. 2015; Yuen et al. 2014).

Dans les neurones sensoriels de la périphérie et les neurones immatures de l'hippocampe (dès E18), l'activité de NKKC1 contribuerait à maintenir un niveau élevé de Cl^- intracellulaire de sorte que le GABA, neurotransmetteur inhibiteur, stimulerait l'efflux de Cl^- et, par conséquent, produirait des courants entrants dépolarisants à l'origine de l'excitation du neurone (Khirug et al. 2008; Wang et al. 2002). Étant donné son rôle principal dans l'homéostasie du Cl^- qui affecte la polarité des réponses au GABA, NKCC1 est une cible pour le développement de différents agents pharmacologiques tel que la bumétanide (Savardi et al. 2021). Le furosémide présente une affinité égale pour NKCC1 et KCC2 alors que la bumétanide a une affinité 500 fois plus élevée pour les NKCCs et est donc utilisée à faible dose pour inhiber NKCC1 et à plus forte concentration pour inhiber à la fois NKCC1 et KCC2.

4. KCC2

KCC2 a été principalement étudié pour son rôle qui est de maintenir une faible concentration intracellulaire de Cl- dans les neurones (Ben-Ari 2002; Blaesse et al. 2009). Il agit en extrudant les ions Cl^- du milieu intracellulaire.

Il existe deux isoformes : KCC2a et KCC2b qui se différencient au niveau de leurs régions N-terminales (Uvarov et al. 2007). Ces deux isoformes ne s'expriment pas de la même manière. Pendant le développement, l'expression de KCC2a reste relativement stable alors que l'expression de KCC2b augmente progressivement, ainsi l'expression progressive de KCC2 au cours du développement est principalement déterminée par l'isoforme KCC2b (Markkanen et al. 2014). De façon intéressante, la structure tridimensionnelle de KCC2 est inconnue. KCC2 comporterait 12 domaines transmembranaires, les extrémités N- et C-terminales sont localisées dans le compartiment intracellulaire et contiennent les sites de phosphorylation qui permettent la régulation de l'activité de KCC2 (Payne, Stevenson, et Donaldson 1996). De plus, l'extrémité C-terminale porte un domaine ISO qui est responsable de l'activité de transport de K+ et Cl- (Acton et al. 2012). Entre les domaines transmembranaires 5 et 6, on observe une large boucle en extracellulaire qui peut être glycosylée et permettre la régulation du transport ionique (Hartmann et al. 2010; Payne et al. 1996) (**Figure 14**). Des mutations ponctuelles dans ce domaine altèrent la fonction de transporteur Cl^- de KCC2 et entraîneraient des crises d'épilepsie chez l'enfant (Stödberg et al. 2015). Les transcrits de KCC2 sont exprimés fortement dans les neurones matures du SNC, incluant toutes les couches du cortex, les neurones du

tronc cérébral, les cellules de Purkinje du cervelet, les neurones pyramidaux de l'hippocampe, le thalamus, le bulbe rachidien et la moelle épinière (Payne et al. 1996; Uvarov et al. 2007). En effet, le profil d'expression de KCC2 évolue de manière ascendante au cours du développement et son expression est fortement corrélée à l'apparition des réponses GABAergiques inhibitrices (Ben-Ari 2002; Rivera et al. 1999). On le retrouve au niveau des dendrites et du soma (Gulyás et al. 2010). Au niveau hippocampique, KCC2 va s'accumuler de manière préférentielle aux synapses GABAergiques formées sur les dendrites distales plutôt que proximales (Báldi, Varga, et Tamás 2010).

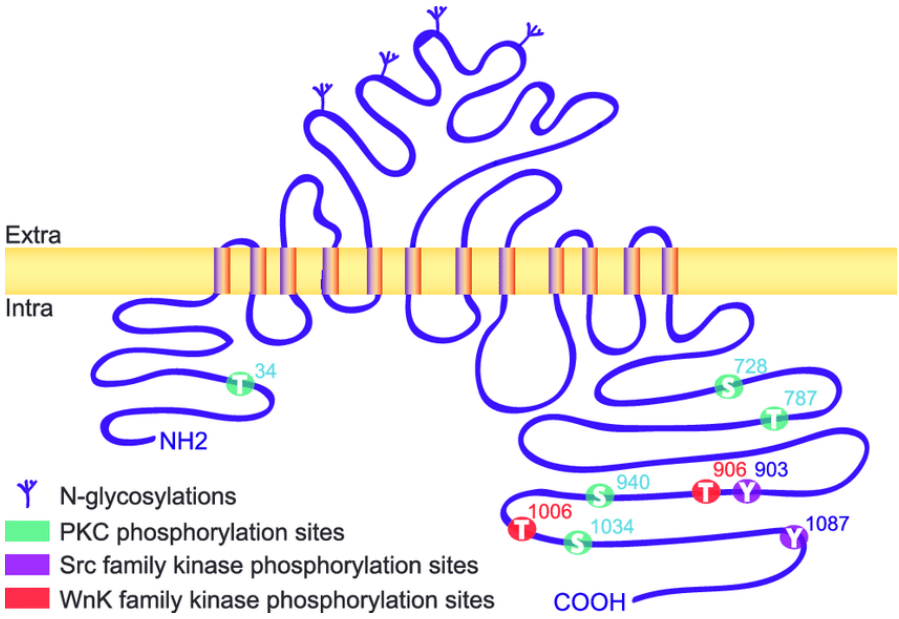


Figure 14 : Structure bidimensionnelle du cotransporteur KCC2. Le cotransporteur KCC2 chez le rat est une protéine de grande taille (~140 kDa) dont la topologie comprend 12 segments membranaires, un domaine extracellulaire qui est N-glycosylé entre les domaines transmembranaires 5 et 6, et est flanqué de deux domaines cytoplasmiques carboxy- et amino-terminaux de 104 et 481 acides aminés, respectivement. Comme indiqué, les régions intracellulaires sont les cibles de plusieurs kinases qui régulent la fonction du co-transporteur. Adapté de (Chamma et al. 2012)

Fonctionnellement, KCC2 est capable d'extraire le Cl- des neurones (Payne 1997). Son taux d'expression influence grandement le potentiel d'équilibre du Cl- et donc la polarité de la réponse GABAergique rapide. Au-delà de son rôle dans la plasticité des synapses inhibitrices, grâce à sa fonction de transporteur Cl-, KCC2 intervient dans le control du volume cellulaire ou contrairement à NKCC1 il permet une extrusion de l'eau (**Figure 15**). Il permet aussi de réguler le taux de K^+ extracellulaire. En effet, en conditions physiologiques, le taux de K^+ extracellulaire est faible, mais celui-ci peut augmenter lors d'une hyperactivité du réseau ou en conditions pathologiques. Le sens du transport des ions par KCC2 s'inverse et permet de faire rentrer du Cl^- et du K^+ dans la cellule pour rétablir la concentration extracellulaire de K^+ (Payne 1997). Enfin, il a été montré que KCC2 faciliterait la synaptogénèse et la densité des épines dendritiques (Fiumelli et al. 2013; Li et al. 2007) mais aussi qu'il interagirait avec la

signalisation glutamatergique. En effet, la plupart des synapses excitatrices sur les neurones corticaux sont formées sur des épines dendritiques qui apparaissent de manière concomitante avec la régulation à la hausse de KCC2 au cours du développement post-natal précoce (Rivera et al. 1999; Yuste et Bonhoeffer 2004). En l'absence d'expression de KCC2 chez les animaux knock-out, la morphogenèse des épines présentent un défaut de maturation qui est associé à une réduction du nombre de synapses excitatrices fonctionnelles (Li et al. 2007). Les souris mutantes pour KCC2 ($KCC2^{-/-}$) présentent un dysfonctionnement respiratoire et moteur ainsi que des activités de type épileptiques dès E18.5 et meurent à la naissance (Hübner et al. 2001). De plus, les animaux déficients pour l'isoforme b de KCC2 survivent environ deux semaines mais avec des valeurs de E_{GABA} très élevées. Les animaux hétérozygotes, c'est-à-dire qui n'expriment uniquement qu'un seul allèle du gène, ne produisent que 20% de la protéine et montrent une sensibilité accrue aux agents convulsivants (Woo et al. 2002) ainsi qu'un E_{GABA} élevé à l'âge adulte (Riekki et al. 2008). Récemment des agents ciblant spécifiquement KCC2 ont été mis au point comme le VU0463271 qui inhibe spécifiquement KCC2 (Delpire et al. 2012) ainsi que le CLP257 qui l'active (Doyon et al. 2013).

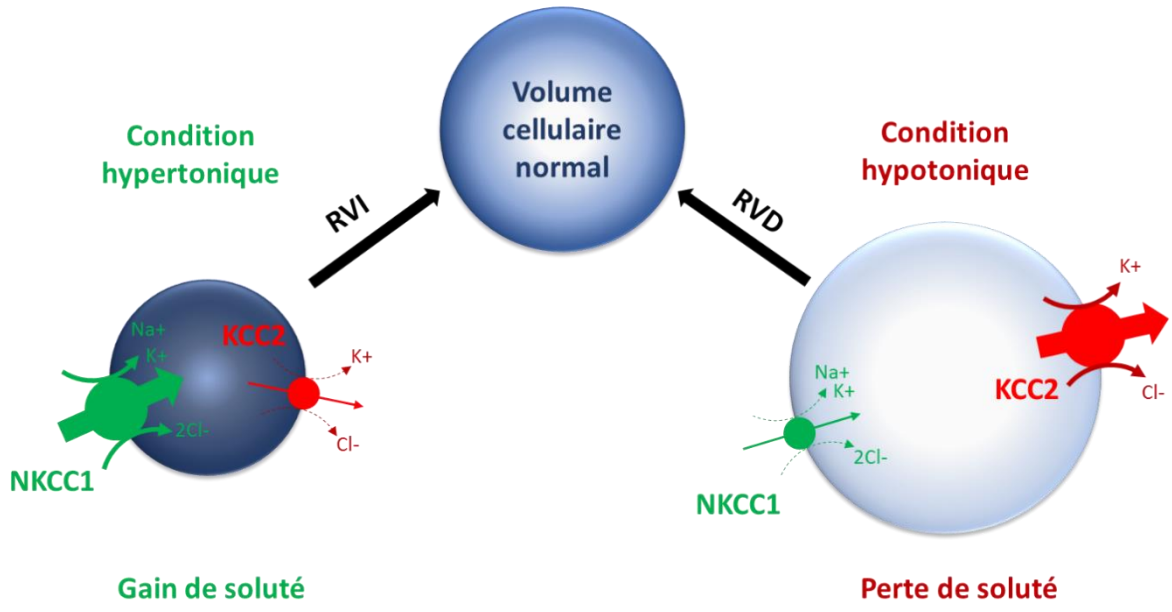


Figure 15 : Régulation du volume cellulaire par les cotransporteurs cation-chlorure. Les cotransporteurs cation-chlorure régulent le volume des cellules neuronales et gliales par le biais des mécanismes d'augmentation du volume réglementaire (RVI) et de diminution du volume réglementaire (RVD). Le rétrécissement cellulaire (déclenché par l'hypertonicité) est contrebalancé par le RVI, qui induit l'activation de NKCC1, entraînant l'afflux de chlorure (avec le sodium et le potassium) et d'eau, ce qui augmente le volume cellulaire. Les échangeurs Na-H et Cl-HCO3 jouent également un rôle de soutien dans l'IVR. Le gonflement cellulaire (déclenché par l'hypotonicité) est contré par la RVD, qui implique la perte cellulaire de chlorure (et de potassium) principalement via l'activation de cotransporteurs KCC (notamment KCC2 et KCC3), bien que des canaux potassium et chlorure activés par le gonflement soient également impliqués. Adapté de (Kahle et al. 2008)

Les propriétés fonctionnelles des cotransporteurs NKCC1 et KCC2 sont régulées réciproquement par des mécanismes de phosphorylation/déphosphorylation sur les parties N- et C- terminales. La famille des kinases WNK (with no lysine kinase) agit comme un osmosenseur qui peut conduire à une régulation réciproque de NKCC1 et KCC2 dans le système nerveux central (Kahle, Rinehart, et Lifton 2010). Lors d'un défi hyperosmotique ou dans des conditions de faible [Cl-]i, l'activation de Wnk1/3 entraîne la phosphorylation et l'activation de NKCC1 par l'intermédiaire de kinases et l'inhibition directe de KCC2 par la phosphorylation de Thr906 et Thr1006 (Gagnon, England, et Delpire 2006; Rinehart et al. 2009). Il en résulte un influx net d'eau qui compense le rétrécissement cellulaire dû au défi hyperosmotique, appelé augmentation du volume réglementaire (RVI). À l'inverse, dans des conditions hypo-osmotiques, l'activation de KCC2 et l'inhibition de NKCC1 entraînent une diminution du volume régulateur (RVD) qui agit pour compenser le gonflement (Chamma et al. 2012) (**Figure 15**).

Des études ont montré dans les neurones hippocampiques matures que l'activation de la PKC (protéine kinase C) améliorait la fonction de KCC2 par la phosphorylation directe de la sérine 940. Cela permet de stabiliser l'expression de KCC2 à la membrane des neurones en diminuant son taux d'internalisation (Lee et al. 2007). D'autres kinases telles que Src ou TrkB seraient impliquées dans la diminution de l'expression fonctionnelle de KCC2 par phosphorylation des tyrosines 903 et 1087 (Watanabe et al. 2009). De façon intéressante, des travaux de Glykys montrent que le gradient Cl- serait déterminé non pas par les deux co-transporteurs NKCC1 et KCC2 mais par la distribution des anions imperméants structuraux de part et d'autre de la membrane, c'est-à-dire les anions cytoplasmiques, y compris les groupes phosphates associés aux groupes désoxy- et ribo-nucléotides, et la majorité des protéines intracellulaires qui sont chargées négativement au pH physiologique. Les auteurs utilisent une méthode d'imagerie *in vitro* leur permettant d'évaluer la concentration de Cl- dans les cellules tout en respectant son gradient naturel (le Clomeleon dont la fluorescence est proportionnelle aux concentrations de Cl- intracellulaire). L'application d'inhibiteurs de NKCC1 et KCC2 (de la bumétanide et du VU0463271 respectivement) n'affecte pas le gradient Cl- *in vitro* tandis qu'un changement de concentration des anions intra et extracellulaires modifie ce dernier (Glykys et al. 2014). Ces travaux suggèrent que le gradient Cl- serait établi par ces anions imperméants et non pas par les co-transporteurs qui permettraient simplement d'atteindre les niveaux de Cl- fixés par ces anions.

KCC2 est hautement régulé et la seule présence de ce dernier dans un tissu à un âge donné ne garantit pas que celui- ci soit fonctionnel. En effet, son activité va être dépendante de son trafic intracellulaire puisque pour pouvoir être actif ce transporteur a besoin d'être adressé à la membrane des neurones. Il a pu être montré, dans des cultures de neurones hippocampiques, que le domaine N-terminal est essentiel pour l'adressage de KCC2 à la membrane, alors que le domaine C-terminal, lui, est important pour sa stabilité membranaire (Friedel et al., 2017). La stabilité de KCC2 à la membrane est régulée par l'endocytose, le regroupement, et la diffusion latérale. On peut ainsi trouver le KCC2 confiné dans des

regroupements mais aussi du KCC2 libre. Cet équilibre entre les formes libres et regroupées est régulé par la phosphorylation de différents acides aminés. Lorsqu'il est dans la membrane des neurones, KCC2 va aussi subir des déplacements à la surface de celle-ci, c'est ce que l'on appelle la diffusion latérale. Ainsi KCC2 est capable d'interagir avec la protéine 4.1N associée au cytosquelette. L'interruption de cette interaction augmente sa diffusion latérale, l'éloignant des synapses excitatrices. Cet effet semble être dépendant de l'activité des récepteurs NMDA ainsi que de la concentration intracellulaire en calcium (Chamma et al., 2013). Une fois actifs dans la membrane, les transporteurs KCC2 vont subir plusieurs cycles d'endocytose et d'exocytose avant d'être finalement dégradés par clivage grâce à la calpaïne. De manière intéressante, il a également été montré que la régulation de KCC2 est étroitement liée avec celle de la signalisation glutamatergique. En effet, la seule expression membranaire de ce dernier serait requise pour l'insertion membranaire des récepteurs AMPA et ainsi soutiendrait l'expression de la LTP dans les synapses glutamatergiques (Chevy et al. 2015).

5. La séquence développementale du GABA : effet dépolarisant et excitateur

Comme décrit précédemment, la transmission GABAergique dépend fortement de la concentration intracellulaire en Cl^- et donc de NKCC1 et KCC2. Nous avons également vu que l'expression de ces transporteurs évolue différemment au cours du développement. Dans les neurones immatures, NKCC1 est le transporteur Cl^- majoritaire (Yamada et al. 2004), cela se traduit par une concentration intracellulaire de Cl- élevée (Cherubini, Gaiarsa, et Ben-Ari 1991). La liaison du GABA sur son récepteur GABA-A va entrainer une sortie de Cl- de la cellule et une dépolarisation qui, lorsqu'elle atteint le seuil de genèse des PA, induit une excitation. Durant le développement des études ont montré qu'une augmentation progressive de l'expression du transporteur KCC2 est corrélée au contrôle de la polarité des réponses GABAergiques (Ben-Ari et al. 1989; Rivera et al. 1999). Ainsi, chez les neurones hippocampiques matures on observe que l'expression du transporteur KCC2 devient supérieure à NKCC1 (Rivera, Voipio, et Kaila 2005), cela se manifeste par une concentration intracellulaire de Cl- nettement plus faible qui, lors de l'activation des récepteurs par le GABA, va induire une sortie de Cl^- et entrainer hyperpolarisation de la cellule, on parle de « shift » de la réponse GABAergique qui passe d'excitatrice vers inhibitrice (**Figure 16**).

L'effet de cette action dépolarisante du GABA a donné lieu à de très nombreuses études qui ont permis de montrer en premier lieu qu'elle était présente dans les neurones immatures du CA3 de l'hippocampe durant la première semaine de développement (Ben-Ari 1997; Khazipov et al. 1997; Leinekugel et al. 1995, 1997, 1999). Les études suivantes ont étendu les recherches à d'autres espèces ainsi qu'à d'autres structures cérébrales telles que le néocortex, l'hypothalamus, la moelle épinière, l'aire tegmentale ventrale et le cervelet. Le switch de l'effet dépolarisant à hyperpolarisant du GABA a également été très étudié, il en ressort que ce dernier se ferait en fin de première semaine de vie

postnatale dans l'hippocampe chez le rat (Ben-Ari et al. 2007). Enfin, il a également été montré en 2006 que l'ocytocine, hormone hypothalamique, jouait un rôle important dans le switch de la polarité GABAergique durant la naissance. En effet, juste avant la naissance, on observe un pic d'ocytocine qui va induire une diminution de la concentration intracellulaire de Cl- due à une inhibition de l'activité de NKCC1. Ainsi, au moment de la naissance le GABA a une activité hyperpolarisante et inhibitrice sur les neurones foetaux, ce qui lui confère une propriété neuroprotectrice unique permettant aux neurones de s'adapter au stress provoqué par l'accouchement (Tyzio et al. 2006).

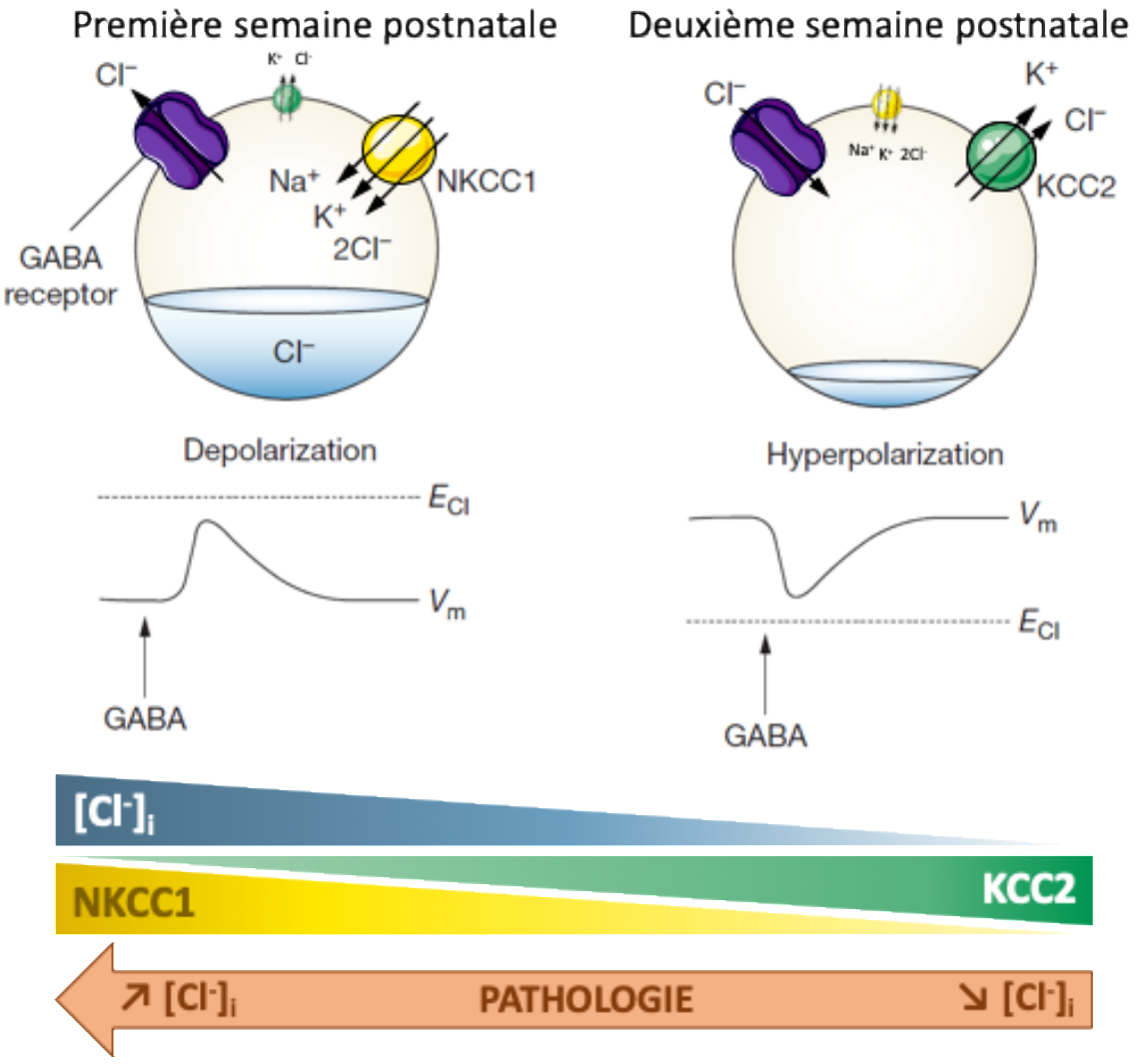


Figure 16 : Changement de polarité de la réponse GABAergique au cours du développement. Durant la première semaine de développement, en raison de l'activité élevée du cotransporteur NKCC1 et de l'activité minimale du cotransporteur expulsant le chlorure KCC2, la $[Cl-]_i$ est élevée, et E_{Cl} est positif par rapport au Vm du neurone. Lorsque la [Cl-]i est élevée, l'ouverture des canaux chlorure par l'activation des récepteurs GABA-A entraîne un efflux de chlorure, ce qui dépolarise le neurone. Au cours de la seconde semaine de vie post-natale, l'activité de NKCC1 diminue et celle de KCC2 augmente. KCC2 maintient une faible $[Cl-]_i$ et l'E_{Cl} est négatif par rapport au Vm ; l'activation du récepteur GABA-A entraîne un influx de chlorure, une hyperpolarisation et une inhibition du neurone. Des études *in vitro* ont montré que dans de nombreuses pathologies le GABA redeviendrait dépolarisant. Abréviations : E_{Cl} : potentiel d'équilibre du Cl- ; [Cl-]i : concentration intracellulaire de chlorure ; Vm : potentiel de membrane. Adapté de (Kahle et al. 2008)

Toutefois, si l'on regarde les dernières études, le schéma sur l'action GABAergique excitatrice durant le développement semble être contesté. Des publications récentes ont proposé que les réponses dépolarisantes de la transmission GABAergique dans les neurones immatures résultent plutôt d'un artefact expérimental. En électrophysiologie *in vitro* le glucose est utilisé comme substrat énergétique chez les neurones matures (dans le liquide de perfusion permettant le maintien en vie de la tranche) alors que le groupe de Y. Zilberter a proposé que le cerveau immature utilise plutôt des corps cétoniques tels que le pyruvate et le lactate. Comme décrit dans la thèse de O.Dubanet, 2019, dans les neurones immatures les corps cétoniques sont convertis en énergie par le cycle de Krebs dans les mitochondries. Or, le glucose seul, même en grande quantité, ne suffirait pas à maintenir la respiration mitochondriale à des niveaux suffisants pour le fonctionnement neuronal optimal. Cela entrainerait un dysfonctionnement dans la stimulation des pompes, des transporteurs ou des canaux Cl-, provoquant notamment une augmentation de la concentration intracellulaire de Cl- et donc une réponse GABAergique dépolarisante. Dans leur étude Rheims et Holmgren montrent que la réponse GABAergique dans les neurones immatures est dépolarisante lorsque les tranches sont perfusées avec du glucose mais hyperpolarisante lors celles-ci sont perfusées avec des corps cétoniques (Holmgren et al. 2010; Rheims et al. 2009). Cependant, ces résultats n'ont pas pu être reproduit par d'autres laboratoires que ce soit dans l'hippocampe ou d'autres structures cérébrale ainsi que d'autres modèles animaux (Bos et Vinay 2012; Kirmse et al. 2015).

Une difficulté majeure dans l'étude de l'inhibition GABAergique est d'éviter toute interférence avec le gradient de Cl- natif, principal déterminant de la fonction inhibitrice médiée par les récepteurs GABA-A. Les premières études qui tendent à montrer l'activité dépolarisante de la transmission GABAergique sur les neurones immatures ont utilisé des enregistrements électrophysiologiques intracellulaires. Cependant, la concentration de Cl- intracellulaire est très labile et même des enregistrements intracellulaires avec des électrodes « sharp », qui limitent le lavage cytoplasmique, ne préservent pas l'intégrité de la membrane, altérant potentiellement le potentiel de repos et le gradient de Cl- endogène. C'est pourquoi des méthodes de patch perforé à la gramicidine et d'enregistrement de canaux uniques ont été utilisées. La gramicidine est un antibiotique qui forme des pores au niveau de la membrane plasmique des cellules. Ces pores sont perméables uniquement aux cations, offrant un accès électrique à la cellule mais en maintenant ainsi la concentration intracellulaire du Cl- intact permettant de minimiser le problème de dialyse intracellulaire. Des enregistrements de ce type ont également montré un effet dépolarisant du GABA durant le développement *in vitro* (Akaike 1996; Ebihara et al. 1995). Cependant, ces enregistrements sont difficiles *in vivo*, et donnent des informations sur un seul neurone à la fois et peuvent potentiellement affecter le potentiel de repos neuronal (Chavas et Marty 2003), un paramètre majeur pour la fonction de transmission GABAergique. L'enregistrement d'un canal unique GABA-A est une méthode permettant d'enregistrer précisément la force électromotrice du GABA à travers le récepteur GABA-A (DF_{GABA}), mais cela nécessite l'enregistrement simultané du potentiel de

repos de la cellule pour en déduire le potentiel d'inversion du GABA (E_{GABA} = Vm +DF_{GABA}). Les enregistrements en cellule attachée ou de champs (activité multi-unitaire ou uni-cellulaire) permettent d'étudier la réponse d'un neurone ou d'une population de neurones suite à l'application de GABA ou d'un agoniste GABA-A. Néanmoins, ces méthodes ne respectent pas la dynamique naturelle du réseau puisqu'elles impliquent la stimulation artificielle des récepteurs GABA-A.

De plus, comme mentionné plus haut la plupart des études montrant la présence de GABA dépolarisant lors du développement du système nerveux se basent sur des études électrophysiologiques *in vitro*. Or, la procédure de coupe des tranches de cerveau serait source d'artefacts expérimentaux. Van der Pol a montré que des changements de certains facteurs (tels que l'osmolarité de la solution de perfusion ou le changement de température) ainsi que des dommages infligés aux neurones engendreraient un shift de la transmission GABAergique (inhibition vers excitation) (Pol, Obrietan, et Chen 1996). De plus, des travaux ont montré que l'activation des récepteurs GABA-A par l'isoguvacine induisait une excitation sur des tranches d'hippocampe et une inhibition sur l'hippocampe intact pour le même stade de développement (deuxième de vie post natal). Cela suggère que les neurones lésés par la coupe en surface de la tranche présenteraient une augmentation de leur concentration intracellulaire de Cl- (Dzhala et al. 2012; Glykys et Staley 2016). L'ensemble de ces résultats remet en cause le décours de la séquence développementale de la transmission GABAergique et met en avant les limites de l'électrophysiologie *in vitro* à étudier la transmission GABAergique que ce soit durant la séquence développementale ou dans d'autres conditions où une action dépolarisante/excitatrice est suspectée.

Quelle est la pertinence de ces études *in vitro* pour l'extrapolation *in vivo* ? Quelques études tendent à montrer une réponse dépolarisante à la transmission GABAergique *in vivo* durant la première semaine de vie post-natale chez le rongeur (Kirmse et al. 2015; Murata et Colonnese 2020; Tyzio et al. 2008). Même si dans leur étude Tyzio et al. s'affranchissent de l'artéfact des expérimentations *in vitro*, ils utilisent des méthodes d'enregistrements intracellulaires et patch perforé avec de la gramicidine qui, comme nous l'avons vu plus haut, ont quelques limitations. Dans leur étude, Kirmse et al utilisent de l'imagerie calcique pour étudier la réponse neuronale à une application de GABA ou de glycine. Cette technique d'imagerie est avantageuse en termes de résolution spatiale, mais n'offrent pas la résolution temporelle des enregistrements électrophysiologiques et devient invasive lorsqu'elle est appliquée à des structures profondes comme l'hippocampe. En outre, l'imagerie calcique ne détecte pas les dépolarisations qui n'atteignent pas le seuil d'activation des canaux calciques et ne fait pas de distinction entre les effets dépolarisants et excitateurs pouvant entraîner une augmentation du calcium, par exemple lors d'une dépolarisation non associée à un déclenchement au potentiel d'action, ou des augmentations de calcium induites par les récepteurs GABA-A et non pas par des modifications du potentiel membranaire (Chavas et al. 2004).

C’est pourquoi, l’existence de la réponse excitatrice à la transmission GABAergique *in vivo* n’est toujours pas tranchée. En effet, chez l’animal anesthésié une stimulation optogénétique des interneurones, l’ajout de GABA ou d’un agoniste GABAergique, n’induit pas de courants excitateurs post synaptiques lors du développement (Valeeva et al. 2016). De plus, il a été montré que la réponse GABAergique pouvait être duale, à la fois excitatrice et inhibitrice dans le cervelet (Chavas et Marty 2003) et semble dépendre de la densité des récepteurs localement ainsi que celle des co-transporteurs au Cl-. Il apparait donc que la concentration du Cl- dans les neurones est un paramètre qui n’est pas fixe ce qui complexifie son étude en particulier *in vivo*. Dans la section résultat nous verrons qu’il est possible d’étudier directement *in vivo* la polarité de la transmission GABAergique tout en respectant le gradient Cl- natif des neurones ainsi que la dynamique du réseau. En effet, il a été montré qu’il était possible d’enregistrer les potentiels de champs inhibiteurs en provenance des interneurones PV dans l’hippocampe et en particulier dans CA3 (Bazelot et al. 2010; Beyeler et al. 2013; Dine et al. 2014; Glickfeld et al. 2009). Ces potentiels de champs reflètent la polarité de la transmission GABAergique des pyramides de CA3 en réponse à l’inhibition périsomatique massive des interneurones PV. L’enregistrement et l’étude de ces évènements extracellulaires constituent une méthode de choix pour l’étude *in vivo* de la transmission GABAergique tout en respectant le gradient Cl- natif des cellules pyramidales.

PARTIE 3 : Fonctionnement du circuit hippocampique

I- Le circuit hippocampique chez l'adulte

1. Le modèle hebbien des assemblées neuronales pour le codage et la mémoire associative

Selon la théorie hebbienne, la représentation neuronale de l'information serait constituée d'assemblées cellulaires définies comme un ensemble de neurones déchargeant de façon simultanée et dont chaque élément représente un des attributs d'une même représentation mentale (Buzsáki 1989; Harris et al. 2003; Hebb 1950; Klausberger et Somogyi 2008; Lansner 2009; McNaughton et Morris 1987; Milner 1993). Ainsi, lors d'un stimulus, un groupe de neurone va être préférentiellement activé et la stimulation répétée de ces neurones entraine le renforcement de leurs synapses communes. Ce renforcement serait à l'origine d'une communication optimisée et puissante de manière à ce que même lors de la présentation d'un stimulus partiel, l'assemblée entière pourrait être réactivée (**Figure 17**).

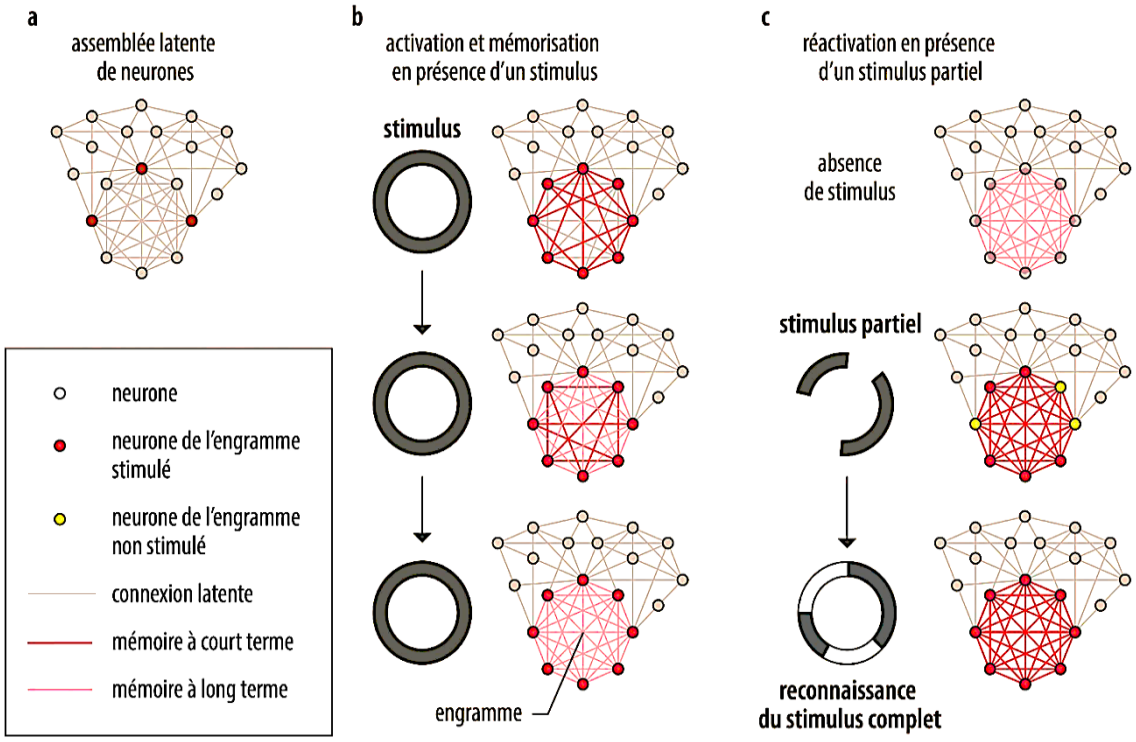


Figure 17 : Théorie des assemblées cellulaires de Hebb. A. Assemblée de neurones représentés schématiquement. **B.** En présence d'un stimulus, les neurones de différents circuits peuvent être excités. La présence répétée du stimulus entraine un renforcement des synapses. Le résultat de cette activation est l'entretien d'une activité réverbérante à l'intérieur d'une assemblée cellulaire dont les éléments représentent l'engramme du stimulus. **C.** Après apprentissage, la réactivation partielle de quelques neurones de l'assemblée cellulaire en réponse à un stimulus partiel conduit à la représentation complète du stimulus. Issue de (Dupont 2022)

La dynamique des réseaux et les connexions massives entre neurones (comme dans le CA3 de l'hippocampe par exemple) fait qu'un neurone peut appartenir à plusieurs assemblées et être impliqué dans la représentation de différents stimuli ayant des caractéristiques communes. Cette puissance combinatoire, éventuellement démultipliée par la succession temporelle des décharges, est quasiment infinie. Un aspect important de la théorie des assemblées neuronales est celle de l'association temporelle qui permet de répondre au problème de liage (« *binding problem* »). Selon la théorie, pour être considérés (et reconnus par le cerveau) comme appartenant à une même assemblée, les neurones doivent décharger simultanément (ou presque), ce qui suppose un mécanisme sophistiqué de coordination de l'activité à l'échelle des différentes régions cérébrales. A titre d'exemple, supposons que des neurones distincts appartenant chacun à des régions corticales spécialisées s'activent respectivement en réponse à une couleur (bleu ou jaune), et à une forme (ronde ou carrée). Ainsi, lorsqu'un rond bleu est perçu, une assemblée sera constituée de neurones codant pour la couleur bleue et de neurone codant pour la forme ronde, l'ensemble de ces neurones seront activés simultanément. Maintenant, si un rond bleu et un carré jaune sont perçus simultanément, les quatre assemblées s'activent. On parle alors de superposition « catastrophique » (von der Malsburg 1999) puisque l'activité simultanée de ces assemblées peut tout autant représenter un rond bleu et un carré jaune qu'un rond jaune et un carré bleu. Un moyen de résoudre ce problème est l'hypothèse de liage par synchronisation temporelle (Singer et Gray 1995). Selon cette hypothèse, les assemblées activées par les caractéristiques d'un même percept seraient liées par le timing d'activation des neurones (émission des spikes). Maintenant, si un rond bleu et un carré jaune sont perçus simultanément, les spikes émis par les neurones de l'assemblée codant pour la forme ronde seraient synchronisés avec ceux émis par l'assemblée codant pour la couleur bleue, à un instant distinct de ceux codant pour le jaune et la forme carrée. C'est donc la synchronisation neuronale qui permettrait de définir les neurones engagés dans l'activation d'une assemblée (**Figure 18**).

Cette activation ultérieure synchrone des neurones appartenant à une même assemblée à partir de quelques-uns d'entre eux nécessite un cadre anatomique constitué de neurones interconnectés, qui déchargent ensemble dans une fenêtre temporelle compatible avec les contraintes de la plasticité synaptique Hebbienne. Cependant, la contrepartie de cette interconnectivité excitatrice, d'excitation mutuelle, est que le système peut s'emballer et dériver vers une hypersynchronie dont la conséquence clinique est la crise d'épilepsie (Cossart et al. 2005; Marr 1971). Les circuits neuronaux ont donc besoin d'une inhibition puissante pour maintenir le système dans les limites physiologiques (aspect quantitatif) mais également pour exercer un contrôle précis de l'identité et du moment de décharge de chaque neurone, rôle que l'on pense dévolu aux interneurones. Cette coordination dans l'espace et le temps des interactions neuronales se fait au sein de rythmes cérébraux (Buzsáki 1989; Buzsáki et Chrobak 1995; Buzsáki et Freeman 2015). En effet, l'activité cérébrale est largement coordonnée par une variété d'oscillations couvrant diverses fréquences et régions anatomiques. De façon intéressante, différents rythmes cérébraux sont associés à des états comportementaux distincts, suggérant une configuration distincte des circuits neuronaux selon les besoins cognitifs spécifiques associés au comportement. La

plupart de ces rythmes cérébraux sont basés sur une coordination précise entre neurones excitateurs et inhibiteurs dont le rôle serait de fournir une référence temporelle pour le codage et de fixer des fenêtres temporelles d'excitabilité précises pour la communication entre les différentes régions du cerveau. La fonctionnalité des circuits neuronaux repose donc sur un équilibre subtil entre l'excitation et l'inhibition, qui peut être altéré dans certaines conditions pathologiques (Dubanet, 2019).

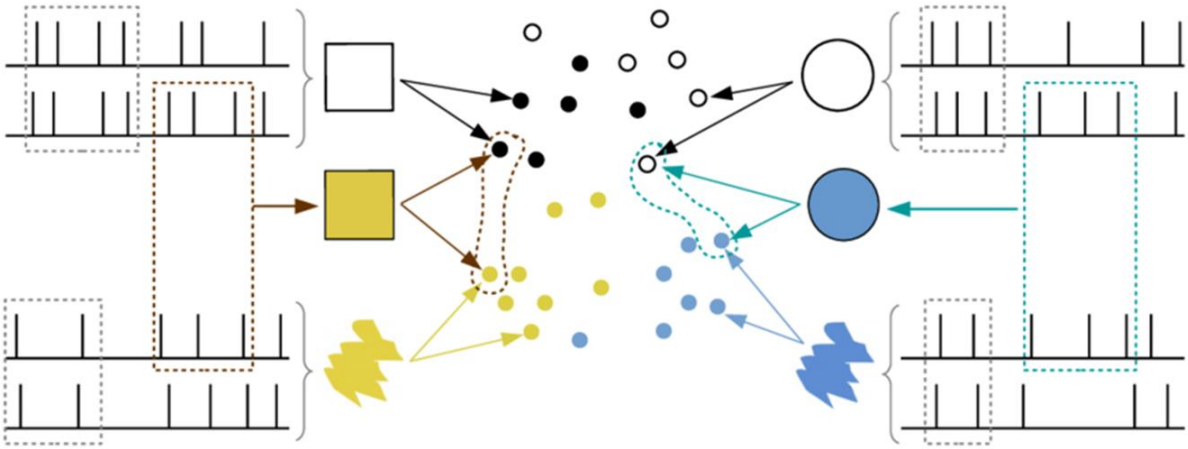


Figure 18 : Représentation schématique du « binding problem ». L'hypothèse de liage par synchronisation temporelle permet de regrouper les assemblées activées par des caractéristiques liées à un même percept : les temps d'émission des spikes (représentés par des barres verticales) sont alors synchronisés à l'échelle de quelques millisecondes (1 à 30). Ici, quatre assemblées sont respectivement activées par les formes carré ou rond et par les couleurs jaune ou bleu. Lors de la présentation simultanée d'un carré jaune et d'un rond bleu, les quatre assemblées sont donc activées. La cohérence de l'interprétation repose sur la synchronisation de neurones des assemblées carré et jaune en parallèle de la synchronisation de neurones des assemblées rond et bleu, constituant, par définition, de nouvelles assemblées. (Guinaudeau 2019)

2. Mémoire épisodique et codage spatial dans l'hippocampe

En 1935, un cas clinique devenu célèbre mit en lumière le rôle clé que joue la structure hippocampique dans la mémoire, et en fit la région de choix pour la recherche sur la théorie hebbienne des assemblées cellulaires. Dans le Connecticut, Henri Molaison souffre d'épilepsie chronique dont la source se trouve dans ses deux lobes temporaux. Le chirurgien W. B. Scoville procède alors à une ablation bilatérale d'une large partie des hippocampes afin de traiter son épilepsie. Si les symptômes de l'épilepsie ont presque totalement disparu, il souffre par contre d'une grave amnésie antérograde l'empêchant de former de nouveaux souvenirs jusqu'à sa mort en 2008 (Scoville et Milner 1957). Depuis, de nombreux mécanismes clés à l'origine de ces processus au sein de cette structure ont été découverts et l'hippocampe continue à être une des structures les plus étudiées en Neurosciences. En 1973 la découverte majeure du phénomène de plasticité synaptique cérébrale a été réalisée par les travaux de Bliss et Lømo sur l'hippocampe de lapin (1973). Ils ont montré qu'une stimulation à haute fréquence des synapses excitatrices entraînait une augmentation persistante (pouvant durer plusieurs

jours) de l'efficacité de la transmission synaptique (Bliss et Lømo 1973). Ce phénomène, appelé *Long-Term Potentiation* (LTP), a été plus tard mis en évidence dans d'autres régions du système nerveux central et périphérique des vertébrés. Mais surtout, l'observation d'un renforcement sélectif des synapses où l'activité pré et post-synaptique coïncide temporellement correspond au postulat principal de la théorie de Hebb sur la mémoire.

En parallèle à l'étude de la mémoire, de nombreux travaux ont montré que l'hippocampe jouait un rôle central dans la fabrication des cartes corticales et l'orientation spatiale chez les rongeurs. En effet, au sein de l'hippocampe certaines cellules s'activent lorsque l'animal occupe une position précise dans son environnement : ce sont les cellules de lieu ou place cells qui codent l'espace (O'Keefe et Conway 1978; O'Keefe et Dostrovsky 1971). La proportion des cellules dotées de sélectivité spatiale est de l'ordre de 30 à 50% dans l'hippocampe (Wilson et McNaughton 1993) soit environ 300 000 cellules actives pour coder un même environnement. La découverte de ces cellules de lieu a été suivie par l'identification des « border cells » et des « head direction cells» (Solstad et al. 2008). Ces cellules aux propriétés de codage spécialisées sont considérées comme la base neuronale de la navigation et de l'orientation dans l'espace (Moser, Rowland, et Moser 2015). Un enjeu principal est de comprendre les propriétés structurelles des circuits neuronaux responsables de ces propriétés fonctionnelles.

3. Encodage et consolidation : deux processus distincts du circuit hippocampique

Il a été proposé que la formation de la mémoire impliquerait deux états différents de l'hippocampe (Buzsáki 1989, 2015; Marr 1971). Durant la phase active ou d'encodage « online », les afférences vers la région CA3 seraient renforcées et plastiques alors que les synapses des collatérales récurrentes seraient déprimées, favorisant le contrôle par les afférences externes. L'information nouvellement acquise serait ainsi temporairement maintenue dans le circuit de CA3 (Buzsáki 1989). A l'opposé, durant les périodes de repos ou de consolidation « offline », les collatérales récurrentes seraient renforcées et les afférences externes déprimées. Les assemblées cellulaires de CA3 seraient ainsi libres d'être réactivées sous forme de bouffées d'activité synchrone (initiées par les collatérales récurrente du réseau), permettant le transfert coopératif de l'activité vers la région CA1 et leur transfert vers les régions cibles de l'hippocampe, ce qui permettrait de convertir la trace mnésique temporaire en une forme de mémoire à plus long terme (Buzsáki 1989, 2015). L'acétylcholine joue un rôle central dans la modulation de l'activité de l'hippocampe, et en particulier de la région CA3. La plupart des afférences cholinergique de l'hippocampe proviennent du complexe du septum médian et de la bande diagonal de Broca (Hasselmo 2006; Hasselmo et Giocomo 2006) qui exercent leur rôle modulateur via des récepteurs muscariniques (Dasari et Gulledge 2010; Yamasaki, Matsui, et Watanabe 2010) et nicotiniques (Alkondon et Albuquerque 2001). Des études chez l'humain ont montré qu'un blocage de ces récepteurs muscariniques par l'injection systémique de scopolamine interférait avec l'encodage de

nouvelles information verbales (Hasselmo et Wyble 1997). Durant la phase active d'encodage, l'acétylcholine dépolarise les cellules pyramidales et réduit l'accommodation de leur décharge leur permettant de répondre plus efficacement aux afférences externes (Hasselmo et McGaughy 2004). L'application d'agoniste cholinergique renforce la LTP dans de nombreuses afférences synaptiques majeures telles que la voie perforante, le gyrus denté ou les collatérales de Schaffer (Blitzer, Gil, et Landau 1990). De plus, la scopolamine (antagoniste cholinergique) bloque le renforcement de la LTP par l'acétylcholine et entraine des dysfonctions mnésiques et en particulier durant l'encodage (Burgard et Sarvey 1990; Huerta et Lisman 1993). Durant les phases d'immobilité ou de sommeil, en l'absence d'afférences sensorielles, l'activité désynchronisée de l'hippocampe permettrait la réactivation de la trace mnésique. Durant cette phase les faibles niveaux d'acétylcholine permettent d'augmenter la neurotransmission glutamatergique des collatérales de CA3 entrainant une boucle d'excitation récurrente puissance propice à cette réactivation (Hasselmo et Schnell 1994; Rovira, Cherubini, et Ben-Ari 1983). Ainsi, l'efficacité accrue des connexions excitatrices collatérales permet la réactivation des traces mnésiques (assemblées) formées pendant l'encodage. Leur réactivation favorise la LTP aux synapses suivantes de CA3 à CA1 et de CA1 au CE.

4. Dynamiques temporelles de l'activité dans l'encodage et la plasticité : les rythmes cérébraux

La synchronisation de populations neuronales et la précision spatio-temporelle des interactions entre les neurones GABAergiques et les cellules pyramidales est coordonnée au sein de rythmes cérébraux qui peuvent être observés par des enregistrements extracellulaires ou par un électroencéphalogramme (EEG). Par convention, les oscillations neuronales sont nommées en fonction de leur bande de fréquences : les oscillations Thêta (4 – 12 Hz), Gamma (30 – 90 Hz), delta (0.1 – 3 Hz) et « Ripples » (200 Hz), associées à des états distincts du réseau hippocampique (**Figure 19**). Les mécanismes de génération de ces activités rythmiques ne sont pas totalement élucidés, mais on sait qu'ils résident dans les interactions entre cellules pyramidales et divers types d'interneurones.

La coordination entre pyramides et divers types d'interneurones au sein des rythmes peut être décrite en termes de phase préférentielle de décharge. Au sein du rythme thêta, les interneurones montrent différentes préférences de phase en fonction de leur type, ce qui constitue d'ailleurs un critère d'identification de cette population neuronale très hétérogène (Csicsvari et al. 1999; Klausberger et al. 2003). Les interneurones en chandelier déchargent juste après le pic de thêta et les CCK déchargent un peu avant. Les OLM (neurones Oriens-Lacunosum Moleculare) et les interneurones bistratifiés sont actifs dans le creux de thêta (Pelkey et al. 2017). Enfin, les interneurones PV en panier déchargent jusqu'à une fréquence de 18 ±12 Hz pendant le rythme thêta, préférentiellement dans sa phase descendante (Forro et al. 2015; Lee et al. 2014).

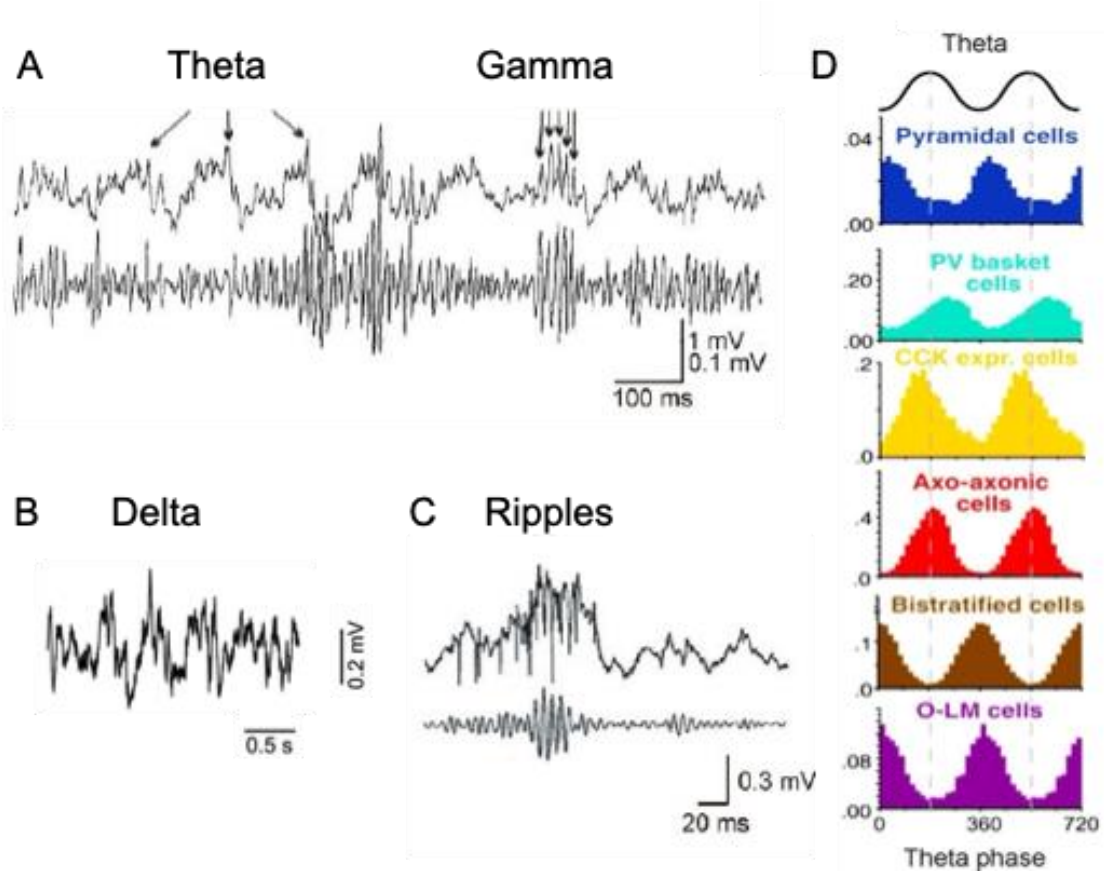


Figure 19 : Les oscillations du réseau hippocampique. A. Modulation du thêta et du gamma dans le gyrus denté (région hilaire) durant un comportement exploratoire. Enregistrement bande large pour la trace du haut et filtrée pour la trace du bas (40-150 Hz). **B.** Exemple de trace EEG enregistrée durant le sommeil lent montrant une oscillation de type delta. **C.** Ripples enregistrée dans le CA1 pendant le sommeil lent. Trace supérieure : enregistrement à bande large, traces inférieures filtrée (150-250 Hz). **D.** Phases préférentielles de décharge des cellules de l'hippocampe durant le cycle thêta dans le CA1. Adapté de A : (Bragin et al. 1995); B : (Park et Weber 2020); C : (Csicsvari et al. 1999); D : (Klausberger et Somogyi 2008).

Les différentes catégories d'interneurones se comportent différemment pendant le delta. Durant le delta on observe de larges déflections négatives transitoires des potentiels de champs du radiatum appelés Sharp Waves, provenant de l'excitation massive des dendrites apicales des cellules pyramidales de CA1 via les collatérales de Schaffer au niveau du stratum radiatum lors de l'activation synchrone des cellules pyramidales de CA3 (Csicsvari et al. 2000). Dans la couche pyramidale de CA1, l'excitation massive des pyramides entraine une interaction particulière avec les interneurones (Buzsáki et Chrobak 1995; English et al. 2014; Ylinen et al. 1995). En lien avec cette observation, il a été émis l'hypothèse que l'excitation massive en provenance de CA3 excite les interneurones de CA1 qui, par leurs propriétés intrinsèques et leur connectivité, permettent à la population neuronale de décharger à la fréquence des ripples en contrôlant temporellement l'activité des cellules pyramidales (Stark et al. 2014). Les interneurones les plus aptes à exercer ce contrôle durant les Sharp Waves Ripples (SWPR) sont les interneurones PV en panier qui augmentent leur fréquence de décharge de 90 à 200 Hz (proche de la

fréquence des ripples) (Forro et al. 2015; Lee et al. 2014) et qui exercent une inhibition puissante et rapide (Gan et al. 2017). Durant les SPWRs certains interneurones augmentent leur activité, d'autres ne modulent pas ou encore diminuent leur activité (**Figure 20**) (Freund et Buzsáki 1996). Les interneurones bistratifiés et en panier déchargent dans les phases ascendantes de l'oscillation, alors que les interneurones exprimant la CCK, les O-LM ainsi que les axo-axoniques sont silencieux durant les SPWRs (Csicsvari et al. 1999; Klausberger et al. 2004).

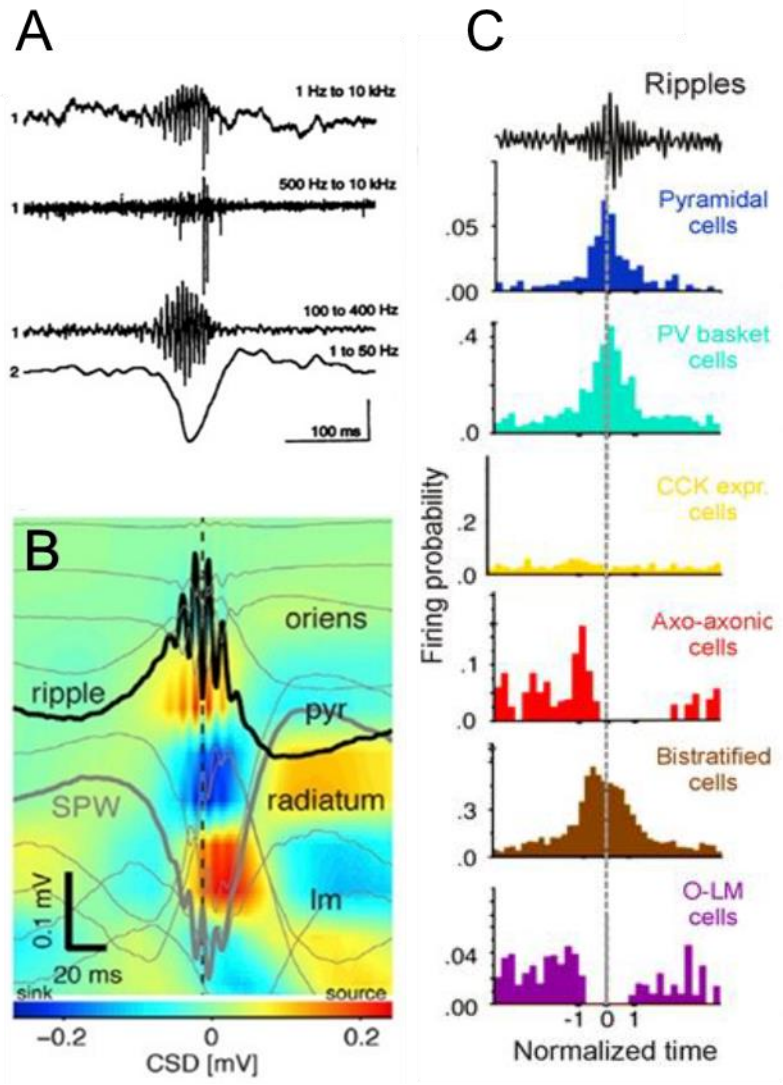


Figure 20 : Les Sharp Waves Ripples dans le réseau hippocampique. A. Oscillation rapide (ripple) dans la région CA1 de l'hippocampe dorsal. Enregistrements simultanés de la couche pyramidale de CA1 (électrode 1, enregistrement à bande large (1 Hz-10 kHz) (+ dérivés filtrées montrant l'activité unitaire (500 Hz-10 kHz) et la ripple (100-400 Hz)) et du stratum radiatum (électrode 2 ou l'on voit une forte dépolarisation = Sharp Wave). D'après Buzsáki et al., 1992. **B.** Profil moyen des SPWRs chez une souris se déplaçant librement (n = 961 événements). La carte de densité de source de courant (CSD) représente les sous structures en fonction de la puissance du courant. Trace noire : site d'amplitude maximale des ripples ; trace en gris foncé : site d'amplitude maximale des SPW. Adapté de (Stark et al. 2014). **C.** Phases préférentielles de décharge des cellules de l'hippocampe durant les ripples de CA1. Adapté de (Klausberger et Somogyi 2008)

Plusieurs fonctions ont été attribuées à ces différents rythmes. Une hypothèse intéressante décrit les rythmes comme une référence temporelle permettant de distinguer les assemblées neuronales activées au cours de l'encodage. Lorsque l'animal traverse le champ d'activité d'une cellule de lieu, la décharge de celle-ci se produit de plus en plus tôt à chaque cycle thêta, un phénomène appelé la précession de phase (O'Keefe et Recce 1993). Or, comme chaque cycle thêta est accompagné de la décharge de plusieurs cellules de lieu associées à des champs d'activité séquentiels en recouvrement partiel (trajectoire de l'animal), un cycle thêta individuel contiendrait ainsi une représentation compressée de l'espace (Skaggs et al. 1996) (**Figure 21**). Ainsi, la précession de phase permettrait de coder à la fois de la position présente de l'animal (cellule la plus active), la trajectoire passée (cellules déchargeant plus tôt dans le cycle) et la trajectoire future (cellules déchargeant plus tard dans le cycle (Dragoi et Buzsáki 2006; Huxter et al. 2008). Des expériences ont par ailleurs montré que l'inhibition périsomatique et l'inhibition dendritique ont des rôles distincts dans la décharge des cellules de lieu lors d'une tache d'exploration. En effet, la perturbation des neurones qui expriment la SST augmente le taux de décharge des cellules de lieux mais n'altère pas leur probabilité de décharge dans la phase du cycle thêta, alors que la perturbation des neurones qui expriment la PV n'affecte pas le taux de décharge des cellules de lieu mais provoque un décalage de leur activité dans la phase du Thêta (du pic vers le creux du Thêta) (Royer et al. 2012).

Les séquences de cellules de lieu peuvent être aussi compressées pendant les ripples à une échelle de temps qui favoriserait la plasticité synaptique et la coopération pour activer les cibles post-synaptiques au niveau du néocortex et y transférer l'information mnésique pour un stockage à long terme (Buzsáki 2015). Elles apparaissent à P12 et se produisent pendant les périodes d'immobilité de l'animal (lorsque les stimuli environnementaux exercent une action mimine sur l'hippocampe). Le fait de rejouer les séquences de cellules de lieu pendant les SWRs (« replay ») servirait à consolider la représentation d'une carte cognitive de l'environnement (Buzsáki 1989, 2015) (**Figure 21**). La perturbation des SWRs par une approche d'optogénétique, provoque des erreurs de codage des cellules de lieu dans un environnement donné mettant en évidence que la réactivation des séquences de cellules de lieu pendant les SWRs sont nécessaires pour stabiliser et définir les champs d'activité des cellules de lieu, et donc maintenir une carte cognitive stable (Roux et al. 2017). Leur interruption suite à l'exploration d'un environnement en retarde également l'apprentissage (Girardeau et al. 2009).

Les oscillations gamma ont également un rôle important dans le codage et la mémoire. Ces oscillations permettraient notamment de séparer les décharges des différentes assemblées cellulaires qui sont actives au sein du même cycle de thêta (Jensen et Colgin 2007; Senior et al. 2008). Généralement les oscillations thêta et gamma ont lieu de manière coordonnée et l'amplitude de l'oscillation gamma est modulée par la phase de l'oscillation thêta (Bragin et al. 1995; Chrobak et Buzsáki 1998). Chaque cycle gamma correspondrait potentiellement à l'arrivée synchrone des entrées en provenance d'une

assemblée neuronale particulière. La genèse de ce rythme dans l'hippocampe dépendrait étroitement de l'inhibition feedback exercée par les interneurones PV (Buzsáki et Wang 2012; Tukker et al. 2007). En effet, l'activation artificielle des interneurones PV par manipulation optogénétique permet de générer expérimentalement ce type oscillations (Cardin et al. 2009). De plus, l'application d'agoniste des récepteurs opioïdes (DAMGO) qui inhibe l'activité des interneurones en panier mais pas des axo-axoniques élimine les oscillations gamma *in vitro* et *in vivo* (Gulyás et al. 2010).

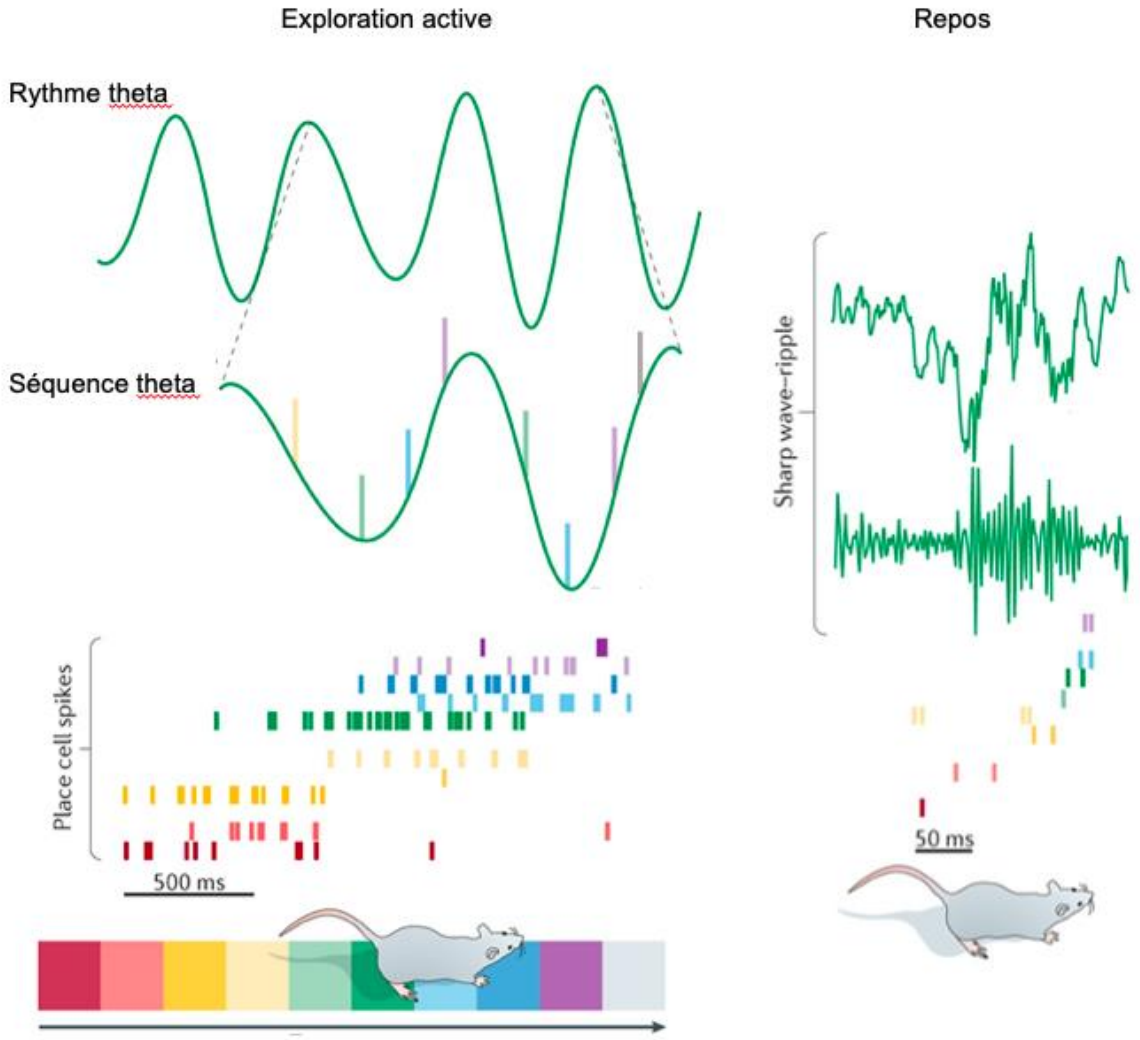


Figure 21 : La précession de phase. A gauche : Schéma montrant des spikes de cellules de lieu successivement activées lorsque l'animal avance dans l'espace. Chaque barre de couleur différente représente des spikes provenant d'une cellule de lieu différente. Au-dessus, les emplacements successifs de la trajectoire de l'animal sont représentés par une série de spike des cellules de lieu au sein de cycles thêta individuels, appelés séquence thêta. Pour chaque cellule de lieu dans une séquence thêta, les spikes se produisent à des phases thêta de plus en plus précoces au cours des cycles thêta successifs, un phénomène appelé précession de phase. Il en résulte que les spikes à des phases thêta précoces et tardives représentent les emplacements passés et à venir, sachant que la cellule de lieu correspondant à la position de l'animal décharge dans le creux du cycle thêta. A droite, la séquence de cellules de lieu est rejouée durant le repos dans les ripples. La première trace correspond à un signal brut, la seconde trace sous le signal brut est filtrée (150-300 Hz). Les spikes des cellules de lieu se réactivent sur une échelle de temps plus rapide durant la ripple (50 ms). Adapté de (Colgin 2016)

L'activité GABAergique du réseau est donc essentielle dans le circuit de l'hippocampe. Le premier rôle que l'on attribue traditionnellement aux interneurones est qu'ils maintiennent le réseau dans les limites physiologiques en limitant l'emballement du système en particulier dans une région hyper-connectée comme CA3, mais comme nous venons de le voir ils permettent de séquencer/synchroniser les décharges des cellules pyramidales dans un ensemble cohérent pour l'émergence d'assemblées cellulaire à la base des processus de mémorisation.

II- Le circuit hippocampique durant le développement

Dans l'hippocampe en développement, plusieurs modèles d'activité spontanée ont été documentés à divers stades de développement, en utilisant essentiellement des approches d'électrophysiologie (*in vitro* et *in vivo*) et d'imagerie (**Figure 22**).

1. L'activité spontanée non corrélée

Il s'agit de la forme d'activité la plus précoce. Elle se caractérise par des pics calciques sporadiques faiblement corrélés entre les neurones. Ces évènements sont observés durant les stades embryonnaires (E16-19) dans des tranches d'hippocampes *in vitro* (Crépel et al. 2007). Cette forme d'activité décroit progressivement jusqu'à la fin de première semaine de vie postnatale et reflète l'absence de synapses électriques et/ou chimiques fonctionnelles entre les neurones. En effet, ces premiers stades de développement sont caractérisés par une activité non synaptique très lente qui est dirigée par les actions paracrines du glutamate et du GABA (Demarque et al. 2002). Aucune activité de ce type n'a été rapportée *in vivo* jusqu'à présent et leurs fonctions physiologiques sont supposées être impliquées dans la différenciation et la migration neuronale (Cossart et Khazipov 2021).

2. Les activités de type plateaux d'assemblées synchrones (SPA)

Elles apparaissent à la naissance et représentent la forme la plus précoce d'activité spontanée coordonnée dans l'hippocampe. Les SPA sont caractérisés par des oscillations récurrentes du potentiel de membrane (1 Hz) produisant un potentiel d'action et un plateau calcique soutenu pendant des périodes d'environ dix secondes (Crépel et al. 2007). Les neurones GABAergiques et glutamatergiques sont tous deux impliqués dans ces activités. Les SPA diminuent progressivement après P2 suite à l'émergence d'inputs GABAergiques, notamment les GDPs (potentiel géant dépolarisant). Ce type d'activité n'a pas non plus été observé *in vivo.* La transition entre les SPA et les GDP apparaît comme un point de contrôle critique du développement pour tous les neurones du CA1 (Cossart et Khazipov 2021; Crépel et al. 2007).

3. Les potentiels géants dépolarisants (GDPs)

Ils sont historiquement le premier modèle d'activité de population décrit dans les tranches de rongeurs néonataux (Ben-Ari et al. 1989; Garaschuk, Hanse, et Konnerth 1998; Khazipov et al. 2004; Khazipov et al., 1997; Leinekugel et al., 1997; Leinekugel et al., 1995) On peut les observer dans les tranches d'hippocampe intact *in vitro* à partir de la naissance jusqu'à la fin de la deuxième semaine de vie postanatale. Les GDPs sont des évènements recrutant de façon coordonnée une large proportion de neurones incluant cellules pyramidales et interneurones. Cette activité se produit à une fréquence de 0.1-0.2 Hz dans l'hippocampe (Crépel et al. 2007). Il est dit que la participation des neurones dans les GDPs diminue en même temps que la réduction du nombre de neurones excités par le GABA au cours de la deuxième semaine de vie postnatale (Ben-Ari et al. 1989). Les GDP sont initialement décrits comme générés dans la région CA3 de l'hippocampe et se propagent vers le CA1. Des bouffées récurrentes d'activité collective présentant des similitudes avec les GDPs ont été décrites *in vivo* (Leinekugel et al., 2002; Valeeva et al., 2018; Cossart et Khazipov 2021), mais l'expression d'une transmission GABAergique initialement excitatrice *in vivo* n'est toujours pas clairement établie.

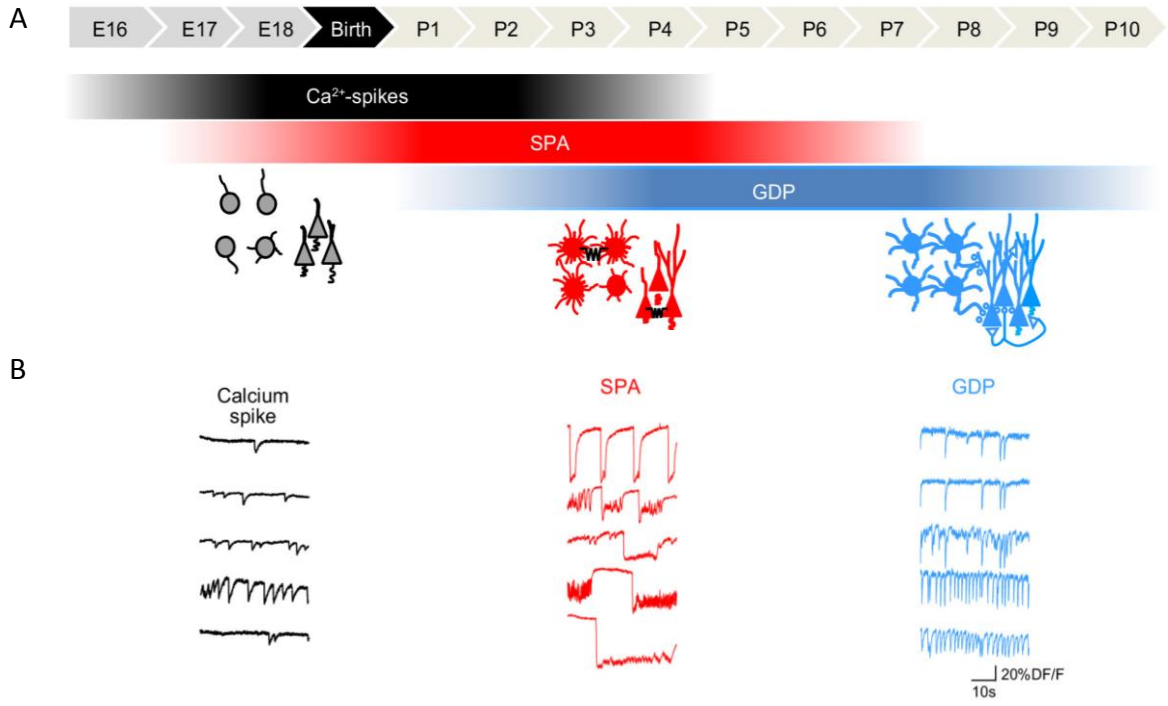


Figure 22 : Chronologie du développement de l'activité *in vitro* dans la région de CA1. A. Evolution chronologique de l'activité *in vitro*. On observe successivement les potentiels d'action calciques (« Ca^{2+} spikes », en noir), les assemblées de plateau synchrone ou SPAs (« Synchronous Plateau Assemblies », en rouge) et les potentiels dépolarisants géants ou GDPs (« Giant Depolarizing Potentials », en bleu). B. Traces calciques caractéristiques des potentiels d'action calciques (1), des SPAs (2) et des GDPs (3). Adapté de (Cossart et Khazipov 2021)

4. Les early sharp-waves (eSW)

Elles sont fréquemment suivies de décharges (appelées "tails") et sont les premières activités coordonnées décrites *in vivo*, à partir de P1, dans le CA1 chez le rat (Leinekugel et al. 2002) (**Figure 23**). De façon similaire avec les sharp-waves (SW) observées dans l'hippocampe de la souris adulte, ce patron d'activité précoce se caractérise par une déflection négative du potentiel de champ local au niveau du stratum radiatum (sr) et lacunosum moleculare (slm) avec une inversion du potentiel de champ local au niveau de la couche pyramidale. Sont associées à ces eSW une activation synaptique dans les deux couches sr et slm et une décharge de potentiels d'action par les cellules du stratum pyramidale (sp). Ces activations récurrentes se produisent à une fréquence d'environ 0.1 Hz synchronisant les neurones de l'hippocampe et sont donc en un sens comparable aux GDP décrits *in vitro*, cependant cette comparaison est à relativiser.

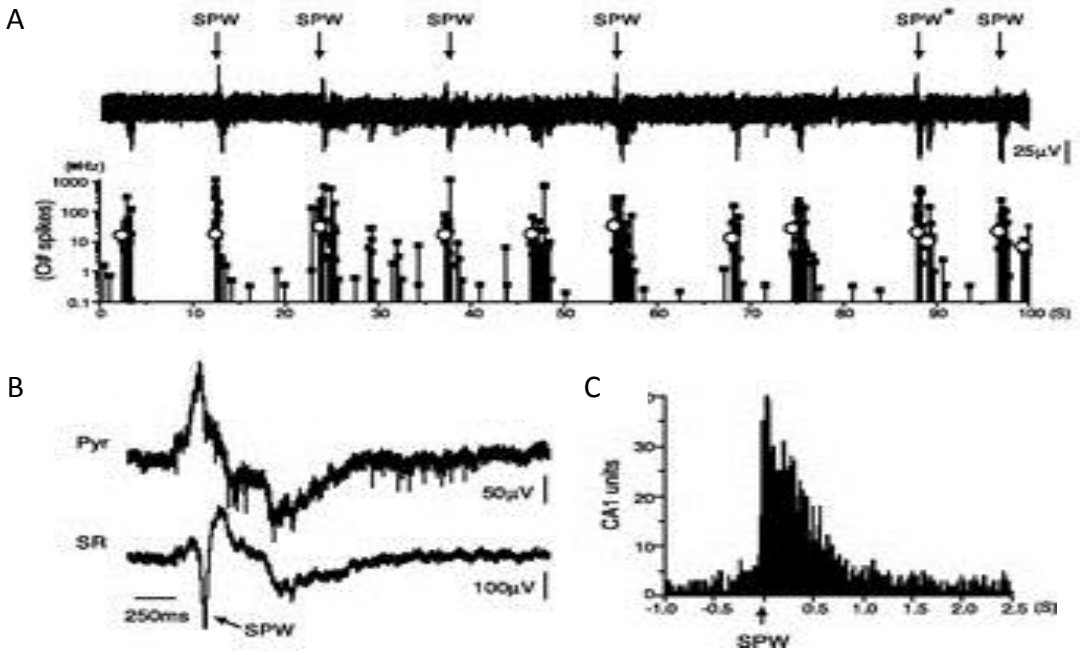


Figure 23 : Activités synchrones récurrentes observées dans la région CA1 de l'hippocampe lors de stades précoces de développement (P4-P6). A. Potentiel de champ local (LFP) de la couche pyramidale (filtré à >200 Hz) montrant l'activité multi-unitaire, l'occurrence des eSWs est dénotée par les flèches. Le graphique du bas représente l'activité multi-unitaire associée, chaque ligne verticale terminée par un carré noir correspond à un potentiel d'action, chaque ligne verticale terminée par un rond blanc correspond à une bouffée de potentiel d'action (la hauteur de la ligne est proportionnelle au nombre de potentiels d'action de la bouffée). **B.** LFP dans la couche pyramidale de la région CA1 de l'hippocampe (tracé du haut) et dans le stratum radiatum (tracé du bas) montrant la déflection négative et l'inversion entre les 2 couches. Les brèves déflections négatives sur le LFP de la couche pyramidale sont des potentiels d'action. **C.** Histogramme du nombre de potentiels d'action enregistrés dans la couche pyramidale autour d'une eSW montrant l'activation des cellules pyramidales dans la demi seconde suivant l'eSW. Adapté de (Leinekugel et al. 2002)

5. L’innervation GABAergique périsomatique

Récemment, il a été montré que l’apparition de l’innervation GABAergique périsomatique provenant des interneurones PV dans la région CA1 de l’hippocampe se produisait autour de P9-P11 chez la souris. En effet, entre P7 et P11 la préférence somatique des axones est multipliée par 2 à P9, et multiplié par trois à P11. C’est-à-dire qu’il est trois fois plus probable qu’un axone formant une synapse sur un soma innerve de nouveau un soma à P11 qu’à P7. Ce développement anatomique est associé à l’augmentation des entrées inhibitrices sur les neurones pyramidaux (Dard et al. 2022).

En plus d’être essentielle dans le circuit hippocampique adulte de l’hippocampe, l’activité GABAergique semble jouer un rôle majeur dans la mise en place des activités de réseaux durant les deux premières semaines de vie postnatales. En effet, il a été montré que le niveau de maturation de l’innervation périsomatique dans le cortex visuel chez le rat influait fortement sur la période critique, période développementale durant laquelle la plasticité neuronale est à son pic d’efficacité afin de modeler les circuits. Ainsi, une diminution de la transmission GABAergique entraîne un retard du début de la période critique. Inversement une augmentation de la transmission GABAergique (Fagiolini et Hensch 2000; Iwai et al. 2003) ainsi qu’un développement précoce des interneurones entraîne (Huang et al. 1999) un avancement du début de cette période critique.

PARTIE 4 : Déficit inhibiteur et régulation du Cl- dans la pathologie

Comme nous l'avons vu, l'homéostasie du Cl- a une importance capitale dans le système nerveux immature et adulte. De nombreuses études font l'état d'une transmission GABAergique altérée dans l'étiologie de nombreuses pathologies comme l'épilepsie, les maladies neurodéveloppementales (schizophrénie ou les troubles du spectre autistique) (Cellot et al. 2016; Deidda et al. 2015; Di Cristo et al. 2018; Doyon et al. 2016; Tyzio et al. 2014).

I- Pathologies neurodéveloppementales :

1. Trouble du spectre autistique

Les troubles du spectre autistique (TSA) sont des troubles du développement caractérisés par des déficits de communication, verbale et non verbale, d'interactions sociales et de comportements stéréotypés (Diagnostic And Statistical Manual Of Mental Disorders, Fifth Edition, 2013). Les patients atteints de TSA présentent une forte comorbidité avec l'épilepsie, de l'ordre de 30 %. De nombreuses études laissent à penser à une modification de la transmission GABAergique et une altération de l'homéostasie chlorure chez les patients souffrant de TSA. Ainsi des changements dans la composition en sous-unité des récepteurs GABA-A sont observés dans le cortex frontal, pariétal et le cervelet de nombreux patients autistes (Mendez et al. 2013). Des analyses sur des tissus post-mortem montrent une réduction de la densité des récepteurs GABA-A dans le cortex cingulaire, ainsi que des niveaux d'expression des GAD65/67 diminués dans le cortex pariétal et le cervelet (Fatemi et al. 2002; Oblak, Gibbs, et Blatt 2009). Plusieurs modèles animaux ont été développés pour tenter de reproduire les déficits observés chez les patients. Des rongeurs traités avec du valproate de sodium (le principe actif de la Dépakine, prescrite comme anti-épileptique), une molécule qui entraine une augmentation du risque de développer des TSA chez les nouveau-nés humains, montre une diminution de l'expression totale de KCC2 dans plusieurs régions cérébrales et une altération de la transmission GABAergique qui redevient excitatrice (Li et al. 2017; Tyzio et al. 2014). Chez des souris modifiées génétiquement pour reproduire le syndrome de l'X fragile, une pathologie causant un retard mental important et des troubles du comportement pouvant s'apparenter à ceux des TSA, un retard de la séquence développementale GABAergique dans le cortex est observé, semblant être lié à une altération de l'expression de NKCC1 (He et al. 2014). Ce lien entre TSA et homéostasie des ions chlorures est renforcé par le fait que l'altération génétique de l'état de phosphorylation de KCC2 chez des souris va entrainer une altération de leur comportement social et des vocalisations des nouveau-nés, pouvant suggérer des déficits de

communication et d'interactions sociales, deux critères primordiaux chez les populations TSA (Moore et al. 2019; Pisella et al. 2019).

2. La voie de la polarité cellulaire planaire

À l'origine, la polarité cellulaire planaire (PCP) définit un axe de polarité qui est perpendiculaire à la surface d'un épithélium. La signalisation de la PCP est connue pour contrôler l'alignement coordonné des cellules polarisées sur le plan d'un tissu et est plus globalement un processus clé du développement et de l'organogenèse chez un grand nombre d'espèces, de la mouche à l'homme (Angers et Moon 2009; Seifert et Mlodzik 2007; Zallen 2007). Des études génétiques chez la souris ont révélé que la signalisation de la PCP est également essentielle au développement neuronal, à la migration neuronale, au guidage axonal, la morphogénèse et la synaptogénèse (Ezan et Montcouquiol 2013; Montcouquiol, Crenshaw, et Kelley 2006). Vangl2, un gène central de la PCP exprimé dans l'hippocampe adulte est nécessaire à un équilibre optimal des fonctions cognitives. Il a été suggéré que la perte du gène Vangl2 serait à l'origine d'une inhibition de la formation des synapses glutamatergiques dans les neurones du CA1 de l'hippocampe et permettrait, directement ou indirectement, l'élimination des épines dendritiques (Thakar et al. 2017). De plus, la délétion de ce dernier serait à l'origine du déséquilibre dans la balance entre « *pattern completion* » et « *pattern separation* », mettant en jeu les sous structures hippocampiques CA3 et DG. Pour réaliser ces tâches complexes, l'hippocampe s'appuie sur des propriétés intégratives spécifiques des neurones, que ce soit à l'échelle de la cellule unique ou bien du circuit. Ces propriétés peuvent être compromises par l'altération de la signalisation intra ou intercellulaire. A ma connaissance, aucune étude sur le rôle physiologique de l'expression de la protéine Vangl2 dans le fonctionnement des circuits hippocampiques n'a été réalisée. Les études préliminaires chez ce modèle transgénique de souris laissent suggérer la présence d'altération dans le circuit de l'hippocampe.

3. Epilepsie

L'épilepsie est un trouble neurologique fréquent qui affecte 50 millions de personnes dans le monde (de Boer, Mula, et Sander 2008). L'épilepsie et les crises épileptiques se définissent comme étant des phénomènes transitoires de signes et/ou symptômes dus à une activité neuronale anormalement synchrone ou excessive dans le cerveau. L'épilepsie est un trouble neurologique caractérisé par une prédisposition persistante à la production de crises et par des troubles neurobiologiques, cognitifs, psychologiques et sociaux. La définition de l'épilepsie nécessite la présence d'au moins une crise (Fisher et al. 2005). Les épilepsies sont complexes avec beaucoup de causes possibles comme les tumeurs, les traumatismes crâniens, les infections virales, les troubles neurodéveloppementaux ou même certaines mutations génétiques (Browne et Holmes 2001). Classiquement on différencie différents syndromes

épileptiques : idiopathiques (maladie ou symptôme existant par lui-même), symptomatiques (dont la cause est connue comme une origine génétique) et cryptogéniques (dont la cause est inconnue). Parmi ce trouble on distingue les épilepsies généralisées (avec un départ simultané dans les deux hémisphères, des activités ictales et interictales bilatérales et synchrones dans les deux hémisphères) et les épilepsies focales ou partielles, comme l'épilepsie du lobe temporal (ELT), dont le départ de la crise ne concerne qu'un seul hémisphère, mais qui peut se généraliser aux deux. De plus, on distingue deux types d'activités épileptique : les activités interictales (qui apparaissent entre les crises) et les activités ictales (c'est-à-dire les crises).

L'épilepsie du lobe temporal (ELT) est la forme d'épilepsie focale la plus fréquente chez l'adulte. Il en existe plusieurs catégories : celles associées à une sclérose de l'hippocampe, celles associées à d'autres lésions autres que celle de l'hippocampe comme des tumeurs neurodéveloppementales, celles associées à une origine génétique et enfin les ELT d'origine inconnue. La plupart du temps les patients atteints d'ELT (de 30 à 60%) ont connu une convulsion dite fébrile prolongée qualifiée d'évènement inaugural durant l'enfance (Theodore et al. 1999). S'en suit une période dite de latence ou d'épileptogénèse pendant une dizaine d'années sans signes cliniques précédant l'apparition des crises chroniques. Le cerveau des patients épileptiques comporte des altérations de leurs circuits, qui ont la capacité dégénérer spontanément en crises. L'aire CA3 de l'hippocampe est une région particulièrement prédisposée à cet état d'hyper-synchronicité. En effet, comme nous l'avons vu précédemment elle comporte de nombreuses connexions excitatrices récurrentes, les synapses entre les pyramides sont très plastiques et se renforcent lors de stimulations répétées. En dehors des crises, qui sont cliniquement manifestes et qui peuvent durer plusieurs dizaines de secondes, l'épilepsie est aussi caractérisée par un type d'activité se produisant entre les crises, appelée anomalie interictale (AI). Ces AI se manifestent à l'EEG par des pics brefs et amples (80-200 ms), se détachant de l'activité basale, mais n'induisent pas de symptômes cliniques. Le corrélat intracellulaire de ce type de pic est une dépolarisation synchrone d'un groupe de neurones, appelée dépolarisation paroxysmale ou *Paroxysmal Depolarizing Shift* (PDS) (Matsumoto et Marsan 1964). Ces dépolarisations sont amples, durent une dizaine de millisecondes et s'apparentent à des PPSE géants. La génération des PDS résulte d'une mécanique physiologique, comportant une phase d'excitation générée par des afférences glutamatergiques, suivie d'une phase d'inhibition par des synapses GABAergiques (Jefferys 2010). En effet, l'interconnectivité dense de CA3 présente une propension à la génération d'excitations incontrôlées si les relais excitateurs récurrents ne sont pas compensés par une inhibition forte. Cependant, les synapses glutamatergiques des récurrences de l'aire CA3 ont des probabilités de transmission relativement faibles (Miles et Wong 1986), mais la sommation temporelle de plusieurs spikes rapprochés accroît cette probabilité, et une cellule délivrant un train de spikes est susceptible d'entraîner la décharge quasi-synchrone d'une assemblée de neurones (Miles et Wong 1983; Traub et Wong 1982).

Une question importante réside dans les phénomènes donnant lieu à la transition des anomalies interictales (AI) vers les crises épileptiques. Cette transition est associée à la diminution progressive de l'inhibition des bouffées de décharge augmentant la fréquence et la durée des AI (Ayala, Matsumoto, et Gumnit 1970; Matsumoto et Marsan 1964). Ce prolongement des décharges pourrait être sous-tendu par une accumulation du potassium extracellulaire, provenant de la repolarisation des neurones après un spike, et qui lors d'activité soutenue s'accumule dans le milieu extracellulaire. Il agit également (comme nous l'avons vu plus haut) de manière indirecte en modifiant la cinétique de certains transporteurs, en particulier KCC2, modifiant l'homéostasie du Cl- et donc l'inhibition GABAergique. Ainsi, les AI comme les crises semblent résulter de phénomènes intrinsèques aux neurones, de modifications synaptiques (excitatrices et inhibitrices) et l'homéostasie des ions potassium et Cl-.

La phase de latence ou d'épileptogénèse serait associée à une réaction inflammatoire, une angiogénèse exacerbée ainsi que des phénomènes de toxicité (Ravizza et al. 2008; Rigau et al. 2007). L'épileptogénèse est un phénomène complexe à étudier car il est particulièrement difficile de déterminer si les modifications anatomiques et/ou fonctionnelles que l'on observe dans les modèles animaux ou chez les patients favorisent l'apparition des crises, ou sont des mécanismes de compensation suite à la crise inaugurale. Cependant, on sait que les interneurones PV contrôlent efficacement l'excitabilité cellulaire dans l'hippocampe et jouent donc un rôle dans les mécanismes de protection contre l'hyperexcitabilité. Des mutations génétiques comme celles retrouvées dans le syndrome épileptique de Dravet réduirait l'excitabilité des PV et donc altèrerait l'inhibition rétrograde des cellules pyramidales (Escayg et Goldin 2010; Goldberg et Coulter 2013; Ogiwara et al. 2007). Cependant, des travaux réalisés au cours de ma thèse remettent en question ces conclusions. En effet, l'inactivation pharmacogénétique spécifique des interneurones PV chez l'animal anesthésié n'a pas entrainé d'augmentation de la décharge globale des cellules pyramidales ni d'activité épileptique dans la région de CA3 mais une réorganisation de l'homéostasie de la décharge individuelle des pyramides. Ces résultats suggèrent que les interneurones PV auraient un rôle plus fonctionnel que de simplement limiter l'emballement excitateur du système (Fuchs et al. 2007).

Un déficit d'inhibition GABAergique est impliqué dans la plupart des formes d'épilepsie. Bien qu'il s'agisse apparemment d'une hypothèse simple et logique à tester, la recherche d'un déficit d'inhibition GABAergique dans les tissus épileptiques se révèle méthodologiquement difficile notamment dû aux difficultés techniques mais également à la grande hétérogénéité des voies de l'inhibition et les nombreux facteurs qui caractérisent sa puissance dont la principale est la régulation du Cl- (Dubanet, 2019).

II- Epilepsie, maladies neurodéveloppementales et GABA excitateur : un gradient Cl- inversé ?

Des études antérieures sur différents modèles d'épilepsie ont suggéré qu'une transmission GABAergique excitatrice pourrait être impliquée dans la transition entre crises épileptiques aiguës et épilepsie chronique (Barmashenko et al. 2011; Bragin et al. 2009; Kourdougli et al. 2017; Nardou et al. 2011; Pathak et al. 2007). Identifier les mécanismes cellulaires responsables de cette transition offrirait donc potentiellement des opportunités de traitement préventif contre l'épilepsie.

L'implication des co-transporteurs NKCC1 et KCC2 dans l'étiologie de nombreux syndromes épileptiques a été montré dans des études sur des tissus humains (Cohen et al. 2002; Huberfeld, Blauwblomme, et Miles 2015; Pallud et al. 2014) et dans de nombreux modèles animaux (Barmashenko et al. 2011; Bragin et al. 2009; Chen et al. 2017; Di Cristo et al. 2018; Magloire et al. 2019; Moore et al. 2017; Nardou et al. 2011; Pathak et al. 2007; Raimondo et al. 2012). Des souris mutantes pour KCC2 (kcc2 -/-) sont plus sensibles aux agents convulsivants et présentent très tôt des activités épileptiques (Hübner et al. 2001; Woo et al. 2002). De plus, de nombreux modèles d'épilepsie chronique montrent une réduction de la fonction de KCC2 augmentant l'excitabilité cellulaire avec une susceptibilité accrue de déclencher des crises. D'un autre côté, des changements de l'expression de NKCC1 ont également été identifiés dans de nombreux type d'épilepsie chez l'humain et pour des modèles d'animaux (Di Cristo et al. 2018). En effet, des niveaux de NKCC1 élevés ont été trouvés dans l'hippocampe sclérosé comparé à un hippocampe contra-latéral sain dans l'épilepsie du lobe temporal (Sen et al. 2007). Des études *in vitro* sur des tranches d'hippocampes de cerveaux humains souffrant d'épilepsie temporale ont montré que les activités intericales résultaient d'une transmission GABAergique dépolarisante (Barmashenko et al. 2011; Cohen et al. 2002) et serait due à une sous-expression de KCC2 (Huberfeld et al. 2007, 2015). De plus, le Cl- s'accumulerait à l'intérieur des neurones suite à des crises d'épilepsie prolongées ce qui engendrerait une transmission GABAergique excitatrice facilitant la génération d'autres crises (Huberfeld et al. 2015; Khalilov et al. 1999) et compromettrait l'efficacité des agents anticonvulsivants (qui visent à augmenter la transmission GABAergique comme les benzodiazépines) (Ben-Ari 2006). De plus, dans des modèles de souris épileptiques induits par l'injection systémique d'agent convulsivant tel que la pilocarpine, l'expression de NKCC1 augmente jusqu'à 45 jours après l'injection alors que l'expression de KCC2 diminue (Li et al. 2008). Ces différents résultats suggèrent qu'une mauvaise régulation du Cl- par une modification de l'activité de NKCC1 et KCC2 contribuerait à la génération de syndromes épileptiques ou de l'hyperexcitabilité neuronale. Cependant, l'altération de KCC2 dans l'épilepsie semble varier d'une région cérébrale à une autre ainsi qu'avec le type de population neuronale. Il devient alors évident que les conséquences d'une altération fonctionnelle de KCC2 favorisant les crises d'épilepsie dépend du stade de la progression de la maladie et/ou de l'activité

corticale durant les AI et durant les crises (Di Cristo et al. 2018). De façon intéressante, il a été montré qu'une inhibition chronique de KCC2 dans l'hippocampe de rat n'a que peu d'effet sur la signalisation du GABA, mais affecte l'excitabilité neuronale et l'activité du réseau en régulant négativement l'expression membranaire des canaux potassiques Task-3 (Goutierre et al. 2019).

Les rôles de ces deux co-transporteurs dans l'étiologie de cette maladie restent encore largement méconnus en raison des limitations technologiques dans l'étude de la transmission GABAergique *in vitro* (dialyse du contenu intracellulaire, artefact des enregistrements *in vitro*). Quelques études tendent à montrer le rôle de KCC2 dans la génération des crises (Magloire et al. 2019; Sivakumaran et al. 2015) et donc une action dépolarisante de la transmission GABAergique *in vivo* (Assaf et Schiller 2016; Krook-Magnuson et al. 2013). Seulement, aucune de ces études ne respecte la dynamique de l'activité synaptique spontanée (activation électrique ou optogénétique d'interneurones) et la contribution d'une transmission GABAergique excitatrice dans l'épilepsie reste donc floue.

III- Espoirs et difficultés dans la question de l'évaluation de la fonction inhibitrice et de la régulation du Cl- dans la pathologie

Traditionnellement, les agents utilisés pour traiter les pathologies associées à l'homéostasie du Cl- visent directement les récepteurs GABA-A comme les benzodiazépines ou les barbituriques, mais ces derniers présentent quelques limitations. En effet, des réponses paradoxales au traitement renforçant la transmission GABAergique ont été observées chez des patients présentant des troubles du développement indiquant une homéostasie du Cl- dérégulée et une polarité inversée de la transmission GABAergique (Bruining et al. 2015). L'agent pharmaceutique le plus utilisé actuellement pour agir sur l'homéostasie du Cl- est la bumétanide, un diurétique antagoniste sélectif de NKCC1 (Ben-Ari 2017).

La bumétanide a été utilisée pour prévenir les crises d'épilepsie chez les nouveau-nés. En effet, un cerveau de nouveau-né serait plus enclin à développer des crises à cause des hauts niveaux de Cl- intracellulaire dans les neurones dus à l'activité précoce de NKCC1 et tardive de KCC2 (Cowan 2002; Dzhala et al. 2005). L'application de bumétanide sur les tranches de l'hippocampe supprime l'activité épileptiforme *in vitro* et atténue les crises induites chez le rat nouveau-né (Dzhala et al. 2005). Également, l'application de bumétanide sur des tranches l'hippocampe néonatal n'empêche pas les crises générées par l'injection d'acide kaïnic (KA) ni sa propagation au tissu voisin mais empêche la génération d'activité épileptique spontanée qui pourraient résulter (Nardou, Ben-Ari, et Khalilov 2009). Cependant, elle augmente la période de latence avant le développement d'une épilepsie chronique, diminue la durée moyenne des crises chez les souris traitées au KA et réduit les activités ictales dans le même modèle quand elle est coadministrée avec du diazépam (Sivakumaran et al. 2015). La bumétanide est également utilisée pour traiter les troubles neurologiques tels que les syndromes du spectre autistiques. Depuis de

nombreuses année, les preuves s'accumulent quant à une application d'une dérégulation de l'homéostasie du Cl- et donc de la transmission GABAergique dans l'étiologie de ce syndrome justifiant l'utilisation de cet agent pour tenter de traiter les patients et constitue un agent prometteur dans le traitement ces symptômes (Ben-Ari 2017; Hadjikhani et al. 2013; Lemonnier et al. 2012, 2017; Lemonnier et Ben-Ari 2010).

Cependant, la capacité de la bumétanide à traverser la barrière hémato-encéphalique est contestée (Erker et al. 2016; Kharod, Kang, et Kadam 2019; Töllner, Brandt, Erker, et al. 2015; Töllner, Brandt, Römermann, et al. 2015; Töllner et al. 2014). Les effets bénéfiques de la bumétanide rapportés dans les cas d'autisme, de schizophrénie et d'épilepsie, étant donné sa faible biodisponibilité cérébrale, posent question. Les mécanismes sous-jacents de ses effets sur des troubles du développement et neuropsychiatriques, pourraient être multifactoriels en raison de la fonction NKCC1 au niveau central mais également au niveau périphérique (Vibat et al. 2001). L'étude des éventuels effets périphériques de la bumétanide permettrait de savoir si d'autres voies sont impliquées dans les effets thérapeutiques de cet agent et pourrait aider à l'avènement d'une nouvelle génération d'agents pharmacologiques.

D'autres agents thérapeutiques visant KCC2 constituent également une piste thérapeutique intéressante. En effet, l'IGF-1 aurait les mêmes effets que la bumétanide sur l'hyperexcitabilité des cellules en augmentant l'expression de KCC2, en diminuant les niveaux de Cl- intracellulaire, et donc augmenterait l'efficacité du signal inhibiteur GABAergique (Baroncelli et al. 2017; Kelsch et al. 2001). Également, une étude a récemment montré l'intérêt d'une autre molécule : le CLP257 qui augmente l'activité de KCC2 (Doyon et al. 2013; Gagnon et al. 2013). Cependant, son mode d'action est encore méconnu et sujet à controverse (Cardarelli et al. 2017) mais pourrait constituer un agent thérapeutique de premier ordre dans le traitement de maladies associées à un défaut de l'homéostasie du Cl-.

PARTIE 5 : Le phénotypage comportemental

Avec l'avènement de la génétique moléculaire et des techniques permettant de manipuler la physiologie neuronale avec une polyvalence et une précision sans précédent, le nombre de modèles animaux augmente considérablement, soutenant un regain d'intérêt pour la physiologie intégrative et le phénotypage comportemental. Cependant, les capacités d'introspection et de langage vraisemblablement limitées des animaux de laboratoire motivent le besoin de concevoir une lecture comportementale sophistiquée des états cognitifs internes (Anderson et Perona 2014; Berman 2018; Gomez-Marin et al. 2014; Pereira, Shaevitz, et Murthy 2020; Tecott et Nestler 2004; von Ziegler, Sturman, et Bohacek 2021). En recherche préclinique, l'analyse du comportement des rongeurs est donc nécessaire pour évaluer les processus cérébraux normaux tels que la mémoire, ou des états pathologiques exprimés par exemple dans les maladies neurodégénératives ou dans les troubles affectifs (Baker 2011; Bennett et Ringach 2016; Cryan et Holmes 2005; Nestler et Hyman 2010).

L'étendue du répertoire comportemental que nous pouvons identifier dépend en grande partie des technologies disponibles pour l'acquisition d'informations biologiques pertinentes. Pendant très longtemps, l'étude du comportement a été limitée par la capacité des humains à identifier, enregistrer et interpréter l'expression de comportements pertinents en temps réel. Au cours des dernières décennies, les progrès de l'informatisation et l'apparition de solutions commerciales ont permis d'automatiser certaines mesures, principalement en fournissant une détection automatique de la position et de la trajectoire suivie par un animal, ou d'événements mécaniques expérimentaux (ruptures de faisceau, appuis sur levier, etc.). Cela a constitué une révolution dans l'utilisation de tests expérimentaux spécifiques, dans lesquels un comportemental univoque est soit exprimé spontanément soit acquis au fil du temps par apprentissage. Contrairement à ces tests bien automatisés, d'autres tests de laboratoire, extrêmement populaires, nécessitent une approche plus éthologique qui implique souvent une analyse manuelle et subjective. Un excellent exemple en est le test de comportement libre ou open field, dans lequel l'animal est placé dans une enceinte expérimentale dans laquelle il peut exprimer toute une variété de comportements d'exploration et d'évaluation des risques, et qui est utilisé pour évaluer l'état émotionnel d'un animal. À l'origine, seule l'activité de défécation était enregistrée en tant qu'indice d'émotivité et d'activation du système nerveux sympathique. La déambulation fut bientôt ajoutée, mais les premières mesures de la déambulation reposaient sur le comptage manuel du nombre d'entrées sur les subdivisions d'un sol quadrillé. Même si l'importance de l'enregistrement de comportements plus subtils et pertinents sur le plan éthologique comme le redressement, le toilettage, le reniflement ou le grincement de dents a été reconnu assez rapidement, la nécessité de repérer manuellement ces comportements a limité le nombre de paramètres étudiés. L'avènement du suivi informatisé via des grilles de faisceaux photo-électriques ou des enregistrements vidéo a fourni des mesures automatisées de la distance et du temps passé dans différentes zones de l'enceinte expérimentale. Cela a rendu le test

d'open field l'un des tests les plus utilisés dans les laboratoires de comportement dans le monde, offrant une lecture rapide à la fois de l'activité locomotrice et de l'anxiété (Cryan et Holmes 2005). Par contre, alors que le nombre d'études utilisant le test d'open field a explosé au cours des dernières décennies, la mesure des comportements éthologiques était passée au second plan. Dans les laboratoires de neurosciences comportementales d'aujourd'hui, les mesures dans le test d'open field sont largement limitées à la quantification de quelques comportements bien caractérisés (par exemple, redressement ou toilettage), ignorant largement la richesse du répertoire comportemental de l'animal exprimé pendant les 10 minutes d'enregistrement par session (Ennaceur 2014). Alors que l'automatisation a donc sans doute nui à la prise en compte de nombreux aspects éthologiques du comportement, il semble que l'avènement récent des techniques d'imagerie (vidéo) et des outils informatiques (algorithmes d'apprentissage automatique) pourrait maintenant ramener l'intérêt sur les considérations éthologiques.

Au cours des deux dernières années, nous avons assisté à une véritable révolution dans le domaine de la détection automatique des parties anatomiques des animaux de laboratoire (pose-tracking). Des algorithmes basés sur des réseaux neuronaux artificiels d'apprentissage profond permettent un suivi sans marqueur de plusieurs parties anatomiques sélectionnées, avec des performances impressionnantes (Mathis et al. 2018; Pereira et al. 2019). Cette technologie a maintenant été fusionnée avec des outils d'apprentissage automatique supervisés, qui permettent la détection et la quantification de comportements complexes et pertinents sur le plan éthologique (Giancardo et al. 2013; Jhuang et al. 2010; Kabra et al. 2013; Sturman et al. 2020, 2020). En outre, les approches d'apprentissage automatique non supervisé commencent à révéler l'étonnant répertoire de séquences comportementales subtiles, souvent indétectables par les humains (Markowitz et al. 2018; Wiltschko et al. 2015). Le résultat est l'émergence d'un nouveau domaine, la neuroéthologie computationnelle, qui relance l'idée de générer un profil de personnalité comportementale, un « ethome » ou « behaviome », par analogie avec le génome (Anderson et Perona 2014; Berman 2018; Datta et al. 2019; Gomez-Marin et al. 2014).

Dans le cadre de mon travail de thèse, j'ai participé à la mise en place d'un dispositif expérimental innovant constitué d'une plateforme (open field) reposant sur des capteurs de pression extrêmement sensibles afin d'identifier des composantes comportementales éthologiques de façon automatique. Ce dispositif combine le recueil des signaux électromagnétiques activés par les mouvements de l'animal à celui d'une ou plusieurs caméras. La sensibilité des capteurs permet de détecter des mouvements aussi fins que les battements cardiaques de la souris lorsqu'elle est immobile, mais également ses mouvements respiratoires, des tremblements exprimés par exemple dans la peur/anxiété, la force et la dynamique des pas individuels lors de la locomotion ou des divers mouvements constituant le toilettage. Les enregistrements vidéo permettent à l'expérimentateur de reconnaitre dans quel comportement l'animal (rat ou souris) est impliqué à chaque instant. L'objectif méthodologique ultime est de combiner l'analyse d'image (vidéo) et du signal électromécanique (capteurs piezoélectriques) pour une détection plus fine

et automatique de la variété des comportements exprimés spontanément par l'animal, répondant ainsi à une demande pressante dans le domaine du phénotypage comportemental, crucial pour la recherche fondamentale et pharmacologique.

Objectifs de thèse

L'investigation directe de la polarité de la transmission GABAergique *in vivo* pose de sérieuses contraintes expérimentales, et l'évaluation des réponses à la transmission GABAergique est difficile. La méthode idéale se doit de préserver les interactions entre le potentiel membranaire, la conductance, les entrées synaptiques en cours (excitatrices et inhibitrices), et la dynamique naturelle du réseau (Assaf et Schiller 2016; Gulledge et Stuart 2003; Magloire et al. 2019). En adaptant aux conditions *in vivo* l'enregistrement extracellulaire des potentiels post-synaptiques GABAergique unitaires précédemment décrits *in vitro*, nous avons pu :

Objectif 1 : Evaluer la polarité de la signalisation GABAergique périsomatique au cours d'une activité spontanée dans le cerveau intact dans des conditions physiologiques. (Article 1, cf. page 67)

Objectif 2 : Evaluer la polarité de la signalisation GABAergique périsomatique durant le développement. (Article 4, cf. p71)

Objectif 3 : Evaluer la polarité de la signalisation GABAergique périsomatique dans des conditions pathologiques comme l'épilepsie chronique, l'autisme, le syndrome de Down ou encore chez un modèle présentant une altération de la signalisation de la PCP. (Article 1, cf. p67 ; Article 5, cf. p76)

Objectif 4 : Mettre en place d'un nouveau dispositif de phénotypage comportemental qui permet entre autres de détecter l'expression d'altérations motrices et émotionnelles dans les troubles neurodéveloppementaux. (Article 2, cf. page 68)

RESULTATS

Articles publiés

I- Article 1 :

Probing the polarity of spontaneous perisomatic GABAergic synaptic transmission in the mouse CA3 circuit *in vivo* (Dubanet et al., 2021, Cell Reports)

Résumé :

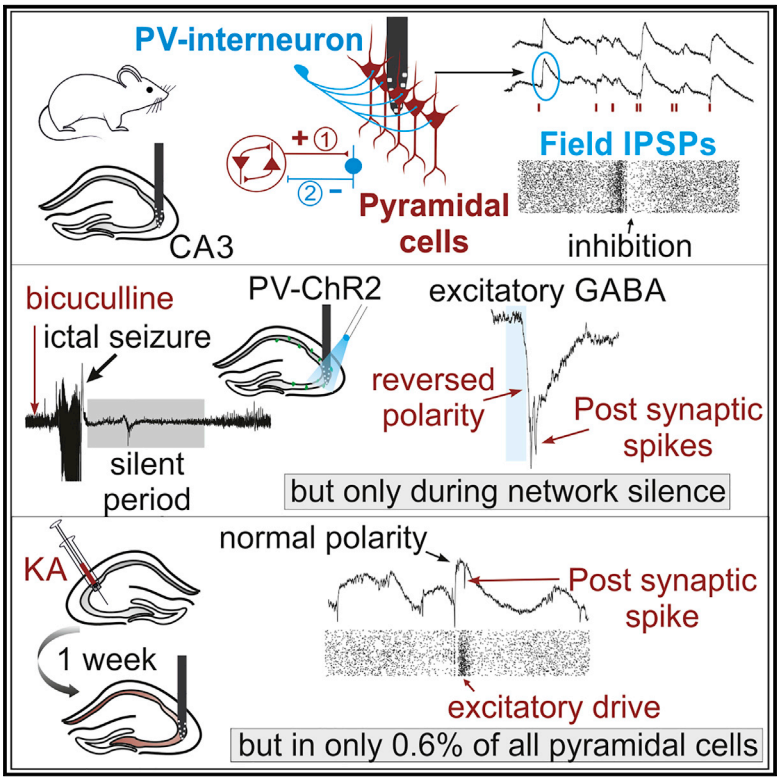
L'hypothèse selon laquelle une inversion de la transmission GABAergique, d'inhibitrice à excitatrice, pourrait être impliqué dans diverses pathologies dont l'épileptogenèse, a connu un succès retentissant mais est finalement controversée en raison de la difficulté technique à évaluer la transmission synaptique GABAergique *in vivo*. Nous avons résolu ce problème par l'enregistrement extracellulaire des décharges neuronales en réponse aux potentiels de champ GABAergiques évoqués sur leur cellules cibles pyramidales par la décharge spontanée ou l'activation optogénétique d'interneurones individuels (de type parvalbumine). Notre évaluation de la transmission GABAergique dans le circuit CA3 de la souris *in vivo* dans deux modèles d'épileptogenèse n'a pas confirmé l'expression significative de l'expression de GABA excitateur, finalement assez anecdotique même si cela n'exclut pas son expression dans d'autres régions cérébrales ou conditions pathologiques. Notre approche a néanmoins permis de détecter des altérations spécifiques de l'inhibition GABAergique au cours de l'activité spontanée *in vivo*, avec une grande sensibilité. Elle représente un outil prometteur pour l'étude du GABA excitateur dans différentes conditions pathologiques pouvant affecter le circuit hippocampique.

Cell Reports

Article

Probing the polarity of spontaneous perisomatic GABAergic synaptic transmission in the mouse CA3 circuit *in vivo*

Graphical abstract



Highlights

- CA3 PV-interneurons generate perisomatic unitary GABAergic field potentials *in vivo*
- GABAergic unitary fields can be used to probe inhibition with single-cell resolution
- GABA reversal after acute seizures is restricted to the postictal silent period
- GABAergic excitation during KA epileptogenesis is restricted to 0.6% of CA3 neurons

Authors

Olivier Dubanet, Arnaldo Ferreira Gomes Da Silva, Andreas Frick, Hajime Hirase, Anna Beyeler, Xavier Leinekugel

Correspondence

xavier@arcadi.eu

In brief

Dubanet et al. show that extracellular probing of perisomatic GABAergic transmission in the mouse CA3 circuit *in vivo* does not support the hypothesis of excitatory GABA in epileptogenesis, but represents a promising tool for the direct assessment of GABAergic transmission in different pathological conditions that may affect the hippocampal circuit.

Dubanet et al., 2021, Cell Reports *36*, 109381
July 13, 2021 © 2021 The Author(s).
https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109381

CellPress

Cell Reports

CellPress
OPEN ACCESS

Article

Probing the polarity of spontaneous perisomatic GABAergic synaptic transmission in the mouse CA3 circuit *in vivo*

Olivier Dubanet,[1] Arnaldo Ferreira Gomes Da Silva,[1,2] Andreas Frick,[1] Hajime Hirase,[3] Anna Beyeler,[1] and Xavier Leinekugel[1,2,4,*]

[1]University of Bordeaux, INSERM U1215, Neurocentre Magendie, 33077 Bordeaux, France
[2]INMED, INSERM, Aix Marseille Univ, France
[3]Center for Translational Neuromedicine, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark
[4]Lead contact
*Correspondence: xavier@arcadi.eu
https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109381

SUMMARY

The hypothesis that reversed, excitatory GABA may be involved in various brain pathologies, including epileptogenesis, is appealing but controversial because of the technical difficulty of probing endogenous GABAergic synaptic function *in vivo*. We overcome this challenge by non-invasive extracellular recording of neuronal firing responses to optogenetically evoked and spontaneously occurring inhibitory perisomatic GABAergic field potentials, generated by individual parvalbumin interneurons on their target pyramidal cells. Our direct probing of GABAergic transmission suggests a rather anecdotal participation of excitatory GABA in two specific models of epileptogenesis in the mouse CA3 circuit *in vivo*, even though this does not preclude its expression in other brain areas or pathological conditions. Our approach allows the detection of distinct alterations of inhibition during spontaneous activity *in vivo*, with high sensitivity. It represents a promising tool for the investigation of excitatory GABA in different pathological conditions that may affect the hippocampal circuit.

INTRODUCTION

Fast and time-locked inhibition, considered essential for network balance and neuronal coding, is mediated by $GABA_A$ receptors ($GABA_A$ R), which are permeable to chloride ions (Cl^-). In normal conditions, neurons maintain a low intracellular concentration of chloride ($[Cl^-]i$), so that the reversal potential of Cl^--mediated currents is more negative than the resting potential (Blaesse et al., 2009). GABA release therefore generates an influx of Cl^-, with a hyperpolarizing effect on membrane potential, and an inhibition of neuronal discharge.

Recent publications have proposed the implication of defective inhibition in the etiology of various pathologies, including epilepsy, depression, schizophrenia, Down syndrome, or autism spectrum disorders (Menendez de la Prida and Trevelyan, 2011; Cellot and Cherubini, 2014; Tyzio et al., 2014; Deidda et al., 2015; Doyon et al., 2016; Lopez-Pigozzi et al., 2016; Ben-Ari, 2017; Valero et al., 2017; Kharod et al., 2019). *In vitro* and *in vivo* experiments have suggested that the defective function of the K-Cl co-transporter KCC2, which would normally extrude Cl^- from the cell, was responsible for a reversed polarity of GABAergic transmission from inhibitory to excitatory, participating in epileptogenesis in animal models (Khalilov et al., 2003; Pathak et al., 2007; Riekki et al., 2008; Bragin et al., 2009; Barmashenko et al., 2011; Nardou et al., 2011; Ellender et al., 2014; Chen et al., 2017; Moore et al., 2017; Wang et al., 2017; Di Cristo et al., 2018; Magloire et al., 2019), as well as in human tissue resected from patients with epilepsy (Cohen et al., 2002; Huberfeld et al., 2007; Pallud et al., 2014). One major difficulty in the study of GABAergic inhibition is to avoid artifactual interference with the native Cl^- gradient, a main determinant of $GABA_A$ R-mediated inhibitory function. Perforated-patch clamp recordings with the compound antibiotic gramicidin provide electrical access to the cell through the formation of pores in the membrane, permeable to cations but impermeant to Cl^-. Perforated-patch recordings with gramicidin have been successfully used *in vitro* to record GABAergic synaptic currents, preserving intracellular Cl^- (Gulledge and Stuart, 2003; Khalilov et al., 2003; Pathak et al., 2007; Barmashenko et al., 2011; Ellender et al., 2014). The Cl^- gradient has also been shown to be affected by the slicing procedure (van den Pol et al., 1996; Dzhala et al., 2012; Valeeva et al., 2016), which calls into question the claims for excitatory GABAergic transmission based on *in vitro* recordings (Valeeva et al., 2016).

In vivo treatment with the diuretic bumetanide, which also reduces the accumulation of Cl^- ions in neurons through the inhibition of the Cl^- intruder NKCC1, was found to reduce behavioral abnormalities in rat and mouse models of autism spectrum disorders (Tyzio et al., 2014) and seizures in animal models of epilepsy (Dzhala et al., 2005; Kahle and Staley, 2008; Brandt

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

et al., 2010; Marguet et al., 2015; Kourdougli et al., 2017; Wang et al., 2017). Bumetanide, however, has a limited bioavailability in the brain due to poor blood-brain barrier penetration (Puskarjov et al., 2014; Donovan et al., 2016; Römermann et al., 2017), and it is unclear whether its action *in vivo* was actually due to the restoration of neuronal Cl^- gradient and inhibitory GABAergic transmission.

Direct investigation of the polarity of GABAergic transmission *in vivo* puts serious constraints in terms of experimental access, and the evaluation of responses to spontaneous synaptic $GABA_A$ R activation is challenging. The ideal method would fully preserve the exact spatiotemporal interactions between membrane potential, conductance, and ongoing synaptic inputs (both excitatory and inhibitory), the natural dynamics of which are highly complex and yet critical for the net inhibitory or excitatory effect of GABAergic transmission (Lu and Trussell, 2001; Gulledge and Stuart, 2003; Lovett-Barron et al., 2012; Astorga et al., 2015; Assaf and Schiller, 2016; Magloire et al., 2019). Adapting to *in vivo* conditions the extracellular recording of GABAergic postsynaptic potentials (field inhibitory postsynaptic potential [IPSPs]) previously described *in vitro* (Glickfeld et al., 2009; Bazelot et al., 2010; Beyeler et al., 2013), we were able to evaluate the polarity of perisomatic GABAergic signaling during spontaneous activity in the intact brain.

RESULTS

Extracellular recording of perisomatic field IPSPs and time-locked inhibition of CA3 pyramidal cell firing *in vivo*

Non-invasive recording of the dynamics of GABAergic synaptic transmission *in vivo* is a challenge. Previous work *in vitro* has suggested that perisomatic inhibitory postsynaptic signals originating from individual interneurons (basket and chandelier cells) could be recorded as extracellular field potentials (field-inhibitory postsynaptic potentials [fIPSPs]) from their target pyramidal cell population (Glickfeld et al., 2009; Bazelot et al., 2010; Beyeler et al., 2013). This approach offers several main advantages. First, extracellular recordings preserve native $[Cl^-]i$ and other cytoplasmic factors critical for GABAergic transmission (Glykys et al., 2014). Second, the polarity of the field events indicates the direction of the current elicited in the target population of pyramidal cells, thereby addressing the question of depolarizing versus hyperpolarizing polarity of GABAergic postsynaptic signaling. Third, combined with unit recording and spike sorting of neuronal discharges, the extracellular detection of population fIPSPs provides a time reference to investigate the net effect of GABAergic perisomatic synaptic signals on the firing of the target neurons with single-cell resolution, allowing a direct quantification of the efficacy of inhibition or excitation provided by perisomatic GABAergic inputs. To evaluate the efficiency and polarity of perisomatic GABAergic transmission in the hippocampus *in vivo*, we have therefore inserted silicon probes into the dorsal CA3 pyramidal layer of urethane-anesthetized mice, recording spontaneous local field potentials and unitary neuronal activity.

Basic properties of spontaneous fIPSPs

As illustrated in Figure 1, spontaneous activity from the CA3 pyramidal layer included action potentials (APs, units) and positive local field events with a profile similar to that of fIPSPs previously described *in vitro* as the $GABA_A$ receptor-mediated postsynaptic potentials originating from parvalbumin (PV) interneurons (Beyeler et al., 2013). Accordingly, these events were characterized by a rapid rise time and a slow decay (time to peak, 2.01 ± 0.53 ms, exponential decay time constant, 3.65 ± 0.05 ms, n = 8 mice), and showed the pharmacological profile of $GABA_A$ R-mediated IPSPs. As illustrated in Figure S1B, fIPSPs persisted (although with reduced frequency) in the presence of locally injected glutamatergic antagonists (frequency of occurrence, 16.3% ± 5.6% of control in D-(−)-2-amino-5-phosphonopentanoate+6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione (APV+DNQX), 5 and 2 mM, respectively, 200–300 nL), at a dose that efficiently abolished glutamatergic transmission, as indicated by the loss of the local field potential (LFP) response evoked by the contralateral electrical stimulation of CA3 inputs. In contrast, fIPSPs were fully blocked by the $GABA_A$ R antagonist bicuculline (0% of control in presence of bicuculline 100 μM, 200 nL, with or without APV+DNQX, n = 3 mice, 1-way ANOVA, $F(3) = 872.37$, $p < 0.001$). The decay kinetics of fIPSPs were prolonged by the $GABA_A$ modulators diazepam (2 mg/kg, intraperitoneal [i.p.]) and zolpidem (10 mg/kg, i.p.). Because fIPSPs amplitude is directly affected by resting membrane potential, an uncontrolled parameter in our extracellular recording conditions, we have restricted our analysis to the decay kinetics of fIPSPs. As illustrated in Figure 1C, zolpidem increased the spontaneous fIPSPs decay time constant by ∼180% (from 4.66 ± 0.36 to 13.07 ± 4.18 ms, n = 5 mice, $p < 0.01$, 2-tailed paired t test, $t(4) = -4.62$), and diazepam by ∼15% (from 3.65 ± 0.05 to 4.19 ± 0.06 ms, n = 3 mice, $p < 0.01$, 2-tailed paired t test, $t(2) = 9.13$).

Time-locked inhibition of pyramidal cells

As observed *in vitro* and expected from perisomatically projecting interneurons (basket and chandelier cells), *in vivo* fIPSPs were associated with the time-locked inhibition of local pyramidal cells. As shown in Figure 1, beside the peak firing that precedes fIPSPs and probably reflects the recruitment of perisomatic inhibition by pyramidal cell discharge (Beyeler et al., 2013), most of the 389 putative pyramidal cells obtained from 18 mice were significantly inhibited after fIPSPs (71.1% ± 12.9% of the neurons tested, n = 18 mice), resulting in a population firing reduced by 83.5% ± 10.4%, returning to baseline values after 10.2 ± 3.5 ms (n = 18 mice).

Perisomatic fIPSPs specifically originate from PV interneurons

Optogenetic activation of PV interneurons

To verify that fIPSPs actually originate from PV interneurons, we recorded the extracellular field potential responses to the optogenetic activation of PV interneurons. PV-Cre mice were injected with the DIO hChR2 (E123T/T159C)-EYFP (double-floxed inverse open reading frame-human channelrhodopsin 2 (E123T/T159C)-enhanced yellow fluorescent protein) construct in the CA3 region to express the cationic actuator ChR2 specifically in PV interneurons. PV immunostaining of the infected mice showed excellent specificity, with 96% to 100% (98.3% ± 2%, n = 3 mice) of the infected (GFP^+) cells being also PV^+ (Figure S1A). As illustrated in Figures 2 and S2, brief (2 ms) local optogenetic activation of PV interneurons evoked fIPSPs, together

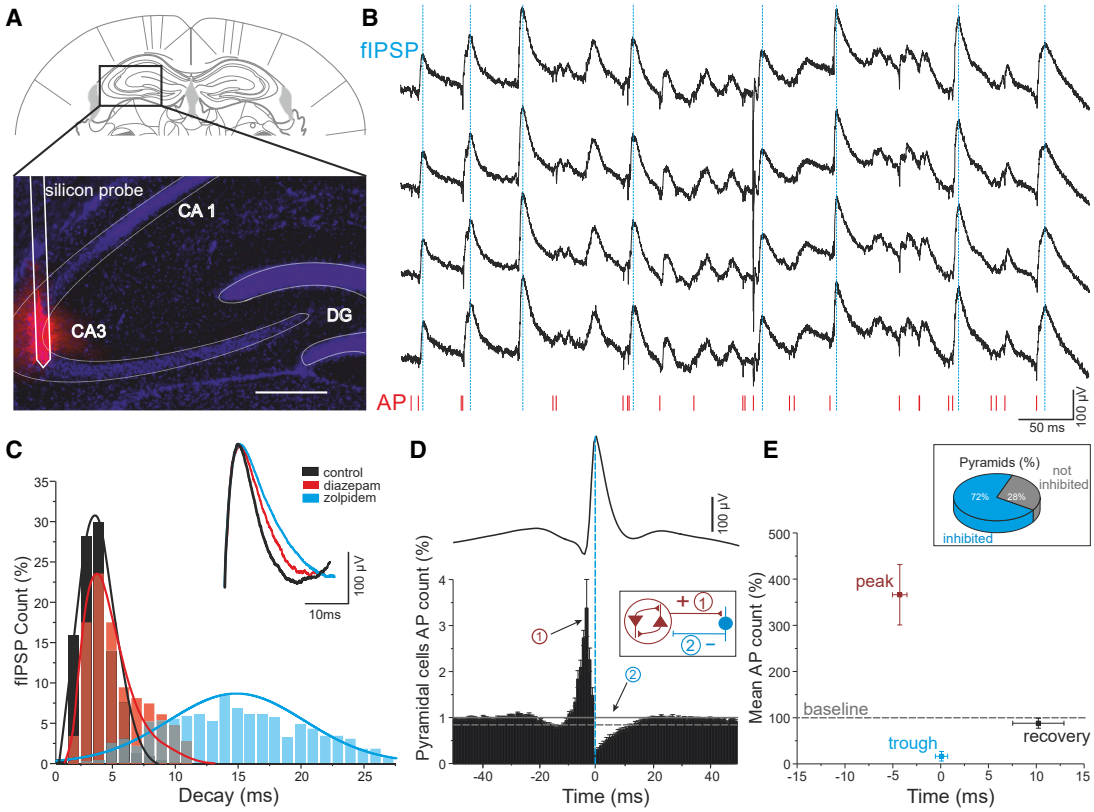


Figure 1. Spontaneous extracellular field inhibitory postsynaptic potentials (fIPSPs) *in vivo*

(A) Schematic of electrode track and histological verification of recording location within the CA3 hippocampal region (1,1-dioctadecyl-3,3,3,3-tetramethylindocarbocyanine perchlorate [DiI]-labeled silicon probe in red, DAPI staining in blue). Scale bar, 100 µm.

(B) Example trace of spontaneous wide-band (0.1 Hz–9 KHz) field-recording activity in the CA3 pyramidal layer, displaying 4 channels (10–20 µm distance between recording sites) of the same shank of a 2-shanks Neuronexus Buzsaki16 silicon probe (scale bars, 50 ms, 100 µV). Field events of positive polarity (upward deflections), fIPSPs (peaks, dashed blue lines). Fast downward deflections, action potentials (AP), also labeled below as raster display (red ticks, multi-unit activity). Note the transient interruption of neuronal firing after fIPSPs.

(C) Comparison of fIPSP decay (top, superimposed average traces normalized on amplitude; below, histogram distributions of fIPSPs decay times) in control (black, n = 934 events from 8 mice), in the presence of zolpidem (blue, n = 566 events from 5 mice) or diazepam (red, n = 259 events from 3 mice). Note prolonged fIPSP decay in the presence of zolpidem and diazepam.

(D) Peri-event time histogram (mean ± SD, n = 18 WT mice, time bin 1 ms) between all the spikes discharged by putative pyramidal cells and fIPSPs (reference, peak time), shown as average trace (vertical scale bar, 100 µV) on top at the same timescale and aligned on peak (dotted blue line). Baseline mean and 2 SD are shown as plain and dotted horizontal gray lines, respectively. Note increased pyramidal cell discharge in the 10 ms before fIPSP, and the inhibition (trough, maximum inhibition) that follows. Inset, schematic illustration of the recurrent excitatory/inhibitory loop: (1) the collective discharge of interconnected pyramidal cells activates the discharge of local interneurons, resulting (2) in perisomatic fIPSP and inhibition of pyramidal population activity.

(E) Diagram illustrating firing rates (mean ± SEM, same 18 mice as in D; baseline level = 100%, calculated from −50 to −30 ms) at peak (bin of maximum firing in the 10 ms before fIPSPs), trough (bin of minimum firing in the 4-ms post-fIPSPs), and recovery (last of post-fIPSPs time bin below baseline - 2SD) time points. Inset, proportion of pyramidal cells (n = 18 mice, for a total of 389 cells) with a significant post-fIPSPs trough (i.e., inhibited versus non-inhibited neurons).

with time-locked inhibition of local pyramidal cells (n = 33 pyramidal cells from 5 mice). Compared to spontaneous fIPSPs, evoked fIPSPs (n = 5 mice) had a longer decay time constant (5.45 ± 1.15 ms for evoked versus 4.11 ± 0.73 ms for spontaneous, $t(4) = 2.93$, $p < 0.05$), faster rise time (1.54 ± 0.15 versus 1.96 ± 0.15 ms, $t(4) = -3.38$, $p < 0.01$), and larger amplitude (287.5 ± 40.53 µV versus 218.1 ± 15.48 µV, $t(4) = -3.19$, $p < 0.05$). As illustrated in Figures 2G–2I, the success rate of PV interneuron optogenetic stimulation to evoke fIPSPs was not significantly affected by the local presence of the glutamatergic receptor antagonists APV and DNQX, but evoked fIPSPs were fully (and reversibly) blocked by the $GABA_A$ R antagonist bicuculline (success rate 81.5% ± 7.1% in control, 91% ± 11.6% in APV+DNQX, 0% in bicuculline, with or without APV+DNQX, 1-way ANOVA, $F(3) = 162.15$). PV interneuron firing is therefore sufficient to evoke fIPSPs.

Chemogenetic silencing of PV interneurons

To know whether other types of interneurons also significantly contributed to the generation of perisomatic fIPSPs during spontaneous CA3 activity, PV-Cre mice were injected with the FLEX-rev::PSAML141F,Y115F:GlyR-IRES-GFP construct to express the inhibitory chemogenetic pharmacologically selective actuator module-glycine receptor (PSAM-GlyR) specifically in PV interneurons. PV immunostaining of the infected mice showed that

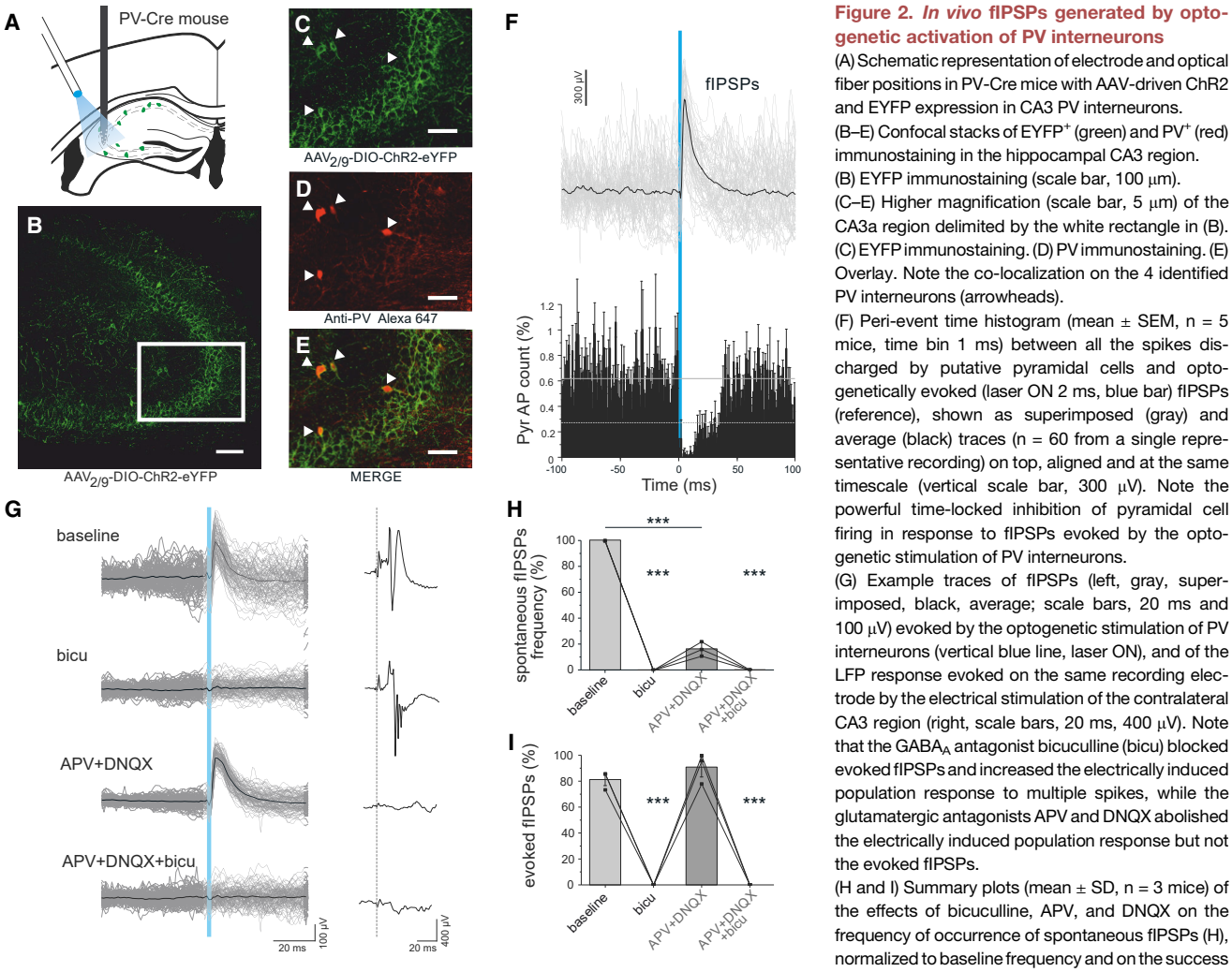


Figure 2. *In vivo* fIPSPs generated by optogenetic activation of PV interneurons

(A) Schematic representation of electrode and optical fiber positions in PV-Cre mice with AAV-driven ChR2 and EYFP expression in CA3 PV interneurons.

(B–E) Confocal stacks of EYFP$^+$ (green) and PV$^+$ (red) immunostaining in the hippocampal CA3 region.

(B) EYFP immunostaining (scale bar, 100 µm).

(C–E) Higher magnification (scale bar, 5 µm) of the CA3a region delimited by the white rectangle in (B).

(C) EYFP immunostaining. (D) PV immunostaining. (E) Overlay. Note the co-localization on the 4 identified PV interneurons (arrowheads).

(F) Peri-event time histogram (mean ± SEM, n = 5 mice, time bin 1 ms) between all the spikes discharged by putative pyramidal cells and optogenetically evoked (laser ON 2 ms, blue bar) fIPSPs (reference), shown as superimposed (gray) and average (black) traces (n = 60 from a single representative recording) on top, aligned and at the same timescale (vertical scale bar, 300 µV). Note the powerful time-locked inhibition of pyramidal cell firing in response to fIPSPs evoked by the optogenetic stimulation of PV interneurons.

(G) Example traces of fIPSPs (left, gray, superimposed, black, average; scale bars, 20 ms and 100 µV) evoked by the optogenetic stimulation of PV interneurons (vertical blue line, laser ON), and of the LFP response evoked on the same recording electrode by the electrical stimulation of the contralateral CA3 region (right, scale bars, 20 ms, 400 µV). Note that the $GABA_A$ antagonist bicuculline (bicu) blocked evoked fIPSPs and increased the electrically induced population response to multiple spikes, while the glutamatergic antagonists APV and DNQX abolished the electrically induced population response but not the evoked fIPSPs.

(H and I) Summary plots (mean ± SD, n = 3 mice) of the effects of bicuculline, APV, and DNQX on the frequency of occurrence of spontaneous fIPSPs (H), normalized to baseline frequency and on the success rate of evoking fIPSPs by the optogenetic stimulation of PV interneurons (I). ***p < 0.001.

See also Figures S1 and S2.

in addition to high specificity (99% ± 1%, n = 3 mice), 98% ± 1% (n = 3 mice) of the PV$^+$ cells in the region of recording were also GFP$^+$ (Figure S1B), indicating that most PV interneurons expressed PSAM-GlyR. As illustrated in Figure 3, the chemogenetic inhibition of PV interneurons induced by local injection of the exogenous ligand PSEM-89S suppressed 92.6% ± 9.7% (median = 97%, n = 5 mice) of spontaneous fIPSPs, from 6.58 ± 3.5 to 0.45 ± 0.66 events/s (n = 5 mice, p < 0.05, 2-sided Wilcoxon-Mann-Whitney test), suggesting that the recorded fIPSPs originated predominantly from PV interneurons. Chemogenetic silencing of PV interneurons in the anesthetized mouse did, however, not increase the global firing rate of the CA3 pyramidal cell population (Figures 3H; 1.19 ± 2.72 Hz in control versus 0.96 ± 1.04 Hz in PSEM-89S, n = 5 mice, not significant [NS], 2-sided Wilcoxon-Mann-Whitney test; 1-way ANOVA, F(1) = 1.51, NS). The application of PSEM-89S in PV-Cre mice not injected with the PSAM-GlyR viral construct did not affect global hippocampal activity (average global pyramidal firing rate, 0.6 ± 0.21 Hz in control versus 0.59 ± 0.18 Hz with PSEM-89S; fIPSP frequency of occurrence, 6.72 ± 1.71 Hz in control versus 6.31 ± 1.44 Hz with PSEM-89S, n = 5 mice, Wilcoxon-Mann-Whitney rank-sum test, NS).

Depolarizing and excitatory perisomatic GABAergic transmission in acute seizures in the drug-free mouse

The reversal potential of Cl^--mediated GABAergic currents (E-GABA) is controlled by the passive movement and active transport of Cl^- through various ionic channels and transporters in the plasma membrane to reach the homeostatic set point for [Cl]i determined by local impermeant anions (Glykys et al., 2014). During spontaneous activity, Cl^- ions flowing through $GABA_A$ channels tend to shift the reversal potential of GABAergic currents toward membrane potential. Changes in external [K^+] will also affect the K-Cl cotransport and Cl^- gradient. E-GABA is therefore a very dynamic process that depends on ongoing fluctuations of membrane potential, GABAergic

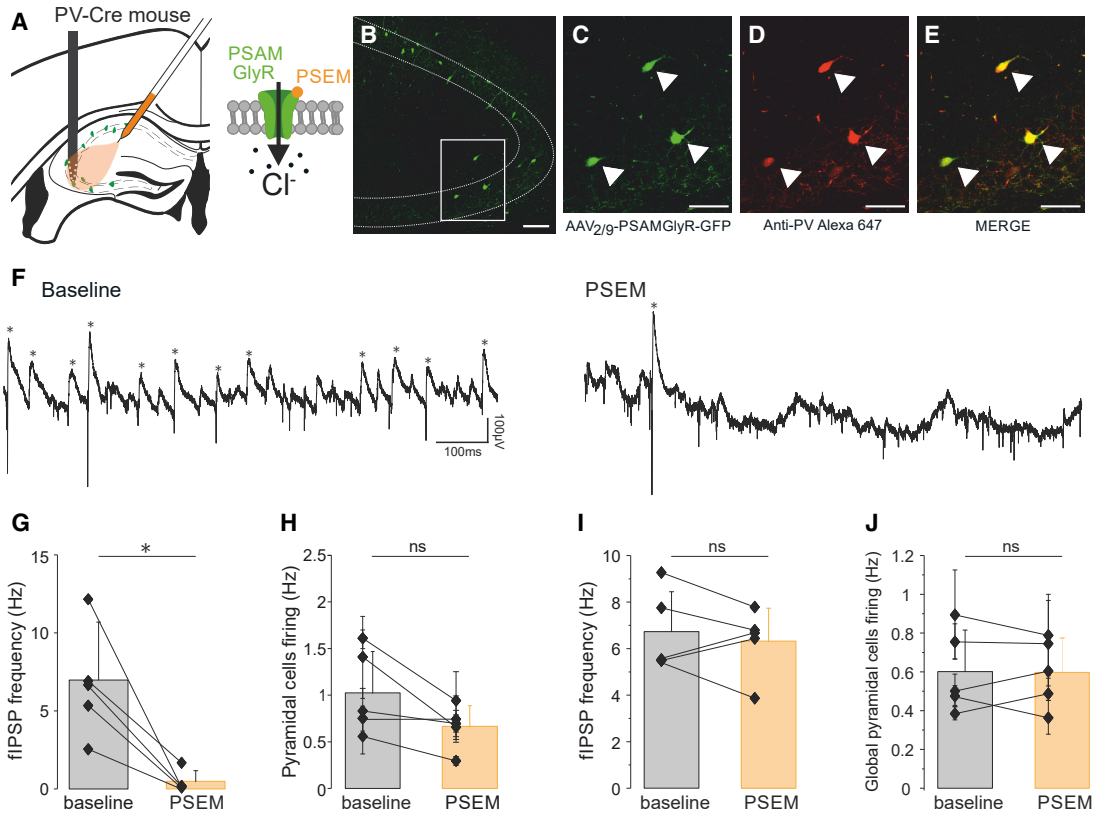


Figure 3. Inhibition of fIPSPs by chemogenetic inactivation of PV interneurons

(A) Schematic representation of electrode and injection site in PV-Cre mice with AAV-driven PSAM-GlyR and GFP expression in CA3 PV interneurons.

(B–E) Confocal stacks of GFP^+ (green) and PV^+ (red) immunostaining in the hippocampal CA3 region (see also Figure S1).

(B) GFP immunostaining (scale bar, 100 μm).

(C–E) Higher magnification (scale bar, 50 μm) of the CA3a region delimited by the white rectangle in (B).

(C) GFP immunostaining.

(D) PV immunostaining.

(E) Overlay. Note the co-localization of PV and PSAM-GlyR immunostaining on the 3 labeled interneurons (arrowheads).

(F) Example trace of spontaneous wide-band (0.1Hz–9KHz) field-recording activity in the CA3 pyramidal layer (scale bars, 100 ms, 100 μV), in control (left, baseline) and in the presence of the exogenous ligand PSEM-89S (right, PSEM). Note the drastic reduction in fIPSPs expression (*).

(G and H) Summary plots (mean ± SD, n = 5 mice) of fIPSP frequency (G) and pyramidal population firing rate (H) in control (baseline) and in the presence of PSEM ($^*p < 0.05$).

(I and J) Summary plots (mean ± SD, n = 5 mice) of fIPSP frequency (I) and pyramidal population firing rate (J) in control (baseline) and in the presence of PSEM-89S in WT mice (i.e., not expressing PSAM-GlyR).

conductances, and network activity. During seizures, GABA is massively released by interneurons while pyramidal cells are depolarized and therefore loaded with Cl^- until extrusion mechanisms restore a hyperpolarizing Cl^- gradient. It is expected that due to the time course of Cl^- extrusion, high Cl^- load and excitatory GABA may participate in a deficit of inhibition immediately after a seizure (Fujiwara-Tsukamoto et al., 2003; Ellender et al., 2014). However, the time dynamics of spontaneous GABAergic synaptic transmission and the Cl^- gradient through the interactions between the fluctuations of membrane potential and intrusion and extrusion systems, which have been studied *in vitro*, largely remain to be characterized *in vivo*. As illustrated in Figure 4, taking advantage of fIPSPs as a non-invasive index of the polarity of GABAergic currents in the CA3 pyramidal population, we have investigated the dynamics of perisomatic inhibition during acute interictal and ictal seizures in awake mice. Spontaneous fIPSPs in the head-fixed condition had a lower frequency of occurrence than under urethane anesthesia (4.13 ± 1.30 Hz versus 8.57 ± 2.05, $t(8) = 3.63$, $p < 0.01$) but comparable rise times (1.81 ± 0.23 versus 1.956 ± 0.15 ms, $t(8) = 1.03$, NS), decay time constants (3.65 ± 0.45 versus 4.11 ± 0.73ms, $t(8) = 1.04$, NS), and amplitudes (206.4 ± 9.35 versus 218.1 ± 15.48 μV, $t(8) = -0.35$, NS).

Reversed fIPSPs after acute seizures

To monitor both spontaneous and evoked fIPSPs, PV-Cre mice were infected with the DIO-hChR2-EYFP construct in the CA3 region. Light stimulation with a locally positioned optical fiber evoked fIPSPs by the direct stimulation of PV interneurons. Acute seizures were induced by a brief and focal intra-hippocampal injection of the pro-epileptic agent bicuculline in the

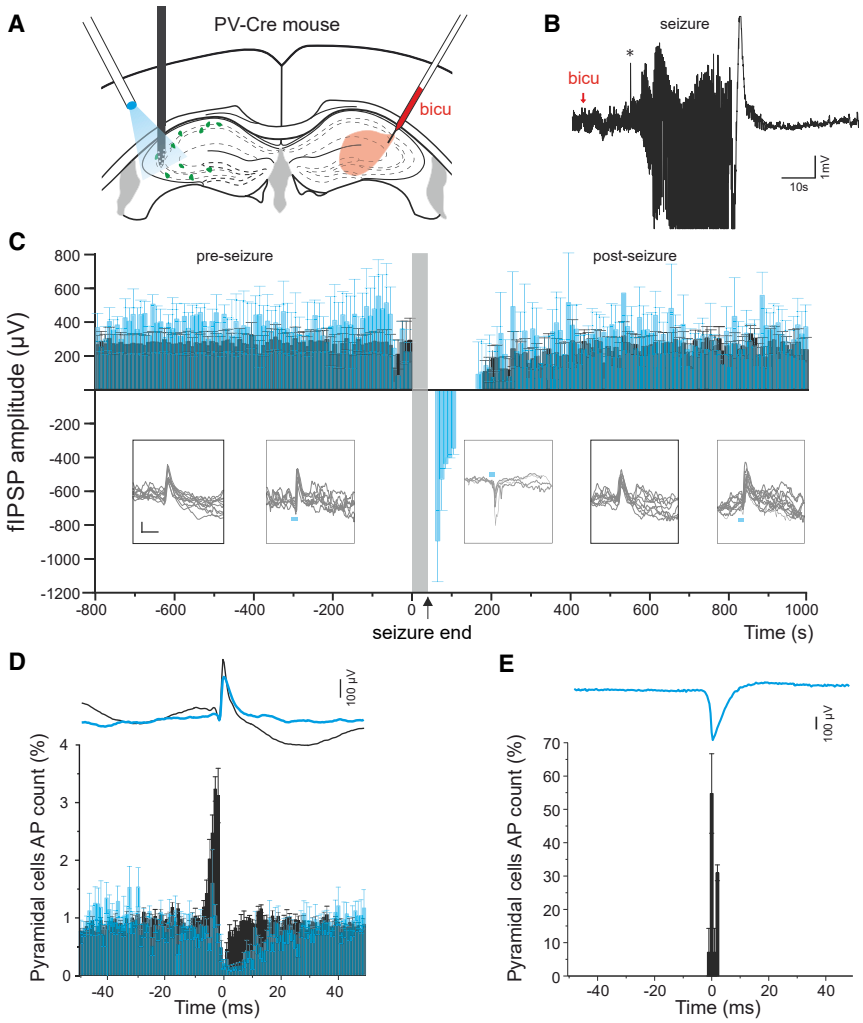


Figure 4. Transiently reversed fIPSPs and perisomatic GABAergic synaptic transmission following acute seizures

(A) Schematic representation of electrode and optical fiber positions in the left hippocampus of PV-Cre mice with AAV-driven ChR2 expression in CA3 PV interneurons, and contralateral injection of the pro-epileptic agent bicuculline.

(B) Example trace (wide-band LFP; scale bars, 10 s, 1 mV) of a seizure (preceded by a single interictal spike, *) as acute response to contralateral bicuculline injection (red arrow).

(C) Summary plot of the time course of fIPSPs amplitude (mean ± SEM, n = 7 mice, black bars, spontaneous; blue bars, evoked by optogenetic activation of PV interneurons; stimulation 2 ms every 2 s without interruption throughout the recording), relative to acute seizures induced by the contralateral injection of bicuculline (vertical gray bar, n = 7 mice, for a total of 14 seizures, aligned by their ending time). Insets, superimposed representative individual spontaneous (scale bars, 10 ms, 100 µV) and optogenetically evoked (horizontal blue bars, laser ON) fIPSPs in control (pre-seizure), during the period right after the seizure (reversed polarity), and after recovery (post-seizure). Note the progressive recovery of fIPSP amplitude. The absence of blue bars during and immediately after the seizure indicates the failures of optogenetically evoked response. See also Figure S3.

(D) Peri-event time histogram (mean ± SEM, time bin 1 ms) between all the spikes discharged by putative pyramidal cells (n = 7 mice) and spontaneous (in black, n = 44,435 events) or optogenetically evoked (in blue, n = 7,738 events) fIPSPs (reference) from the pre- and postseizure periods, shown as average traces on top (spontaneous, black; evoked, blue; scale bar, 100 µV) at the same timescale and aligned on peak.

(E) Peri-event time histogram (mean ± SEM, time bin 1 ms) between firing activity (n = 3 responding putative pyramidal cells from 2 mice of 42 cells from 7 mice) and optogenetically evoked fIPSPs (reference) in the periods right after the seizures (n = 18 fIPSPs from 4 seizures with excited putative pyramidal cells, out of a total of 14 seizures), shown as average traces on top at the same timescale and aligned on peak (scale bar, 100 µV). Note the clear time-locked excitation of pyramidal cell firing and reversed polarity of the fIPSPs evoked by the optogenetic stimulation of PV interneurons in the period right after the seizure.

contralateral hemisphere. Electrophysiological recordings from the drug-free hippocampal hemisphere displayed both interictal activity and ictal seizures, recognized as complex events lasting 30–40 s (33.7 ± 12.3 s, n = 14 seizures from 7 mice), even though the animal did not display behavioral convulsions. Optogenetic stimulations (2 ms, 0.5 Hz) were delivered without interruption throughout the recording session, even though we observed that spontaneous and evoked fIPSPs were transiently interrupted upon ictal seizure onset. While in comparison to baseline, the amplitude profiles of fIPSPs were not significantly affected between epileptic discharges, they transiently appeared with a reversed polarity after the termination of ictal seizures (cf. Figure 4C, latency to normal polarity, 219–550 s, 473.8 ± 140.5 s, n = 7 mice totalizing 14 seizures; cf. Figure S3A for a representative example from a single animal and Figure S3B from a single seizure from another animal), suggesting transiently reversed polarity of GABAergic transmission after ictal seizures, but not after acute interictal spikes.

Time-locked excitation of pyramidal cells

Reversed fIPSP-associated perisomatic GABAergic transmission often (n = 9 over 14 seizures from 7 mice) could entrain the discharge of postsynaptic target neurons, as illustrated by the short-latency APs evoked after fIPSPs in the traces of Figure S2A and in the peri-event histogram between reversed fIPSPs and pyramidal cell firing activity in Figure 4E (n = 3 cells from a total of 42 putative pyramidal cells). The short latency (range 1–3 ms) between fIPSP onset and pyramidal spike firing is compatible with direct excitation but not with previously described rebound from inhibition (Cobb et al., 1995; Assaf and Schiller, 2016; Chang et al., 2018). No more fIPSP-related excitatory interactions were seen after the recovery of the polarity of fIPSPs. These results suggest that an ictal seizure can entrain transient depolarizing and excitatory actions of perisomatic GABAergic transmission in the CA3 circuit. Nevertheless, the expression of excitatory GABA, in terms of time-locked postsynaptic AP firing, was

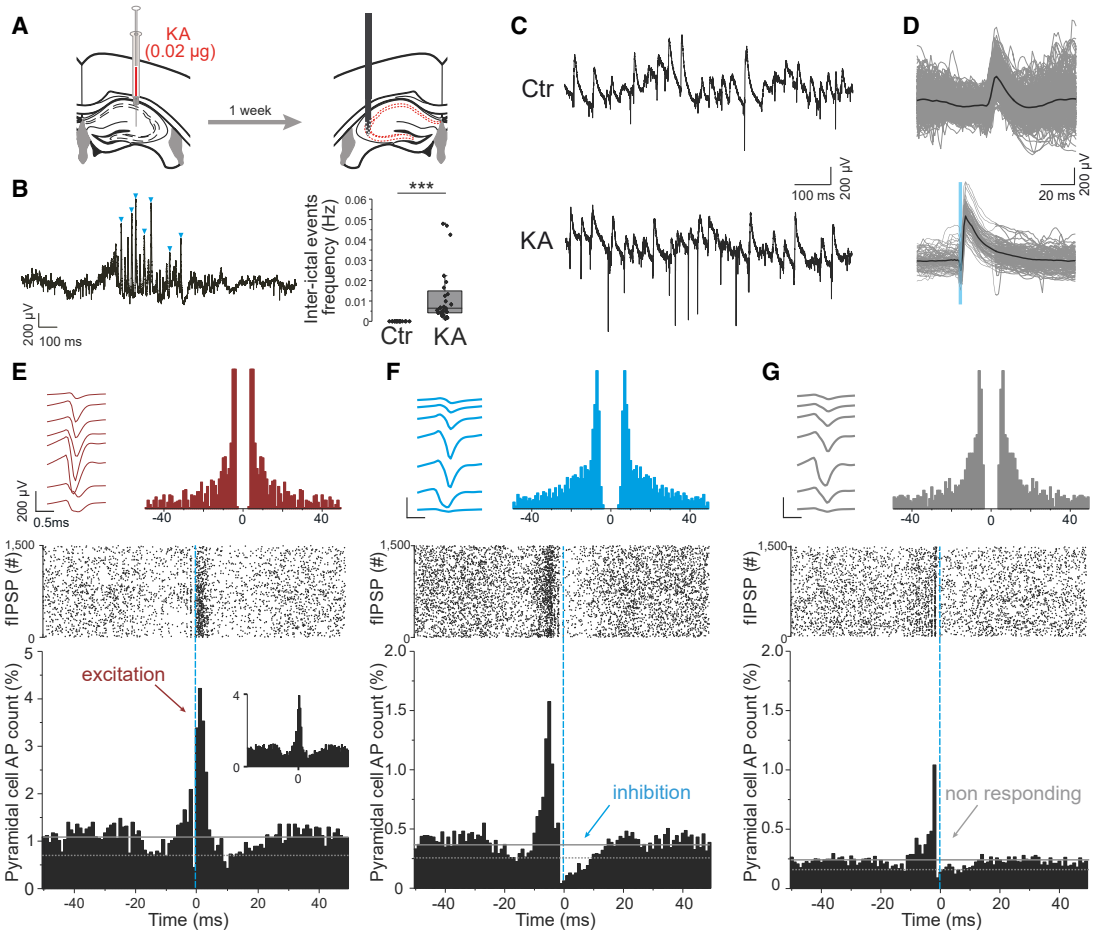


Figure 5. Normal fIPSP polarity but GABA-mediated time-locked excitation in head-fixed KA-treated mice

(A) CA3 neuronal activity was recorded from urethane-anesthetized WT mice 1 week after contralateral, intrahippocampal KA injection.

(B) Example trace (wide-band LFP) of interictal burst (interictal spikes, blue arrowheads; scale bars, 100 ms, 200 µV), and summary plot (n = 18 control and 23 KA-treated mice) of interictal event frequency of occurrence (Hz).

(C) Example traces of spontaneous CA3 pyramidal layer activity in control (top) and KA (bottom) conditions. Scale bars, 100 ms, 200 µV.

(D) Superimposed (gray) and averaged (black) traces of spontaneous (top) or optogenetically evoked (bottom) fIPSPs in KA-treated mice. Scale bars, 20 ms, 200 µV. Note the presence of normal polarity fIPSPs in both conditions.

(E–G) Individual examples of putative pyramidal cells displaying the 3 distinct types of observed responses to spontaneous fIPSP-associated events in KA-treated mice (time-locked excitation [E], time-locked inhibition [F], or no clear change in net firing rate [G, non-responding]). Upper left, average waveforms from the 8 channels of the recording electrode. Scale bars, 0.5 ms, 200 µV. Upper right, spike autocorrelogram. Center, raster display of spike firing aligned on fIPSP occurrence (vertical blue line, fIPSP peak). Lower plot, normalized peri-event time histogram (time bin, 1 ms) of the neuron discharge (AP count) relative to fIPSP peak (reference, vertical blue line). Inset of (E), similar peri-event time histogram but ignoring AP bursts (i.e., all spikes with preceding interspike interval <10 ms omitted from the histogram).

restricted to <10% of the putative pyramidal cells identified, and confined to the postictal period devoid of spontaneous neuronal activity.

Discrete excitatory perisomatic GABAergic transmission in a chronic model of epilepsy

Acute ictal seizures, as induced experimentally by the injection of the convulsive agent kainic acid (KA), can turn into chronic epilepsy after a silent period of up to several weeks. Previous studies on various models of epilepsy have suggested that reversed (excitatory) GABAergic transmission may be involved in the transition between acute seizures and chronic epilepsy (Pathak et al., 2007; Bragin et al., 2009; Barmashenko et al., 2011; Nardou et al., 2011; Töpfer et al., 2014; Kourdougli et al., 2017). This condition is of high clinical relevance because incident occurrence of isolated seizures in humans is known to be a main factor in the development of chronic epilepsy after a latent period that can last from months to several years (French et al., 1993). Identifying the cellular mechanisms responsible for this transition may offer opportunities for preventive treatment against epilepsy.

Unchanged fIPSP polarity

We have evaluated the dynamics of perisomatic inhibition in the CA3 hippocampal region of anesthetized KA-treated mice during the latent period, 1 week after KA injection in the contralateral

hippocampus—therefore at a stage when the animals are not yet epileptic (Riban et al., 2002). All KA-treated mice experienced acute status epilepticus. One week later, as illustrated in Figure 5B, interictal discharges were present in all KA-treated mice (frequency of occurrence, 0.012 ± 0.014 Hz, n = 23 mice), but in none of the control animals (n = 18 mice). As illustrated in Figure 5C, among all identified fIPSPs, none appeared of reversed polarity, whether spontaneous or evoked by the optogenetic activation of PV interneurons, in control (n = 18 WT and 5 PV-ChR2 mice injected with Cre-dependent ChR2) or in KA-treated mice (n = 8 WT and 15 PV-ChR2 mice injected with Cre-dependent ChR2), suggesting that GABAergic transmission was globally hyperpolarizing at the network level. Nevertheless, because the polarity of fIPSPs represents the average response of all of the local pyramidal targets of the discharging presynaptic interneuron(s), the possibility remained that a subpopulation of pyramidal cells may be depolarized or even excited by GABAergic transmission in spite of a globally hyperpolarizing fIPSP-associated population response. We have therefore evaluated the responses of individual cells to spontaneous fIPSP-associated events, and identified some neurons that fired APs in response to GABAergic synaptic inputs.

Altered perisomatic GABAergic transmission

Individual examples of putative pyramidal cells displaying the three distinct types of observed responses to spontaneous fIPSP-associated events (time-locked excitation, time-locked inhibition, or no clear change in net firing rate) are illustrated in Figure 5. None of the cells recorded in control animals showed GABAergic excitation (n = 0 of 389 putative pyramidal cells from 18 mice); excitatory GABAergic transmission expressed in KA-treated mice was the exception. It was observed only in a minority of animals (n = 3 of 23 KA-treated mice), and even in those animals, in a minority of neurons (n = 4 of 78 putative pyramidal cells from 3 KA-treated mice), for a global incidence of 0.6% of all putative pyramidal cells recorded from KA-treated mice (n = 4 of 707 putative pyramidal cells, recorded from 23 KA-treated mice). In fact, the most striking alteration of perisomatic inhibitory function in KA-treated mice was a loss of inhibitory control over most pyramidal neurons.

As illustrated in Figure 6, the frequency of occurrence of fIPSPs was not significantly different in control and KA-treated mice (control, 7.99 ± 3.39 Hz, n = 18 mice; KA-treated, 8.51 ± 2.96 Hz, n = 23 mice; $t(39) = -0.52$, $p = 0.6$), and neither was the distribution of spontaneous or evoked fIPSP amplitudes (2-way ANOVA, $F(39) = 0.54$, $p = 0.98$ for spontaneous, $F(39) = 0.79$, $p = 0.8$ for evoked). In both KA-treated and control mice, fIPSPs displayed some rhythmicity at gamma frequency, as indicated by the 25-ms (i.e., 40 Hz) peak in the distribution of inter-event intervals displayed in Figures 6C and S5, and showed a similar preference for the downward phase of theta oscillations (cf. Figures 6B and S4), which is in line with the previously described theta phase locking of PV-basket cell activity (Klausberger and Somogyi, 2008). Significant theta phase locking of fIPSPs was found for both control and KA-treated mice (Rayleigh test, $p < 0.001$). The preferred phase (μ) was $1.15 \pm 0.11\pi$ in control and $1.12 \pm 0.18\pi$ in KA-treated mice ($t(14) = -0.39$, NS). The modulation strength (κ) was 0.57 ± 0.22 in control and 0.49 ± 0.13 in KA-treated mice ($t(14) = -0.86$, NS). However, only 45.1% ± 30.6% of putative pyramidal cells were inhibited by spontaneous fIPSP-associated events in KA-treated mice (median 38.8%, n = 17 mice, for a total of 572 cells) versus 71.7% ± 12.9% in control animals (median 71.7%, n = 18 mice, for a total of 389 cells; Mann-Whitney test, $p < 0.05$). Putative pyramidal cells from KA-treated mice that were inhibited by fIPSP-associated events presented the same strength and kinetics of inhibition as neurons from control mice (strength of inhibition: control, 90.6% ± 1.9%, n = 18 mice, for a total of 280 inhibited pyramidal cells; KA-treated, 90.8% ± 9.2%, n = 23 mice, for a total of 346 inhibited pyramidal cells, NS, Mann-Whitney test, $p = 0.87$; time before recovery from inhibition: control, 7.92 ± 1.85 ms, n = 18 mice, for a total of 280 pyramidal cells; KA-treated, 8.22 ± 1.73 ms, n = 23 mice, for a total of 346 pyramidal cells, NS, Mann-Whitney test, $p = 0.2$), and the kinetics of fIPSPs were similar in control and KA-treated mice (rise time: 1.98 ± 0.15 ms, n = 5 control mice, 1.67 ± 0.15 ms, n = 5 KA-treated mice, NS, 2-sample t test, $p = 0.093$; decay time constant: 4.11 ± 0.73 ms, n = 5 control mice, 4.68 ± 1.17 ms, n = 5 KA-treated mice, NS, 2-sample t test, $p = 0.39$). Overall, pyramidal population activity was nevertheless ~50% lower in KA-treated mice than in controls (control, 0.81 ± 0.32 Hz, n = 18 mice, for a total of 389 pyramidal cells; KA-treated, 0.39 ± 0.23 Hz, n = 23 mice, for a total of 703 pyramidal cells; Mann-Whitney test, $p < 0.001$), in line with the hypothesis that perisomatic inhibitory function is not the main determinant of quantitative population activity in the CA3 hippocampal circuit. In future studies, it may be interesting to investigate at various delays after an acute seizure episode whether the observed interindividual heterogeneity in the fate of perisomatic inhibitory function across KA-treated mice is involved in the distinct phenotypic outcome of individual animals differentially affected by the initial insult.

DISCUSSION

CA3 fIPSPs to reveal the spontaneous dynamics of GABAergic transmission *in vivo*

The possibility that altered $[Cl^-]i$ regulation and functionally reversed GABAergic transmission (from inhibitory to excitatory) may be involved in major pathologies such as epilepsy, autism spectrum disorders, or schizophrenia has recently engendered considerable interest (Pathak et al., 2007; Kahle and Staley, 2008; Bragin et al., 2009; Barmashenko et al., 2011; Nardou et al., 2011; Löscher et al., 2013; Tyzio et al., 2014; Deidda et al., 2015; Marguet et al., 2015; Doyon et al., 2016; MacKenzie et al., 2016; Ben-Ari, 2017; Chen et al., 2017; Moore et al., 2017; Wang et al., 2017; Kharod et al., 2019). However, a direct assessment of this hypothesis has been hindered by the technical difficulty of probing endogenous GABAergic synaptic function *in vivo* because it implies minimized perturbation of cytoplasmic content, membrane potential, and natural synaptic GABAergic activity (Gulledge and Stuart, 2003; Tyzio et al., 2008; Magloire et al., 2019). The difficulties reside in both the recording methods and the activation of GABAergic transmission. Neuronal $[Cl^-]i$ is very labile and even intracellular recordings with sharp electrodes, which limit cytoplasmic washout, do not preserve membrane integrity, potentially altering resting potential and endogenous Cl^- gradient. Patch clamp (cell-

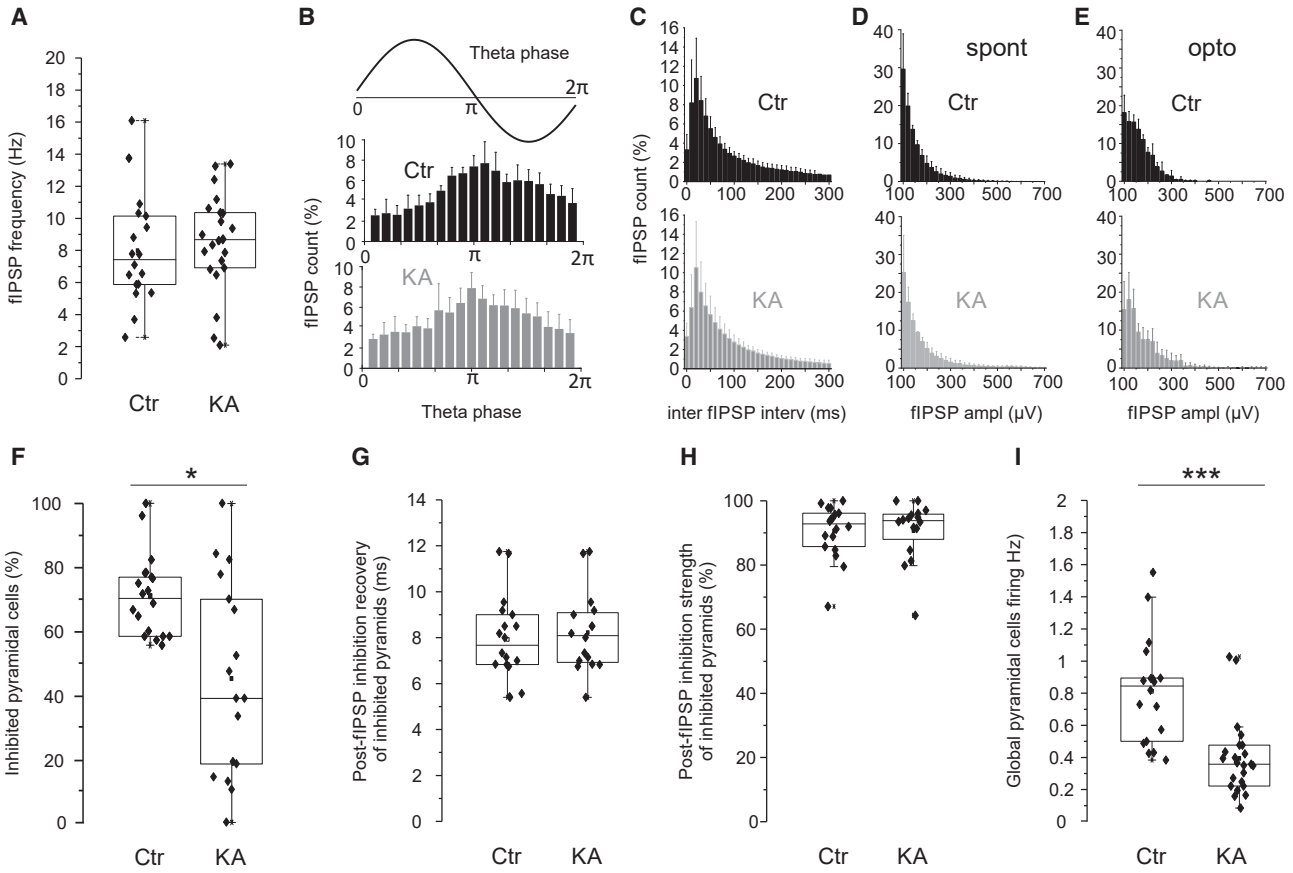


Figure 6. Loss of perisomatic inhibition in a majority of CA3 pyramidal cells during the latent, pre-epileptic period

Summary boxplots and histogram distributions of various parameters of neuronal activity and perisomatic inhibition in CA3 putative pyramidal cells in control (Ctr, n = 18 mice for a total of 389 cells for all of the plots, except in (B), in which only n = 9 mice expressing reliable theta oscillations were included) and KA-treated mice (1 week post-KA injection, n = 23 mice for a total of 703 cells for all of the plots, except in (B), in which only n = 8 mice expressing reliable theta oscillations were included). *$p < 0.05$, ***$p < 0.001$.

(A) Frequency of fIPSPs occurrence (Hz).

(B) fIPSPs theta phase distribution (normalized fIPSP count, %, mean ± SD).

(C) Interevent (fIPSPs) time interval distribution (normalized fIPSP count, %, mean ± SD).

(D and E) Amplitude distribution (normalized fIPSP count, mean ± SD) of spontaneous (spont) and optogenetically evoked (opto) fIPSPs.

(F) Proportion of pyramidal cells inhibited by spontaneous fIPSP-associated events (%).

(G) Latency to recovery (ms) from perisomatic inhibition for neurons that were actually inhibited by fIPSP-associated events (last of post-fIPSPs time bin with firing rate below baseline, 2 SD).

(H) Strength of perisomatic inhibition (percentage of firing inhibition in the bin of minimum firing in the 4-ms post-fIPSPs) for neurons that were actually inhibited by fIPSP-associated events.

(I) Average pyramidal firing rate (Hz). Note the loss of perisomatic inhibitory control (i.e., non-responding cells) in the majority of pyramidal cells in KA-treated mice but the normal inhibition in responding neurons (inhibited by fIPSP-associated events).

See also Figures S4 and S5.

attached) recordings are challenging *in vivo*, yield information about a single neuron at a time, and potentially affect neuronal resting potential (Chavas and Marty, 2003), a major parameter for the function of GABAergic transmission. Imaging techniques (e.g., of calcium or chloride) are advantageous in terms of spatial resolution, but they do not offer the time resolution of electrophysiological recordings and become invasive when applied to deep structures. Calcium imaging, in addition, does not detect depolarizations that do not reach the threshold of calcium channel activation, and hardly discriminates between depolarizing and excitatory effects that can both result in calcium increases, for example, during a shunting depolarization not associated with AP firing (Kirmse et al., 2015) or $GABA_A$-induced calcium increases not mediated by changes in membrane potential (Chavas et al., 2004). As for the activation of $GABA_A$-R, neither the exogenous applications of GABAergic agonists nor the electrical or optogenetic activation of GABAergic inputs used in previous studies (Krook-Magnuson et al., 2013; Minlebaev et al., 2013; Astorga et al., 2015; Kirmse et al., 2015; Assaf and Schiller, 2016; Valeeva et al., 2016; Magloire et al., 2019) respect the dynamics of spontaneous synaptic transmission. For example, boosting Cl^-

extrusion through KCC2 was recently shown to prevent the prolongation of seizures induced by the optogenetic activation of PV interneurons, but had no effect on spontaneous, ongoing seizures (Magloire et al., 2019). Therefore, in spite of a reversed Cl^- gradient and GABAergic polarity with important functional consequences if activated optogenetically, it remains unclear whether excitatory GABAergic transmission functionally participated in spontaneous ongoing seizure activity. Another caveat is that different types of interneurons interact with each other, such as the mutually inhibiting PV and somatostatin (SOM)-expressing interneurons (Lovett-Barron et al., 2012). Experimental manipulation of specific interneurons (e.g., PV) may therefore also influence seizure expression indirectly by the modulation of pyramidal cells' GABAergic inputs from other interneurons. This illustrates the potential confound of interpreting the effects of GABAergic activation at the network level rather than obtaining a direct readout of monosynaptic, spontaneous GABAergic transmission.

Previous work *in vitro* suggested that the direct postsynaptic response of hippocampal pyramidal cells to their spontaneously occurring perisomatic GABAergic inputs could be recorded extracellularly, as fIPSPs, and that the polarity of fIPSPs could be used as an index of the Cl^- gradient and polarity of GABAergic transmission. Perisomatically projecting interneurons (basket and chandelier cells) have a densely arborized axon specifically confined to the pyramidal cell layer and contact a large proportion of pyramidal cells within a restricted projection area (Buhl et al., 1994; Sik et al., 1995). Therefore, each AP of the interneuron triggers the nearly synchronous release of GABA on hundreds of target pyramidal cells, which postsynaptic responses (IPSPs) sum up and can be readily identified from a local extracellular electrode (Glickfeld et al., 2009; Bazelot et al., 2010; Beyeler et al., 2013). *In vitro* investigations in controlled experimental conditions have moreover demonstrated that the polarity of fIPSPs reflected that of the Cl^- gradient (Glickfeld et al., 2009; Bazelot et al., 2010). This approach is well suited to preserving endogenous $[Cl^-]i$, can be performed *in vivo*, and opens the possibility of resolving the dynamics of the Cl^- gradient and polarity of GABAergic transmission over the course of ongoing synaptic activity. A strong limitation, however, is that fIPSPs are the average response of multiple pyramidal cells and therefore lack the resolution of individual cells, so that changes in GABAergic polarity can be detected if they affect the whole neuronal population, but may be missed if affecting only a subset of cells. Moreover, as mentioned before, GABAergic transmission involves both voltage and conductance changes, so that reversed Cl^- gradient and depolarizing GABA carry a complex combination of excitatory (through depolarization) and inhibitory (through increased conductance) influences (Staley and Mody, 1992; Lu and Trussell, 2001; Gulledge and Stuart, 2003; Tyzio et al., 2008; Khalilov et al., 2015; Kirmse et al., 2015). As a consequence, determining the net postsynaptic effect of GABAergic transmission requires a direct readout of postsynaptic firing activity. For all of these reasons, we now propose that the method of choice to probe Cl^- gradient and GABAergic synaptic function *in vivo* lies in combined multi-electrode recording and spike-sorting methods. While fIPSPs provide the timing and global (average) polarity of spontaneous perisomatic GABAergic synaptic events, the distributions (peri-event time histograms) of the spikes of individually identified neurons provide the net functional effect of GABAergic transmission, with single-cell resolution.

Qualitative versus quantitative control of CA3 pyramidal cell activity by perisomatic inhibition from PV interneurons

In line with previous *in vitro* evidence for the direct involvement of basket and chandelier cells in the generation of fIPSPs (Glickfeld et al., 2009; Bazelot et al., 2010; Beyeler et al., 2013), we provide direct evidence that *in vivo* fIPSPs originate mostly from PV interneurons, with little contribution from CCK basket cells, because they were elicited by the optogenetic activation of PV interneuronal firing and largely eliminated by the chemogenetic inhibition of PV interneuronal firing. Perisomatic inhibition is considered to be functionally optimal for the control of neuronal discharge, with synapses strategically located on the soma and close to the site of AP initiation (Miles et al., 1996; Somogyi and Klausberger, 2005). PV and CCK basket as well as chandelier cells are thus considered to play a major role in the control of pyramidal cells firing through time-locked inhibition, presumably preventing excessive firing within the hippocampal circuit. However, in spite of the critical importance of inhibitory control over the recurrent CA3 circuit, the literature is strikingly bereft of direct reports of the dynamics of excitatory-inhibitory interactions in CA3, presumably because of the technical difficulties of identifying perisomatic inhibitory events *in vivo*. Our experimental results confirm that perisomatic GABAergic transmission provides powerful time-locked inhibition of most CA3 pyramidal neurons. An interesting observation is that the blockade of PV interneuron firing was not accompanied by any major quantitative change of activity at the network level. This suggests that in the CA3 hippocampal region, perisomatic inhibition by PV basket cells may be involved in the control of the timing of pyramidal cell discharge rather than quantitative control of the network discharge. Previous reports are compatible with this hypothesis. In a previous study conducted *in vitro* (Beyeler et al., 2013), we reported that fIPSPs were rather poorly recruited by network activity, suggesting that perisomatic inhibition should be more efficient in shaping the timing of spike flow than in limiting excitatory runaway recruitment and preventing the generation of hypersynchronized discharges. Previous reports that transgenic mice with specifically disrupted glutamatergic inputs to PV^+ interneurons displayed hippocampo-dependent spatial memory impairment but no epileptic phenotype also support this interpretation (Fuchs et al., 2007; Rácz et al., 2009).

Detection of alterations in GABAergic perisomatic inhibition in epileptogenesis

One major advantage offered by the extracellular recording of fIPSPs is the possibility of evaluating the efficiency, and even the polarity, of perisomatic GABAergic transmission in a variety of conditions, including pathological conditions in which GABAergic transmission is suspected to be affected, or even reversed, due to altered neuronal Cl^- homeostasis. The Cl^- gradient is dependent on a number of factors, including membrane potential, the distribution of intra- and extracellular

impermeant anions, osmotic pressure, ionic content of the extracellular milieu (e.g., [K^+]), recent neuronal activity involving Cl^- currents, and the dynamics of pumps and transporters involved in maintaining physiological Cl^- gradient (Glykys et al., 2014; Goutierre et al., 2019). Our experiments have tested the possibility of detecting the short- and long-term consequences of acute seizures on Cl^- regulation and GABAergic transmission, which is particularly important in understanding the mechanisms of epileptogenesis and identifying therapeutic actions against the development of epilepsy. We report that transient hypersynchronized discharges can induce a global reversal of neuronal Cl^- gradient and polarity of GABAergic transmission, shifting from inhibitory to excitatory for a duration of several tens of seconds before returning to normal polarity and efficiency. The strongly depolarized membrane potential induced by ictal seizures (depolarizing block) is not in favor of a depolarizing Cl^- gradient and excitatory GABAergic transmission. However, subsequent neuronal hyperpolarization is likely to occur due to the activation of Ca-dependent potassium channels activated by the massive Ca increase that takes place in neurons during the postictal depolarizing block. We hypothesize that the fIPSPs of reversed polarity that were evoked after ictal seizures occurred during this period of strong neuronal hyperpolarization. Accordingly, we did not observe any fIPSPs immediately upon the termination of ictal seizures, and the transient reversal of Cl^- electrochemical gradient and excitatory GABAergic transmission were confined to the period devoid of spontaneous neuronal firing. In line with recent work demonstrating the prolongation of seizures by reversed GABAergic transmission upon the optogenetic activation of PV interneurons but not during spontaneous activity (Magloire et al., 2019), our results highlight the importance of probing the polarity of spontaneous GABAergic synaptic transmission in addition to the responses evoked by artificial experimental stimulations.

While this reversal of GABAergic polarity in acute seizures is readily seen as a reversed polarity of fIPSPs, we also report a more subtle effect during the course of epileptogenesis in the KA model of chronic epilepsy. One week after KA injection, the majority of pyramidal cells had escaped inhibitory control by perisomatic GABAergic events. One possibility could be compromised synaptic transmission between PV interneurons and pyramidal cells, as reported earlier in the context of interictal activity (Karlócai et al., 2014). Our observation is, however, a statistical analysis, and we cannot exclude that the same neurons could be excited by some GABAergic events and inhibited by others (e.g., due to the fluctuations in time of the Cl^- electrochemical gradient), resulting, on average, in the absence of a net effect of GABAergic transmission on postsynaptic AP firing. We observed that perisomatic GABAergic transmission provided time-locked excitation of pyramidal neurons in the hippocampus, but was restricted to a minor subset of neurons, and we did not observe a reversed polarity of fIPSPs. Therefore, subtle alterations in the regulation of Cl^- homeostasis and GABAergic transmission already operated in the hippocampal circuit during the latent period that precedes the establishment of chronic epilepsy. Independent of seizure generation, deficient perisomatic inhibition may significantly affect neuronal processing and information coding. Moreover, even though our method specifically probes the functional transmission from perisomatically projecting PV interneurons, altered Cl^- gradient most likely affects GABAergic transmission from other types of interneurons as well. The functional consequences of defective GABAergic transmission, both in terms of coding and circuit dynamics, and in other periods, other models of epilepsy and other pathologies, remain to be investigated. From our recordings, we may hypothesize that excitatory GABAergic transmission may make a more limited contribution to CA3 hippocampal epileptogenesis than suspected from previous studies (Dzhala et al., 2005; Brandt et al., 2010; Barmashenko et al., 2011; Nardou et al., 2011; Ellender et al., 2014; Marguet et al., 2015; Chen et al., 2017; Kourdougli et al., 2017; Di Cristo et al., 2018), which was not based on direct *in vivo* evidence. However, we cannot exclude the decisive participation of excitatory GABA at different sites than where our recordings were performed. Previous work on human brain tissue resected from patients with epilepsy emphasized the potential involvement of excitatory GABA in the subiculum (Cohen et al., 2002; Huberfeld et al., 2007) or in the neocortex surrounding epileptogenic gliomas (Pallud et al., 2014). The exact contribution of excitatory GABA may depend on the exact brain area and identity of the affected neurons.

Finally, the extracellular detection of perisomatic IPSPs provides an invaluable tool to evaluate Cl^- homeostasis and inhibitory function, in physiological conditions and in situations in which alteration or even reversal of GABAergic transmission is hypothesized to occur. This approach may open possibilities to evaluate the relevance of the excitatory GABA hypothesis in physiological development, autism spectrum disorders, schizophrenia, various forms of epilepsy, and the time course of epileptogenesis, as well as to evaluate the potential of pharmacological agents to interfere with neuronal Cl^- gradient, as an effective therapeutic strategy against major brain diseases.

Limitations of study

Although our results support the primary involvement of perisomatically projecting interneurons (basket and axo-axonic) in the generation of fIPSPs, we cannot exclude the minor participation of other subtypes of interneurons projecting to the dendrites of pyramidal cells, such as bistratified or OLM cells. Regarding the significance of excitatory GABAergic transmission in epileptogenesis, excitatory GABA after acute seizures was confined to a period of neuronal silence and we did not observe a single neuron excited in the absence of laser stimulation (0% of cells were excited by spontaneously occurring fIPSPs). One week after KA-induced seizures (chronic model), we report that among 20 of 23 KA-treated mice (87% of animals), the incidence of excitatory GABA was 0 of 629 neurons = 0%, and from the remaining 3 mice (13% of animals), it was 4 of 78 neurons = 5%—a global incidence of 0.6%. These results do not support a significant role in epileptogenesis of excitatory GABA from CA3 perisomatically projecting PV interneurons, but they do not discard the possibility that GABA may exert excitatory actions at other synapses, between other neuronal types, in distinct areas than the precise locations of our recording electrodes (within or out of the recorded CA3 region), and in other models of epileptogenesis or other brain pathologies.

STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- KEY RESOURCES TABLE
- RESOURCE AVAILABILITY
  - Lead contact
  - Materials availability
  - Data and code availability
- EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS
- METHOD DETAILS
  - Surgical procedures
  - Genetic tools to manipulate PV interneurons
  - Head-restrained recordings
  - Multi-site extracellular recording *in vivo*
  - Histological processing
- QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS
  - Spike sorting
  - Event detection
  - Reliability of fIPSP detection
  - Effects of perisomatic GABAergic events
  - Theta phase-locking
  - Statistics

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental information can be found online at https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109381.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Roustem Khazipov, Rosa Cossart, Valérie Crepel, Tarek Deeb, and Isabel Del Pino for useful comments and discussions on a previous version of the manuscript; Delphine Gonzales, Nathalie Aubailly, and all of the personnel of the Animal Facility of the NeuroCentre Magendie for animal care; Katy Lecorf for help regarding virus preparation; the UMR5293 vector core facility for producing adeno-associated virus (AAV) vectors; and the laboratory of S.M. Sternson (Howard Hughes Medical Institute) for providing the chemical compound PSEM-89S. This work was performed thanks to the following funding sources: Inserm (X.L.), CNRS (X.L.), Région Nouvelle-Aquitaine (X.L.), the Japanese Society for the Promotion of Science (JSPS) (X.L. and H.H.), Agence Nationale de la Recherche (ANR) (X.L.), the Fondation Française pour la Recherche sur les Epilepsies (FFRE) (X.L.), and the French Ministry of Research and Education (O.D.). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

X.L. and H.H. performed the pilot experiments and initiated the study. X.L. conceived and designed the experiments. O.D. and X.L. planned the study. O.D., A.F.G.D.S., A.B., and X.L. performed the experiments. O.D. and X.L. analyzed the data. A.F. contributed lab and breeding space and a fraction of the operating expenses. O.D., A.B., and X.L. wrote the paper.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing interests.

Received: April 29, 2020
Revised: November 18, 2020
Accepted: June 18, 2021
Published: July 13, 2021

REFERENCES

Assaf, F., and Schiller, Y. (2016). The antiepileptic and ictogenic effects of optogenetic neurostimulation of PV-expressing interneurons. J. Neurophysiol. *116*, 1694–1704.

Astorga, G., Bao, J., Marty, A., Augustine, G.J., Franconville, R., Jalil, A., Bradley, J., and Llano, I. (2015). An excitatory GABA loop operating in vivo. Front. Cell. Neurosci. *9*, 275.

Barmashenko, G., Hefft, S., Aertsen, A., Kirschstein, T., and Köhling, R. (2011). Positive shifts of the GABAA receptor reversal potential due to altered chloride homeostasis is widespread after status epilepticus. Epilepsia *52*, 1570–1578.

Bartho, P., Hirase, H., Monconduit, L., Zugaro, M., Harris, K.D., and Buzsaki, G. (2004). Characterization of neocortical principal cells and interneurons by network interactions and extracellular features. Journal of Neurophysiology *92*, 600–608. https://doi.org/10.1152/jn.01170.2003.

Bazelot, M., Dinocourt, C., Cohen, I., and Miles, R. (2010). Unitary inhibitory field potentials in the CA3 region of rat hippocampus. J. Physiol. *588*, 2077–2090.

Ben-Ari, Y. (2017). NKCC1 Chloride Importer Antagonists Attenuate Many Neurological and Psychiatric Disorders. Trends Neurosci. *40*, 536–554.

Berens, P. (2009). CircStat: A MATLAB Toolbox for Circular Statistics. J. Stat. Softw. *31*. https://doi.org/10.18637/jss.v031.i10.

Beyeler, A., Retailleau, A., Molter, C., Mehidi, A., Szabadics, J., and Leinekugel, X. (2013). Recruitment of Perisomatic Inhibition during Spontaneous Hippocampal Activity In Vitro. PLoS ONE *8*, e66509.

Blaesse, P., Airaksinen, M.S., Rivera, C., and Kaila, K. (2009). Cation-chloride cotransporters and neuronal function. Neuron *61*, 820–838.

Bouilleret, V., Ridoux, V., Depaulis, A., Marescaux, C., Nehlig, A., and Le Gal La Salle, G. (1999). Recurrent seizures and hippocampal sclerosis following intrahippocampal kainate injection in adult mice: electroencephalography, histopathology and synaptic reorganization similar to mesial temporal lobe epilepsy. Neuroscience *89*, 717–729.

Bragin, D.E., Sanderson, J.L., Peterson, S., Connor, J.A., and Müller, W.S. (2009). Development of epileptiform excitability in the deep entorhinal cortex after status epilepticus. Eur. J. Neurosci. *30*, 611–624.

Brandt, C., Nozadze, M., Heuchert, N., Rattka, M., and Löscher, W. (2010). Disease-modifying effects of phenobarbital and the NKCC1 inhibitor bumetanide in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. J. Neurosci. *30*, 8602–8612.

Buhl, E.H., Han, Z.S., Lörinczi, Z., Stezhka, V.V., Karnup, S.V., and Somogyi, P. (1994). Physiological properties of anatomically identified axo-axonic cells in the rat hippocampus. J. Neurophysiol. *71*, 1289–1307.

Cellot, G., and Cherubini, E. (2014). GABAergic signaling as therapeutic target for autism spectrum disorders. Front Pediatr. *2*, 70.

Chang, M., Dian, J.A., Dufour, S., Wang, L., Moradi Chameh, H., Ramani, M., Zhang, L., Carlen, P.L., Womelsdorf, T., and Valiante, T.A. (2018). Brief activation of GABAergic interneurons initiates the transition to ictal events through post-inhibitory rebound excitation. Neurobiol. Dis. *109* (*Pt A*), 102–116.

Chavas, J., and Marty, A. (2003). Coexistence of excitatory and inhibitory GABA synapses in the cerebellar interneuron network. J. Neurosci. *23*, 2019–2031.

Chavas, J., Forero, M.E., Collin, T., Llano, I., and Marty, A. (2004). Osmotic tension as a possible link between GABA(A) receptor activation and intracellular calcium elevation. Neuron *44*, 701–713.

Chen, L., Wan, L., Wu, Z., Ren, W., Huang, Y., Qian, B., and Wang, Y. (2017). KCC2 downregulation facilitates epileptic seizures. Sci. Rep. *7*, 156.

Cobb, S.R., Buhl, E.H., Halasy, K., Paulsen, O., and Somogyi, P. (1995). Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABAergic interneurons. Nature *378*, 75–78.

Cohen, I., Navarro, V., Clemenceau, S., Baulac, M., and Miles, R. (2002). On the origin of interictal activity in human temporal lobe epilepsy in vitro. Science *298*, 1418–1421.

Csicsvari, J., Hirase, H., Czurko, A., and Buzsaki, G. (1998). Reliability and state dependence of pyramidal cell-interneuron synapses in the hippocampus: an ensemble approach in the behaving rat. Neuron *21*, 179–189. https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80525-5.

Deidda, G., Parrini, M., Naskar, S., Bozarth, I.F., Contestabile, A., and Cancedda, L. (2015). Reversing excitatory GABAAR signaling restores synaptic plasticity and memory in a mouse model of Down syndrome. Nat. Med. *21*, 318–326.

Di Cristo, G., Awad, P.N., Hamidi, S., and Avoli, M. (2018). KCC2, epileptiform synchronization, and epileptic disorders. Prog. Neurobiol. *162*, 1–16.

Donovan, M.D., Schellekens, H., Boylan, G.B., Cryan, J.F., and Griffin, B.T. (2016). In vitro bidirectional permeability studies identify pharmacokinetic limitations of NKCC1 inhibitor bumetanide. Eur. J. Pharmacol. *770*, 117–125.

Doyon, N., Vinay, L., Prescott, S.A., and De Koninck, Y. (2016). Chloride Regulation: A Dynamic Equilibrium Crucial for Synaptic Inhibition. Neuron *89*, 1157–1172.

Dzhala, V.I., Talos, D.M., Sdrulla, D.A., Brumback, A.C., Mathews, G.C., Benke, T.A., Delpire, E., Jensen, F.E., and Staley, K.J. (2005). NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain. Nat. Med. *11*, 1205–1213.

Dzhala, V., Valeeva, G., Glykys, J., Khazipov, R., and Staley, K. (2012). Traumatic alterations in GABA signaling disrupt hippocampal network activity in the developing brain. J. Neurosci. *32*, 4017–4031.

Ellender, T.J., Raimondo, J.V., Irkle, A., Lamsa, K.P., and Akerman, C.J. (2014). Excitatory effects of parvalbumin-expressing interneurons maintain hippocampal epileptiform activity via synchronous afterdischarges. J. Neurosci. *34*, 15208–15222.

French, J.A., Williamson, P.D., Thadani, V.M., Darcey, T.M., Mattson, R.H., Spencer, S.S., and Spencer, D.D. (1993). Characteristics of medial temporal lobe epilepsy: I. Results of history and physical examination. Ann. Neurol. *34*, 774–780.

Fuchs, E.C., Zivkovic, A.R., Cunningham, M.O., Middleton, S., Lebeau, F.E., Bannerman, D.M., Rozov, A., Whittington, M.A., Traub, R.D., Rawlins, J.N., and Monyer, H. (2007). Recruitment of parvalbumin-positive interneurons determines hippocampal function and associated behavior. Neuron *53*, 591–604.

Fujiwara-Tsukamoto, Y., Isomura, Y., Nambu, A., and Takada, M. (2003). Excitatory GABA input directly drives seizure-like rhythmic synchronization in mature hippocampal CA1 pyramidal cells. Neuroscience *119*, 265–275.

Glickfeld, L.L., Roberts, J.D., Somogyi, P., and Scanziani, M. (2009). Interneurons hyperpolarize pyramidal cells along their entire somatodendritic axis. Nat. Neurosci. *12*, 21–23.

Glykys, J., Dzhala, V., Egawa, K., Balena, T., Saponjian, Y., Kuchibhotla, K.V., Bacskai, B.J., Kahle, K.T., Zeuthen, T., and Staley, K.J. (2014). Local impermeant anions establish the neuronal chloride concentration. Science *343*, 670–675.

Goutierre, M., Al Awabdh, S., Donneger, F., François, E., Gomez-Dominguez, D., Irinopoulou, T., Menendez de la Prida, L., and Poncer, J.C. (2019). KCC2 Regulates Neuronal Excitability and Hippocampal Activity via Interaction with Task-3 Channels. Cell Rep. *28*, 91–103.e7.

Gulledge, A.T., and Stuart, G.J. (2003). Excitatory actions of GABA in the cortex. Neuron *37*, 299–309.

Hazan, L., Zugaro, M., and Buzsáki, G. (2006). Klusters, NeuroScope, NDManager: a free software suite for neurophysiological data processing and visualization. J. Neurosci. Methods *155*, 207–216.

Hippenmeyer, S., Vrieseling, E., Sigrist, M., Portmann, T., Laengle, C., Ladle, D.R., and Arber, S. (2005). A developmental switch in the response of DRG neurons to ETS transcription factor signaling. PLoS Biol. *3*, e159.

Huberfeld, G., Wittner, L., Clemenceau, S., Baulac, M., Kaila, K., Miles, R., and Rivera, C. (2007). Perturbed chloride homeostasis and GABAergic signaling in human temporal lobe epilepsy. J. Neurosci. *27*, 9866–9873.

Kahle, K.T., and Staley, K.J. (2008). The bumetanide-sensitive Na-K-2Cl cotransporter NKCC1 as a potential target of a novel mechanism-based treatment strategy for neonatal seizures. Neurosurg. Focus *25*, E22.

Karlócai, M.R., Kohus, Z., Káli, S., Ulbert, I., Szabó, G., Máté, Z., Freund, T.F., and Gulyás, A.I. (2014). Physiological sharp wave-ripples and interictal events in vitro: what's the difference? Brain *137*, 463–485.

Khalilov, I., Holmes, G.L., and Ben-Ari, Y. (2003). In vitro formation of a secondary epileptogenic mirror focus by interhippocampal propagation of seizures. Nat. Neurosci. *6*, 1079–1085.

Khalilov, I., Minlebaev, M., Mukhtarov, M., and Khazipov, R. (2015). Dynamic Changes from Depolarizing to Hyperpolarizing GABAergic Actions during Giant Depolarizing Potentials in the Neonatal Rat Hippocampus. J. Neurosci. *35*, 12635–12642.

Kharod, S.C., Kang, S.K., and Kadam, S.D. (2019). Off-Label Use of Bumetanide for Brain Disorders: An Overview. Front. Neurosci. *13*, 310.

Kirmse, K., Kummer, M., Kovalchuk, Y., Witte, O.W., Garaschuk, O., and Holthoff, K. (2015). GABA depolarizes immature neurons and inhibits network activity in the neonatal neocortex in vivo. Nat. Commun. *6*, 7750.

Klausberger, T., and Somogyi, P. (2008). Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. Science *321*, 53–57.

Kourdougli, N., Pellegrino, C., Renko, J.M., Khirug, S., Chazal, G., Kukko-Lukjanov, T.K., Lauri, S.E., Gaiarsa, J.L., Zhou, L., Peret, A., et al. (2017). Depolarizing γ-aminobutyric acid contributes to glutamatergic network rewiring in epilepsy. Ann. Neurol. *81*, 251–265.

Krook-Magnuson, E., Armstrong, C., Oijala, M., and Soltesz, I. (2013). On-demand optogenetic control of spontaneous seizures in temporal lobe epilepsy. Nat. Commun. *4*, 1376.

Lopez-Pigozzi, D., Laurent, F., Brotons-Mas, J.R., Valderrama, M., Valero, M., Fernandez-Lamo, I., Cid, E., Gomez-Dominguez, D., Gal, B., and Menendez de la Prida, L. (2016). Altered Oscillatory Dynamics of CA1 Parvalbumin Basket Cells during Theta–Gamma Rhythmopathies of Temporal Lobe Epilepsy. eNeuro *3*, ENEURO.0284-0216.2016.

Löscher, W., Puskarjov, M., and Kaila, K. (2013). Cation-chloride cotransporters NKCC1 and KCC2 as potential targets for novel antiepileptic and antiepileptogenic treatments. Neuropharmacology *69*, 62–74.

Lovett-Barron, M., Turi, G.F., Kaifosh, P., Lee, P.H., Bolze, F., Sun, X.H., Nicoud, J.F., Zemelman, B.V., Sternson, S.M., and Losonczy, A. (2012). Regulation of neuronal input transformations by tunable dendritic inhibition. Nat. Neurosci. *15*, 423–430, S1–S3.

Lu, T., and Trussell, L.O. (2001). Mixed excitatory and inhibitory GABA-mediated transmission in chick cochlear nucleus. J. Physiol. *535*, 125–131.

MacKenzie, G., O'Toole, K.K., Moss, S.J., and Maguire, J. (2016). Compromised GABAergic inhibition contributes to tumor-associated epilepsy. Epilepsy Res. *126*, 185–196.

Magloire, V., Cornford, J., Lieb, A., Kullmann, D.M., and Pavlov, I. (2019). KCC2 overexpression prevents the paradoxical seizure-promoting action of somatic inhibition. Nat. Commun. *10*, 1225.

Magnus, C.J., Lee, P.H., Atasoy, D., Su, H.H., Looger, L.L., and Sternson, S.M. (2011). Chemical and genetic engineering of selective ion channel-ligand interactions. Science *333*, 1292–1296.

Marguet, S.L., Le-Schulte, V.T.Q., Merseburg, A., Neu, A., Eichler, R., Jakovcevski, I., Ivanov, A., Hanganu-Opatz, I.L., Bernard, C., Morellini, F., and Isbrandt, D. (2015). Treatment during a vulnerable developmental period rescues a genetic epilepsy. Nat. Med. *21*, 1436–1444.

Mattis, J., Tye, K.M., Ferenczi, E.A., Ramakrishnan, C., O'Shea, D.J., Prakash, R., Gunaydin, L.A., Hyun, M., Fenno, L.E., Gradinaru, V., et al. (2011). Principles for applying optogenetic tools derived from direct comparative analysis of microbial opsins. Nat. Methods *9*, 159–172.

Menendez de la Prida, L., and Trevelyan, A.J. (2011). Cellular mechanisms of high frequency oscillations in epilepsy: on the diverse sources of pathological activities. Epilepsy Res. *97*, 308–317.

Miles, R., Tóth, K., Gulyás, A.I., Hájos, N., and Freund, T.F. (1996). Differences between somatic and dendritic inhibition in the hippocampus. Neuron *16*, 815–823.

Minlebaev, M., Valeeva, G., Tcheremiskine, V., Coustillier, G., and Khazipov, R. (2013). Cell-attached recordings of responses evoked by photorelease of GABA in the immature cortical neurons. Front. Cell. Neurosci. *7*, 83.

Mitra, P.P., and Bokil, H. (2008). Observed Brain Dynamics (Oxford University Press).

Moore, Y.E., Kelley, M.R., Brandon, N.J., Deeb, T.Z., and Moss, S.J. (2017). Seizing Control of KCC2: A New Therapeutic Target for Epilepsy. Trends Neurosci. *40*, 555–571.

Nardou, R., Yamamoto, S., Chazal, G., Bhar, A., Ferrand, N., Dulac, O., Ben-Ari, Y., and Khalilov, I. (2011). Neuronal chloride accumulation and excitatory GABA underlie aggravation of neonatal epileptiform activities by phenobarbital. Brain *134*, 987–1002.

Pallud, J., Le Van Quyen, M., Bielle, F., Pellegrino, C., Varlet, P., Labussiere, M., Cresto, N., Dieme, M.-J., Baulac, M., Duyckaerts, C., et al. (2014). Cortical GABAergic excitation contributes to epileptic activities around human glioma. Sci. Transl. Med. *6*, 244ra289.

Pathak, H.R., Weissinger, F., Terunuma, M., Carlson, G.C., Hsu, F.-C., Moss, S.J., and Coulter, D.A. (2007). Disrupted dentate granule cell chloride regulation enhances synaptic excitability during development of temporal lobe epilepsy. J. Neurosci. *27*, 14012–14022.

Puskarjov, M., Kahle, K.T., Ruusuvuori, E., and Kaila, K. (2014). Pharmacotherapeutic targeting of cation-chloride cotransporters in neonatal seizures. Epilepsia *55*, 806–818.

Rácz, A., Ponomarenko, A.A., Fuchs, E.C., and Monyer, H. (2009). Augmented hippocampal ripple oscillations in mice with reduced fast excitation onto parvalbumin-positive cells. J. Neurosci. *29*, 2563–2568.

Riban, V., Bouilleret, V., Pham-Lê, B.T., Fritschy, J.M., Marescaux, C., and Depaulis, A. (2002). Evolution of hippocampal epileptic activity during the development of hippocampal sclerosis in a mouse model of temporal lobe epilepsy. Neuroscience *112*, 101–111.

Riekki, R., Pavlov, I., Tornberg, J., Lauri, S.E., Airaksinen, M.S., and Taira, T. (2008). Altered synaptic dynamics and hippocampal excitability but normal long-term plasticity in mice lacking hyperpolarizing GABA A receptor-mediated inhibition in CA1 pyramidal neurons. J. Neurophysiol. *99*, 3075–3089.

Römermann, K., Fedrowitz, M., Hampel, P., Kaczmarek, E., Töllner, K., Erker, T., Sweet, D.H., and Löscher, W. (2017). Multiple blood-brain barrier transport mechanisms limit bumetanide accumulation, and therapeutic potential, in the mammalian brain. Neuropharmacology *117*, 182–194.

Rossant, C., Kadir, S.N., Goodman, D.F.M., Schulman, J., Hunter, M.L.D., Saleem, A.B., Grosmark, A., Belluscio, M., Denfield, G.H., Ecker, A.S., et al. (2016). Spike sorting for large, dense electrode arrays. Nat. Neurosci. *19*, 634–641.

Sik, A., Penttonen, M., Ylinen, A., and Buzsáki, G. (1995). Hippocampal CA1 interneurons: an in vivo intracellular labeling study. J. Neurosci. *15*, 6651–6665.

Somogyi, P., and Klausberger, T. (2005). Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. J. Physiol. *562*, 9–26.

Staley, K.J., and Mody, I. (1992). Shunting of excitatory input to dentate gyrus granule cells by a depolarizing GABAA receptor-mediated postsynaptic conductance. J. Neurophysiol. *68*, 197–212.

Sternson, S.M., and Roth, B.L. (2014). Chemogenetic tools to interrogate brain functions. Annu. Rev. Neurosci. *37*, 387–407.

Töpfer, M., Töllner, K., Brandt, C., Twele, F., Bröer, S., and Löscher, W. (2014). Consequences of inhibition of bumetanide metabolism in rodents on brain penetration and effects of bumetanide in chronic models of epilepsy. Eur. J. Neurosci. *39*, 673–687.

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

Tyzio, R., Nardou, R., Ferrari, D.C., Tsintsadze, T., Shahrokhi, A., Eftekhari, S., Khalilov, I., Tsintsadze, V., Brouchoud, C., Chazal, G., et al. (2014). Oxytocin-mediated GABA inhibition during delivery attenuates autism pathogenesis in rodent offspring. Science *343*, 675–679.

Valeeva, G., Tressard, T., Mukhtarov, M., Baude, A., and Khazipov, R. (2016). An Optogenetic Approach for Investigation of Excitatory and Inhibitory Network GABA Actions in Mice Expressing Channelrhodopsin-2 in GABAergic Neurons. J. Neurosci. *36*, 5961–5973.

Valero, M., Averkin, R.G., Fernandez-Lamo, I., Aguilar, J., Lopez-Pigozzi, D., Brotons-Mas, J.R., Cid, E., Tamas, G., and Menendez de la Prida, L. (2017). Mechanisms for Selective Single-Cell Reactivation during Offline Sharp-Wave Ripples and Their Distortion by Fast Ripples. Neuron *94*, 1234–1247.e7.

van den Pol, A.N., Obrietan, K., and Chen, G. (1996). Excitatory actions of GABA after neuronal trauma. J. Neurosci. *16*, 4283–4292.

Wang, Y., Xu, C., Xu, Z., Ji, C., Liang, J., Wang, Y., Chen, B., Wu, X., Gao, F., Wang, S., et al. (2017). Depolarized GABAergic Signaling in Subicular Microcircuits Mediates Generalized Seizure in Temporal Lobe Epilepsy. Neuron *95*, 92–105.e5.

STAR★METHODS

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
Mouse Monoclonal Anti-Parvalbumin antibody	Sigma-Aldrich	Cat# P3088; RRID:AB_477329
Rabbit GFP Polyclonal Antibody, Alexa Fluor 488	Thermo Fisher	Cat# A-21311; RRID:AB_221477
Goat anti-Mouse IgG, Alexa Fluor 647	Thermo Fisher	Cat# A-21235; RRID:AB_2535804
Bacterial and virus strains		
AAV9-Ef1a-DIO hChR2(E123T/T159C)-EYFP	Mattis et al., 2011	Addgene Catalog # 35509-AAV9
rAAV-syn::FLEX-rev::PSAML141F:GlyR-IRES-GFP	Magnus et al., 2011	Addgene Catalog # 32479
Chemicals, peptides, and recombinant proteins		
PSEM-89S	Scott Sternson, Janelia Farm Research Campus, VA, USA	N/A
Bicuculline	Sigma Aldrich	Catalog #14340
Dil Stain (1,1'-Dioctadecyl-3,3,3′, 3′-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate ('Dil'; DilC18(3)))	Thermofisher	Catalog number: D282
Urethane	Sigma Aldrich	Catalog # U2500
ketamine (Imalgene 1000)	Merial	N/A
xylazine (Rompun 2%)	Bayer	N/A
DAPI	Sigma Aldrich	Catalog # D9542
Experimental models: organisms/strains		
Mouse: B6;129P2-Pvalbtm1(cre)Arbr/J	Hippenmeyer et al., 2005	JAX stock #008069
Mouse: B6129SF2/J	N/A	JAX stock #101045
Software and algorithms		
ImageJ		https://imagej.net
Imaris	Oxford Intruments	https://imaris.oxinst.com
Neuroscope ndmanager	Hazan et al., 2006	http://neurosuite.sourceforge.net
KlustaSuite	Rossant et al., 2016	https://www.ucl.ac.uk/cortexlab/
MiniAnalysis software	Synaptosoft Inc.	www.synaptosoft.com/MiniAnalysis
Origin	OriginLab, Northampton, MA	https://www.originlab.com
MATLAB	MathWorks	https://www.mathworks.com

RESOURCE AVAILABILITY

Lead contact

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the Lead Contact Xavier Leinekugel (xavier@arcadi.eu).

Materials availability

This study did not generate new unique reagents.

Data and code availability

The data shown in the paper and custom code for analysis supporting the current study will be made available from the corresponding author upon request.

EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS

A total of 58 male adult mice (age 5-10 weeks, body weight 30-40 g) were used in this study. Animals were kept on a 12h:12h light (7am-7pm) / dark (7pm-7am) cycle and provided with *ad libitum* access to food and water. Among 32 transgenic mice expressing the Cre-recombinase under the control of the Parvalbumin promoter (PV-Cre, Hippenmeyer et al., 2005), Jackson Laboratory, B6;129P2-Pvalbtm1(cre)Arbr/J), 27 were injected with Cre-dependent Channelrhodopsin2 (ChR2) for optogenetic activation of PV interneurons with light pulses delivered from a laser source through an optical fiber, among which 15 received an intrahippocampal injection of the convulsive agent kaïnic acid (Sigma-Aldrich Co., St Luis, MO), and 5 with the Cre-dependent Pharmacologically Selective Actuator Module fused to the glycine receptor (PSAM-GlyR) for chemogenetic silencing of PV-interneurons with the exogenous specific ligand PSEM-89S (Magnus et al., 2011; Sternson and Roth, 2014). Among 26 wild-type mice (B6129SF2), 8 received an intra-hippocampal injection of kainic acid, and the other 18 served as controls. All experimental procedures were performed in accordance with the EU directives regarding the protection of animals used for experimental and scientific purposes (86/609/EEC and 2010/63/EU), with the French law, and approved by the Ethical committee CEEA50 (saisines #10894, 10896 and 19354).

METHOD DETAILS

Surgical procedures

The mice were anesthetized with isoflurane (1.5 - 5%), placed in a stereotaxic frame (David Kopf Instruments) and kept on a thermal blanket (Physitemp) to maintain their body temperature at 37.5°C. The eyes were covered with a protective liquid gel (Ocrygel). The scalp and periosteum over the dorsal surface of the skull were removed. **For virus injection** (optogenetic and chemogenetic constructions), a small craniotomy was executed at the coordinates of the left dorsal hippocampus (AP-1.6mm and L2.5mm relative to Bregma), and the injections (500nl measured using a Hamilton syringe, 2mm deep from the brain surface) performed (n = 32 PV-Cre mice) using a thin glass capillary (40-80μm at the tip). After injection, the capillary was maintained *in situ* for about 10 min before being slowly removed. The scalp was then sutured and the animal housed individually for 3-6 weeks before electrophysiological recording. **For head-restrained experiments** (n = 7 PV-Cre mice), reference and ground wires were implanted in the cerebellum and attached to a 2-pin connector, maintained together with a small custom-made horizontal stainless-steel bar anchored to the skull above the cerebellum with dental acrylic. A thin anchoring layer of dental acrylic (Super-Bond, Frapident) was applied on the exposed skull, except at specific locations in which a thin layer of bone was kept intact to allow for dorsal CA3 targeting with the recording silicon probe (left hemisphere, AP-1.6, L2.5, vertical insertion) and optical fiber (AP-1.6, L 3.2, insertion with an angle of 15° from vertical) as well as contralateral (right hemisphere) dorsal hippocampus targeting of the capillary for bicuculline injection (AP-1.6 L1.5, insertion 20° from vertical). **For the study of chronic epileptogenesis** (n = 8 WT mice and 15 PV-Cre mice injected with Cre-dependent ChR2), a craniotomy was performed above the dorsal hippocampus (right hemisphere, AP-1.6, L1.5) for vertical insertion of a capillary and injection of kainic acid (0,2μg dissolved in saline, 500nl measured using a Hamilton syringe) at 1.8 mm from the brain surface. After injection, the capillary was maintained *in situ* for an additional 5 min before being slowly removed. The scalp was then sutured and the animal housed individually for 1 week before electrophysiological recording. As described in previous work (Bouilleret et al., 1999; Riban et al., 2002), 90% of the mice injected with KA experience an initial status epilepticus followed by a latent period (i.e. without seizures) of about 2 weeks before expressing chronic epilepsy. We can therefore consider that most of the animals we recorded (n = 23 mice) were in a pre-epileptic state. Bicuculline, diazepam and kaïnic acid were purchased from Sigma-Aldrich Co., St Luis, MO.

Genetic tools to manipulate PV interneurons

For **optogenetic** excitation of PV interneurons, PV-Cre mice were injected with an adeno-associated virus (AAV) bearing ChR-2 with a YFP reporter (Mattis et al., 2011), pAAV-Ef1a-DIO hChR2 (E123T/T159C)-EYFP (gift from Karl Deisseroth, packaged into AAV serotype 9 from Addgene, plasmid # 35509, initial viral titer $\geq$ 1x10*13 gcp/ml, diluted four times in HBSS). Optogenetic activation (light wavelength 473nm, power max 10-14mW, 2ms pulses, 0.5Hz, driven by a train generator and current stimulator from Digitimer Ltd) was delivered through an optical fiber (diameter 200μm) connected to a diode-pumped solid-state (DPSS) laser (Shangai instrument, 100mW or IKECOOL Corporation). For **chemogenetic** inhibition of PV interneurons, we used an AAV bearing PSAM-GlyR with a GFP reporter, -rAAV-syn::FLEX-rev::PSAML141F,Y115F:GlyR-IRES-GFP (Addgene, gift from Scott Sternson, plasmid # 32481, packaged into AAV serotype 9, initial viral titer $\geq$ 10*13 gcp/ml, diluted four times in HBSS). PSAM-GlyR activation was performed by the injection of the specific ligand PSEM-89S (150-200nl, 15μM in saline, obtained from Scott Sternson, Janelia Farm Research Campus, VA, USA), pressure-ejected into the left hippocampus from a glass capillary (40-80μm at the tip).

Head-restrained recordings

The mice (n = 7 PV-Cre), previously implanted with head-posts, were maintained in the stereotaxic apparatus from their implanted fixation bars. Their body was inserted into a plastic tube (diameter approximately 5cm) to provide a reassuring confined environment and prevent excessive body movement. The animals readily habituated to head-fixed conditions. After initial training periods of a few minutes, restraint duration was gradually increased each day until the mouse would sit calmly for a period of roughly 1h. Electrophysiological recordings were performed after several days (at least five) of habituation. The dominant behavioral state in the

head-restrained condition was awake immobility. On the day of recording, under brief isoflurane anesthesia (and body temperature control with a heating pad, 37.5°C), the craniotomies were completed and the silicon probe, optical fiber and injection-capillary inserted. After 1h recovery from anesthesia, and baseline recording, bicuculline was injected (100-200nl, 100μM in saline) into the right dorsal hippocampus to induce acute hippocampal seizures. At the end of the recording session, the animals were sacrificed and their brains removed for histological verification of electrode and optical fiber positions. The seizures induced in the head-restrained awake condition are most often not convulsive. In case of convulsion, the animal was immediately anesthetized with isoflurane and the experiment interrupted. This experimental aspect has been specifically submitted and approved by the local ethics committee (EC_{50}) and the final protocol validated by the French Government (saisine #19355).

Multi-site extracellular recording *in vivo*

Extracellular recordings of spontaneous multi-unit activity and local field potentials were performed on mice either drug free in the head-restrained configuration (n = 7 PV-Cre mice) or anesthetized (n = 25 PV-Cre mice and 26 WT mice) with urethane (1.7g/kg, IP) and a complement of ketamine/xylazine (respectively 6.6 and 0.66mg/kg, IM, repeated whenever necessary, usually every 30 to 60min) and kept on a thermal blanket (Physitemp) to maintain their body temperature at 37.5°C. Animals were fixed in the stereotaxic apparatus (David Kopf instrument), the craniotomy was performed, the dura was gently removed, and a multi-site silicon probe (Neuronexus Technologies, either A1x32-Poly3-5mm-25 s-177, 32 channels arranged on a single shank as 3 rows of vertically arranged staggered recording sites, vertical separation 25μm, or Buzsaki16, 2 shanks separated by 200 μm, 8 recording sites each separated by 10-20μm), covered with DiI (Molecular Probes) for post hoc verification of electrode position, was inserted vertically through the neocortex until the pyramidal layer of the CA3a hippocampal region. The stratum pyramidale was recognized by the presence of multiple firing cells and fIPSPs, and confirmed with the post hoc identification of DiI labeling. Recordings were performed using either Lynx-8 amplifiers (Neuralynx, gain x1000, bandpass filter 0.1Hz to 9KHz) and a digitizer (United Electronics, 14bits, A/D Gain x2, sampling rate 20KHz) controlled by a custom-made LabView (v7.1, National Instruments) program, or an integrated Digital-Lynx SX system (Neuralynx, Cheetah v5.0 software, 24bits, sampling rate 32KHz, bandpass 0.1Hz to 9KHz and range ± 5mV for LFP analysis, as well as bandpass 1Hz to 9KHz and range ± 1mV for spike sorting), and stored on a PC for offline analysis. The pyramidal layer was recognized electrophysiologically by the typical presence of fIPSPs and multi-unit firing. The recording started approximately 30 minutes after the insertion of the probe. Urethane was purchased from Sigma-Aldrich, ketamine (Imalgene 1000) from Merial and xylazine (Rompun 2%) from Bayer.

Histological processing

At the end of the recording session, the animal was transcardially perfused with 4% paraformaldehyde. Coronal sections (60μm-thick, cut using a VT1000S Leica vibratome) were blocked in 5% Bovine Serum Albumin (BSA) and 0,25% Triton X-100. After Tris-buffered saline washes, sections were incubated overnight at 4°C in 1% BSA, 0,25% Triton X-100 with mouse primary antibody against parvalbumin (1:200, Sigma-Aldrich Co., St Luis, MO) and rabbit antibody against GFP conjugated to Alexa Fluor 488 (1:2000, Thermo Fisher). After Tris-buffered saline washes, sections were then incubated with 1% BSA, 0,25% Triton X-100 and Alexa Fluor 647 conjugated goat antibody to mouse (1:500, Thermo-Fisher) 4h at room temperature. After Tris-buffered saline washes, sections incubated 10 minutes with DAPI (1:1000 Sigma-Aldrich Co., St Luis, and MO) at room temperature. After washing, sections were mounted and coverslipped on slides. Confocal stack images from the CA3a hippocampal region were acquired and visualized with the ImageJ software. The number of GFP and PV-immunopositive cell bodies was counted on the stacks with the IMARIS software (Oxford instruments). To quantify co-localization, individual GFP labeled interneurons were identified and subsequently scored for PV immunoreactivity. Scans from each sample were collected in 3 slices per animal (n = 3 ChR2 injected and 3 PSAM-GlyR injected PV-Cre mice).

QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

Data were visualized and processed using NeuroScope and NDManager from the Neurosuite software (Hazan et al., 2006) (http://neurosuite.sourceforge.net), and analyzed using Excel (Microsoft Office 2013), Origin (OriginLab, Northampton, MA) and MATLAB (MathWorks) built-in or custom-built procedures.

Spike sorting

The spikes were detected and extracted (SpikeDetekt), automatically clustered (KlustaKwik), and the resulting clusters manually verified and refined (KlustaViewa) using the KlustaSuite software (Rossant et al., 2016) (https://www.ucl.ac.uk/cortexlab/). Beside multi-unit activity (MUA), only the clusters with a clear refractory period and typical bursting pattern of putative pyramidal cells were included in the analysis of neuronal firing (and referred to as pyramidal cells).

Event detection

The fIPSPs were detected with the MiniAnalysis software (6.0.3 Synaptosoft Inc.) from the raw signal using the following parameters (manually adjusted within the indicated ranges []): amplitude (μV), min = 100, rise time (ms), min = 1, max = [4 10], decay (ms), min = [1 2], max = [6 10], halfwidth (ms) min = [1 2], max = [6 10], and decay10-90-slope (μV/ms), min = 25, max = [500 1500]. In results, the

value taken for rise time is the time to peak (latency from onset to peak) while the decay time constant is the constant value of the exponential curve best fitting the decay of the event. Epileptiform events (inter-ictal spikes) were identified with MiniAnalysis as events of positive polarity and larger than 5 times the average amplitude of the detected fIPSPs. All detected events were verified by visual inspection.

Reliability of fIPSP detection

To evaluate the reliability of fIPSP detection in the context of *in vivo* neuronal dynamics requires ground truth information about the actual occurrence of perisomatic GABAergic events. From the postsynaptic responses (unitary field-potentials) to the optogenetic stimulation of PV interneurons (in which the ground truth is that of laser activation, n = 100 events from each animal), we could estimate the proportions of evoked fIPSPs that have been successfully detected (true positives) versus those that have failed to be detected (false negatives). Beside a shift in the distribution of fIPSP amplitudes, a drop in the apparent success rate of evoked fIPSPs may also reveal the potential expression of "invisible" or undetectable fIPSPs due to reversed Cl^- gradient in a subset of cells canceling the field response of other cells. The success rate of fIPSP detection in response to the optogenetic activation of PV interneurons (i.e. the proportion of optogenetic stimulations resulting in a detected fIPSP) in head-fixed mice was 76.7 ± 10.4% in control (n = 3 mice) and 91 ± 1.7% in the presence of the glutamatergic blockers APV and DNQX (n = 3 mice), and did not differ between control and KA-treated mice (respectively 74 ± 9.6%, n = 5 mice, and 76 ± 12.5%, n = 9 mice, $t(12) = -0.26$, $p = 0.79$). Manual examination of the optogenetic stimulations which produced an undetected fIPSP (i.e. evoked fIPSPs missed by the detection algorithm, for example due to subthreshold amplitude) indicate that the proportion of false negatives in head fixed mice was 5 ± 2% in control (n = 3 mice) and 2.3 ± 0.6% in APV+NBQX (n = 3 mice), and did not differ between control and KA-treated mice (respectively 2.8 ± 0.8%, n = 5 mice and 3.6 ± 1.3%, n = 9 mice). The amplitude threshold for detection was set as to prevent artifactual detections (i.e. detected events that are not actual fIPSPs). Accordingly, there were no false positives (i.e. fIPSP detection in absence of an actual fIPSP) among optogenetically evoked fIPSPs in any of the conditions. From these results, we can estimate that the reliability of our detection algorithm is between 95 and 98% (i.e. 95 to 98% of emitted fIPSPs are properly captured with our detection parameters), and that the reliability of the fIPSP approach (i.e. the emission of a fIPSP in response to the stimulation of PV interneurons, that can be detected either automatically or manually) is between 82 (in control) and 93% (in APV+NBQX) in head fixed mice, and does not differ between control and KA-treated mice (respectively 76.8 and 79.6%). In fact, this quantitative assessment is an underestimate of the actual reliability of postsynaptic fIPSP detection, because the absence of evoked fIPSP in response to the optogenetic stimulation of PV interneurons may also be due to presynaptic factors (e.g. occasional failure to evoke spike firing or GABA release from interneurons stimulated at sub-maximal intensity).

Effects of perisomatic GABAergic events

Peri-event time histograms display the time-distributions of neuronal activity relative to fIPSPs detected from the same electrode/shank. The number of spikes was counted within time-bins of 1ms around reference events (either fIPSP-peak or optogenetic light-stimulation onset), and normalized by the total number of spikes within the histogram. Baseline activity was computed as the mean (and SD) of values between −50 and −30ms. Putative monosynaptic excitatory and inhibitory interactions were assessed from the distribution of action potentials (Csicsvari et al., 1998; Bartho et al., 2004). Pyramidal cells were considered as inhibited by fIPSP-associated events if their firing rate decreased and remained below that of [baseline - 2SD] from 0 to at least 4ms after fIPSP-peak. The strength of inhibition was then quantified as the percentage of firing inhibition (relative to baseline) in the inhibitory trough (bin of minimum firing in the 4ms post-fIPSPs), and the duration of recovery as the latency to the last of post-fIPSPs time-bin below [baseline - 2SD]. Only cells with [baseline - 2SD] > 0 were considered to have high and stable enough firing for the possible detection of potential fIPSP-associated inhibition. Pyramidal cells were considered as excited by fIPSP-associated events if their firing rate increased above [baseline + 3SD] within 4ms after fIPSP-peak. Because bursts of action potentials (short interspike intervals) which first spike would evoke a fIPSP would potentially produce a spurious post-fIPSP peak in the peri-event histogram that may be wrongly interpreted as pyramidal cell excitation, we also computed the peri-event histograms of putatively excited pyramidal cells excluding all the spikes preceded by an action potential by less than 10ms. The post-fIPSP peak-firing was still present in all the tested putatively excited pyramidal cells, excluding the contribution of misinterpretation due to burst firing. Pyramidal cells were considered as non-responding if they were neither inhibited nor excited by fIPSP-associated events. In the quantification of the proportion of non-responding pyramidal cells in KA-treated mice, we included only the animals with at least 8 pyramidal neurons with enough spikes for peri-event time histograms (i.e. [baseline - 2SD] > 0).

Theta phase-locking

The phase histograms illustrated in Figure 6B represent the distribution of fIPSPs relative to theta phase. For the determination of theta periods, the raw EEG integrated power was calculated in the 3.5-10Hz (theta) and 1-3Hz (delta) frequency bands using the multi-taper method (1 s time window and 4 tapers) implemented in the Chronux MATLAB toolbox (Mitra and Bokil, 2008). Theta periods were defined as theta/delta power above 3 and validated manually using the Sonic Visualizer free software. Among the 18 control and 23 KA-treated anesthetized mice recorded, only n = 9 control and 8 KA-treated mice expressed reliable theta oscillations, and were thus included in theta-phase modulation analysis. Theta phase was computed in theta periods using the Hilbert transform on the CA3 pyramidale band-pass filtered (4-11 Hz) LFP (downsampled data, 1250Hz). Phase modulation of fIPSPs relative to

theta oscillations was tested on individual animals by using the Rayleigh test (nonuniformity of the circular distribution). When phase modulation was significant ($p < 0.05$), von Mises parameters μ and κ were estimated via maximum likelihood as indices of preferred phase and modulation strength, respectively (Berens, 2009).

Statistics

All statistical analyses were performed in MATLAB (MathWorks) or Origin (OriginLab). Statistical details (statistical test used, exact value of n and whether it represents events or animals, etc...) are provided in the main text for each quantified analysis. Data were systematically tested for normal distribution with the Shapiro test. Data following a normal distribution were analyzed using parametric tests (Student's t test or ANOVA and post hoc Bonferroni's test). Data which did not follow a normal distribution were analyzed using nonparametric tests (Mann–Whitney U-test for independent datasets and Wilcoxon signed-ranks test for paired data). Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$. Unless indicated otherwise, all results are presented as mean ± SEM.

Cell Reports, Volume *36*

Supplemental information

Probing the polarity of spontaneous perisomatic GABAergic synaptic transmission in the mouse CA3 circuit *in vivo*

Olivier Dubanet, Arnaldo Ferreira Gomes Da Silva, Andreas Frick, Hajime Hirase, Anna Beyeler, and Xavier Leinekugel

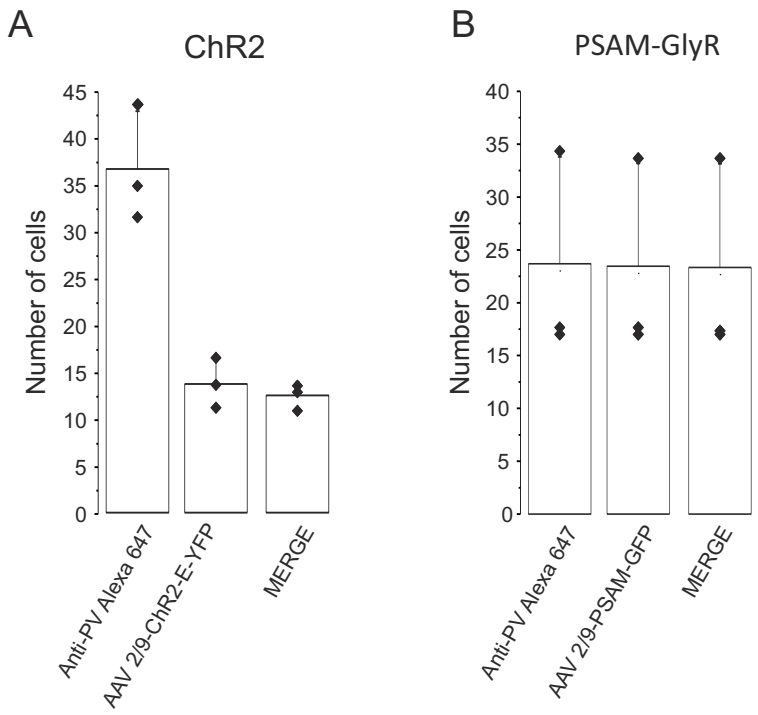


Figure S1: **Immuno-histological control of ChR2 and PSAM-GlyR expression in PV interneurons. Related to Figures 2 and 3.**
(A) Summary plot (mean ± SD, n=3 mice) of the number of cells immuno-positive for PV (anti-PV Alexa 647), for ChR2 E-YFP, or for both (merge). Note that only a fraction of PV cells express ChR2 but that virtually all cells expressing ChR2 are PV cells, indicative of high specificity of ChR2 expression for PV cells.
(B) Summary plot (mean ± SD, n=3 mice) of the number of cells immuno-positive for PV (anti-PV Alexa 647), for PSAM-GlyR-GFP, or for both (merge). Note that almost all PV cells also express PSAM-GlyR and that virtually all cells expressing PSAM-GlyR are PV cells, indicating high specificity and high coverage of infection for PV cells.

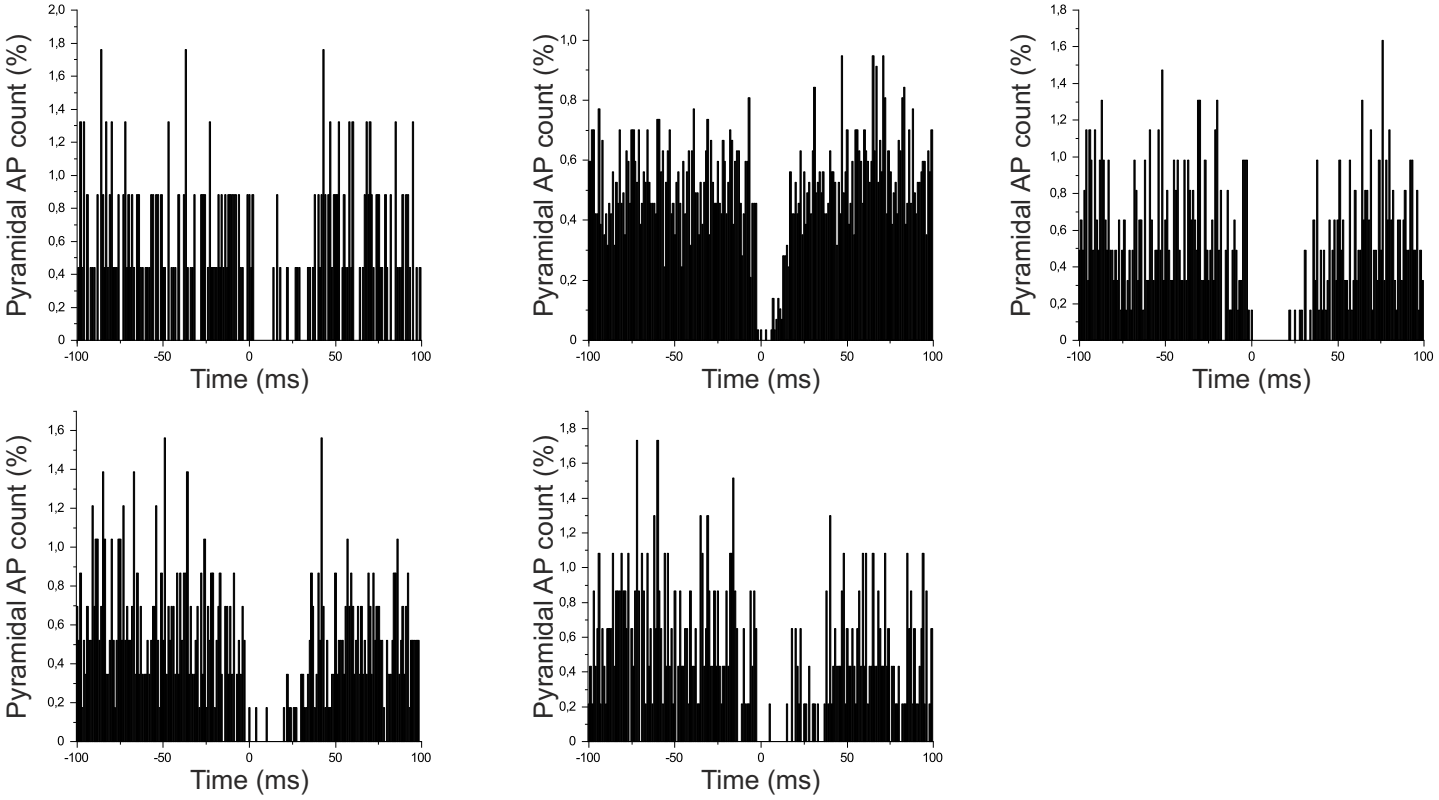


Figure S2: Time-locked inhibition of pyramidal cell firing in response to the optogenetic activation of PV-interneurons. Related to Figure 2.

Peri-event time histograms (time bin 1 ms) between all the spikes discharged by putative pyramidal cells and optogenetically evoked fIPSPs (reference) for each individual animal included in Figure 2f (n=5 mice).

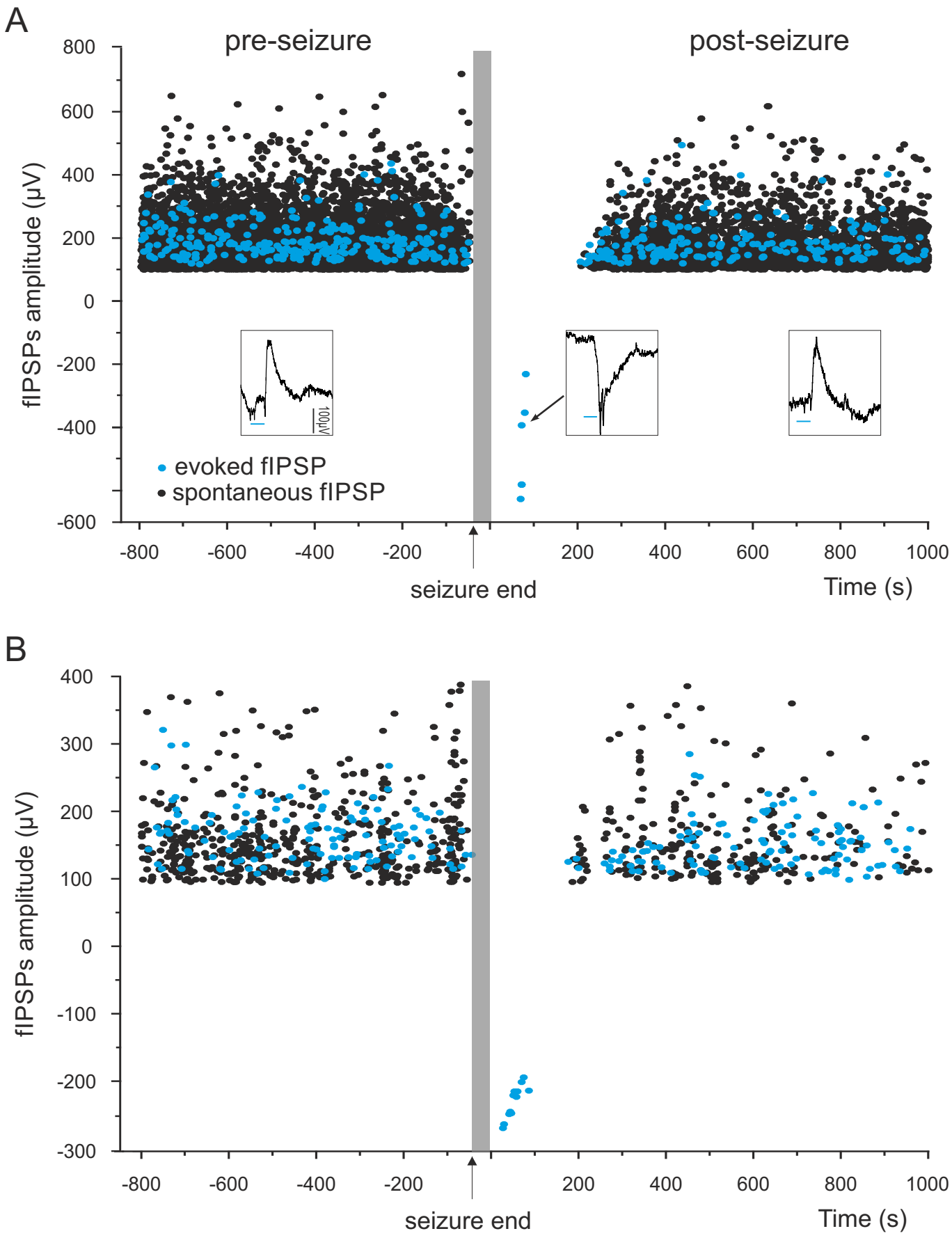


Figure S3: Transiently reversed fIPSPs and perisomatic GABAergic synaptic transmission following acute seizures in individual cases. Related to Figure 4.

(**A**) Time course of individual fIPSPs amplitude (**black dots**, spontaneous, **blue dots**, evoked by optogenetic activation of PV interneurons, stimulation 2ms every 2s without interruption throughout the recording), relative to acute seizures induced by the contralateral injection of bicuculline (**vertical grey bar**, 3 seizures from the same animal, aligned by their ending time). **Insets**, representative individual field responses (optogenetically evoked fIPSPs; **horizontal blue bars**, laser ON, vertical scale bar 100µV) in control (**pre-seizure**), during the period right after the seizure (reversed polarity), or after recovery (**post-seizure**). (**B**) Same as in (**A**) for a single seizure from another animal.

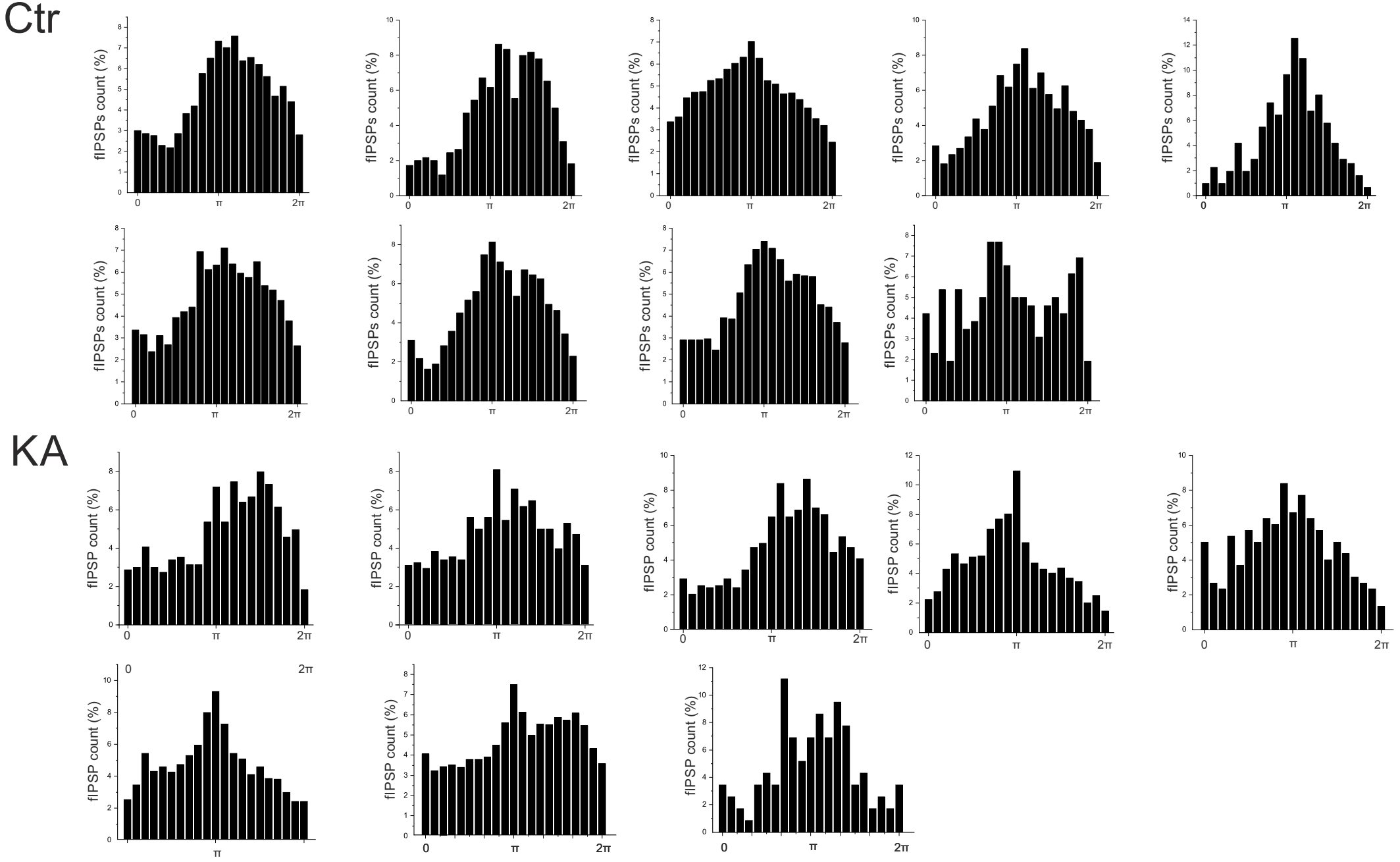
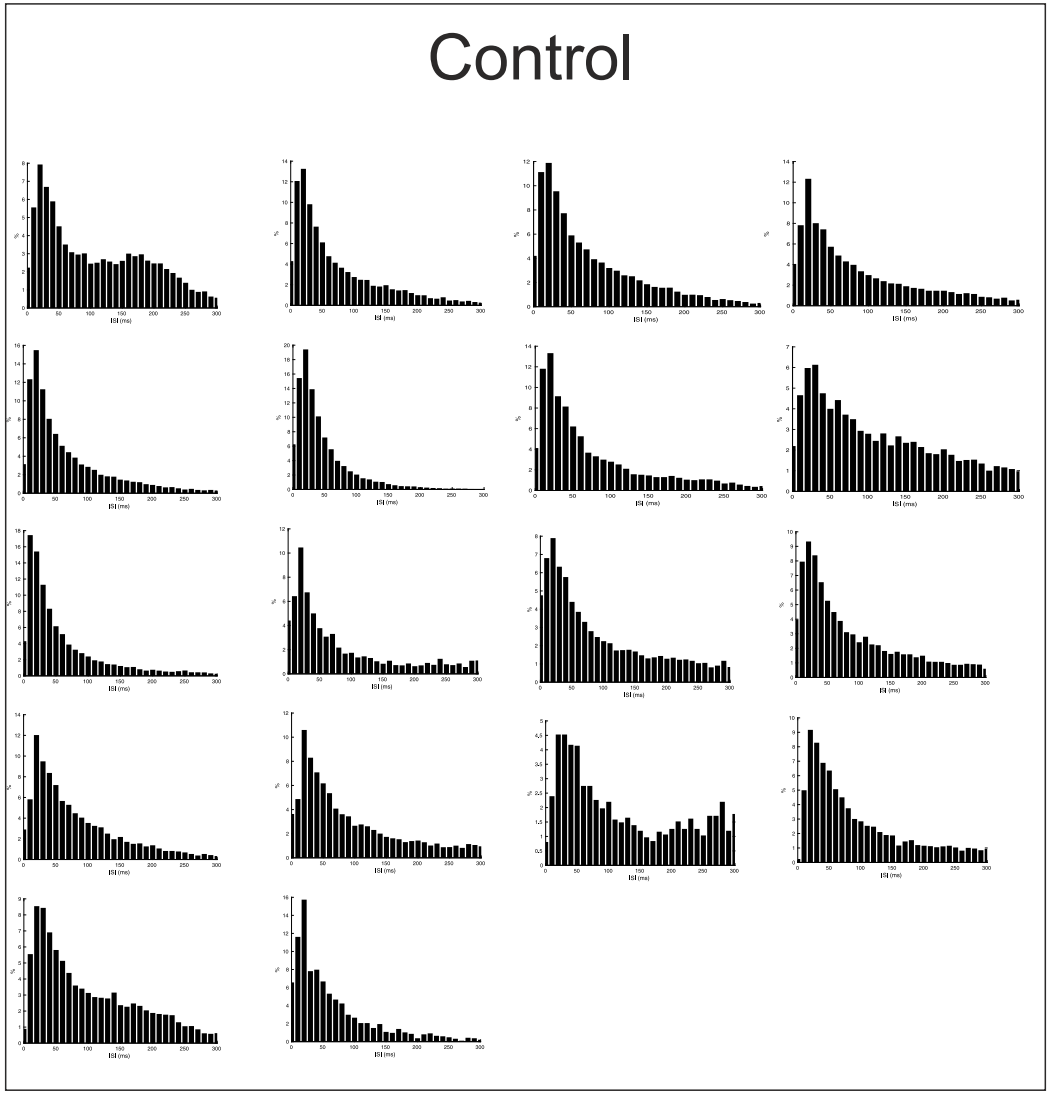


Figure S4: Theta-phase distributions of fIPSPs in control and in KA-teated mice. Related to Figure 6.
Theta-phase distributions of fIPSPs (normalized fIPSP count, %) for each individual animal of Figure 6b (n = 9 control mice and 8 KA-treated mice expressing reliable theta oscillations).



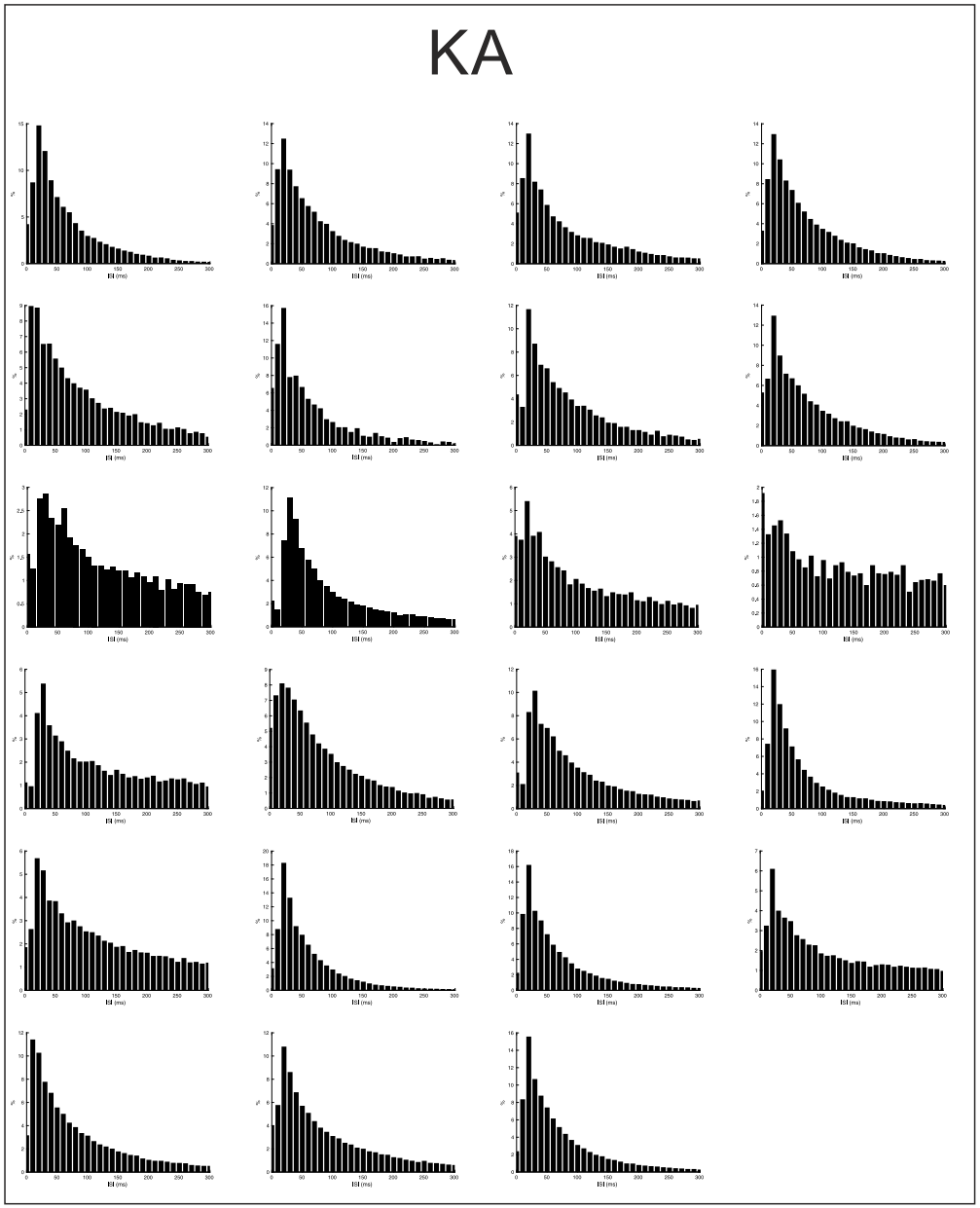


Figure S5: Inter-event (fIPSPs) time interval distributions. Related to Figure 6.
Inter-event (fIPSPs) time interval distributions (normalized fIPSP count, %), for each anesthetized animal of Figure 6c (control, n = 18 mice, KA-treated, n= 23mice).

II- Article 2 :

Detecting fine and elaborate movements with piezo sensors provides non-invasive access to overlooked behavioral components (Carreño-Muñoz et al., 2021, Neuropsychopharmacology)

Résumé :

Divers dispositifs de phénotypage comportemental ont permis avec succès de construire des éthogrammes, mais de nombreux aspects du comportement sont restés hors de leur portée. Nous présentons ici un nouveau dispositif, qui consiste en une plateforme reposant sur des capteurs de pression piézoélectriques (électromécaniques) très sensibles avec lesquels nous avons pu détecter les moindres mouvements (jusqu'aux battements cardiaques individuels pendant les phases de repos) de rongeurs se déplaçant librement. La combinaison avec des enregistrements vidéo et une analyse du signal basée sur la décomposition temps-fréquence et des algorithmes d'apprentissage automatique ont permis d'accéder à des composantes comportementales jusqu'alors négligées, et ce de manière totalement non invasive. Ainsi, la détection de tremblements fournit une détection inédite des réactions de peur, distincte mais complémentaire du freezing qui est la méthode de référence dans pratiquement tous les laboratoires. L'analyse de la dynamique de la force des impulsions motrices mises en jeu dans la locomotion et diverses formes de toilettage nous a permis d'identifier des altérations spécifiques de la démarche et divers traits comportementaux constituant des phénotypes pathologiques neurodéveloppementaux. Nous pensons que ce dispositif représente un réel progrès par rapport aux systèmes existants, et offre de nouvelles opportunités pour l'avancée tant attendu du domaine du phénotypage comportemental.

American College of Neuropsychopharmacology

www.nature.com/npp

ARTICLE

Check for updates

Detecting fine and elaborate movements with piezo sensors provides non-invasive access to overlooked behavioral components

Maria Isabel Carreño-Muñoz[1,5], Maria Carmen Medrano[1,5], Arnaldo Ferreira Gomes Da Silva[2], Christian Gestreau[2], Clément Menuet[2], Thomas Leinekugel[1], Maelys Bompart[1], Fabienne Martins[1], Enejda Subashi[1], Franck Aby[3], Andreas Frick[1], Marc Landry[3], Manuel Grana[4] and Xavier Leinekugel[1,2]✉

© The Author(s), under exclusive licence to American College of Neuropsychopharmacology 2021

Behavioral phenotyping devices have been successfully used to build ethograms, but many aspects of behavior remain out of reach of available phenotyping systems. We now report on a novel device, which consists in an open-field platform resting on highly sensitive piezoelectric (electromechanical) pressure-sensors, with which we could detect the slightest movements (up to individual heart beats during rest) from freely moving rats and mice. The combination with video recordings and signal analysis based on time-frequency decomposition, clustering, and machine learning algorithms provided non-invasive access to previously overlooked behavioral components. The detection of shaking/shivering provided an original readout of fear, distinct from but complementary to behavioral freezing. Analyzing the dynamics of momentum in locomotion and grooming allowed to identify the signature of gait and neurodevelopmental pathological phenotypes. We believe that this device represents a significant progress and offers new opportunities for the awaited advance of behavioral phenotyping.

Neuropsychopharmacology; https://doi.org/10.1038/s41386-021-01217-w

INTRODUCTION

With the advent of molecular genetics and techniques allowing to manipulate neuronal physiology with unprecedented versatility and precision, the number of animal models is growing considerably, supporting a renewed interest for integrative physiology and behavioral phenotyping. However, the presumably limited introspection and language capabilities of laboratory animals promote the need for designing sophisticated behavioral readout of internal cognitive states.

The extent of the behavioral repertoire we can identify largely depends on the technologies available for the acquisition of relevant biological information. In line with pioneering investigation of coordinated sniffing, whisking, and nose and head movements in the rat using frame-by-frame manual analysis of video recordings [1], the development of video hardware and image processing algorithms sustains fast progress in behavioral phenotyping. Recent examples include 2D [2–4] and 3D [5, 6] video acquisition, which combined with machine learning algorithms allowed to identify a number of basic postures and dynamics of spontaneous behavior [2–4, 6–8], providing a new vision of the ethogram at the sub-second timescale [6]. Simultaneous video recordings from several angles, including through a transparent floor plate, could successfully identify the positions of the paws and other body parts, providing detailed information about the dynamic coordination of paws and body movement during locomotion [3, 4, 9–11]. However, most (if not all) internal movements underlying behavior, such as heartbeat, shivering, or the dynamics of momentum during locomotion, remain out of reach from purely visual inspection. Electromyogram or electrocardiogram, as all invasive approaches, are likely to seriously interfere with spontaneous behavior. Piezoelectric technology however offers sensors of exquisite sensitivity, which positioned below the floor plate can be used to collect the dynamics of movement with very high temporal precision in a totally non-invasive manner [12, 13]. Plates resting on piezo sensors or accelerometers have successfully been used to build automated ethograms, distinguishing various behaviors such as sleep, rest, grooming, etc… [9, 14–18]. But none of them provides detailed and quantified information about the precise dynamics and forces involved in single movements during spontaneous, ongoing behavior. We now report on a novel device, the Phenotypix, which consists in an open-field platform resting on highly sensitive piezoelectric (electromechanical) pressure-sensors. The combination of such electromechanical (EM) acquisition with video recordings and signal analysis based on time-frequency decomposition, clustering, and machine learning algorithms, allowed us to automatically or semi-automatically detect and quantify various behavioral components with high accuracy, such as individual heartbeats and breathing cycles during rest, shaking in response to fear,

[1]Université de Bordeaux, INSERM, Neurocentre Magendie, Bordeaux, France. [2]INMED, INSERM, Aix Marseille University, Marseille, France. [3]IINS, CNRS, Bordeaux, France. [4]Facultad de Informatica, University of the Basque Country UPV/EHU, Donostia-San Sebastian, Spain. [5]These authors contributed equally: Maria Isabel Carreño-Muñoz, Maria Carmen Medrano. ✉email: xavier@arcadi.eu

Received: 13 January 2021 Revised: 13 October 2021 Accepted: 16 October 2021
Published online: 11 November 2021

and the dynamics of balance within individual footsteps during spontaneous locomotion. We believe that this novel device represents a significant progress and offers new opportunities for the awaited advance of behavioral phenotyping.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Adult (age 2–4 months) male rats and mice of different strains were recorded:

2 Sprague–Dawley OFA adult rats, recorded during resting immobility and sleep

51 adult wild-type mice (23 3xTg-AD-WT, 12 C57B1-6J, 16 FMR1-WT), including 31 recorded in control condition, 10 after exposure to fearful conditions, 7 after pre-treatment with Diazepam, and 3 after local injection of CFA in a rear paw

5 transgenic mice of the Ts65Dn line, a mouse model of Down Syndrome [19]

11 transgenic *Fmr1*-KO mice (including 7 for grooming quantification and 5 for heart-beat monitoring, in control and after injection of BMS-204352), deficient for both FMR1 RNA and FMR Protein, a model of Fragile-X Syndrome [20].

For validation purposes, invasive electrophysiological recordings were performed on an additional 2 rats and 2 mice (age 2–4 months), equipped with electrode-wires implanted against the diaphragm (to collect ECG and EMG) and accelerometers (XYZ) on top of the head (to collect head movement), and recorded on the Phenotypix (to collect EM signal and synchronous video), in freely moving conditions. These recordings are described in detail in Supplementary Methods, and illustrated in Fig. 3 and supplementary Figs. S1, S2, S4, and S5.

The BKCa agonist BMS-204352 (Tocris, 2 mg per kg of body weight, IP), was dissolved in 0.9% NaCl, 1.25% DMSO, 1.25% Tween-80, 10 ml per kg of body weight), as in prior studies using BMS-204352 [21, 22].

All animals were bred in the laboratory animal facility in collective cages, and transferred to individual cages for the duration of the experiments. Animals were kept on a 12 h/12 h light/dark cycle, provided with nesting material and food and water ad libitum. All experiments were performed during the light period under constant mild luminosity (60-70 Lux). All experimental procedures were performed in accordance with the EU directives regarding the protection of animals used for experimental and scientific purposes (86/609/EEC and 2010/63/EU), with the French law, and approved by the Ethical committee CEEA50 (saisines #15349, 15350, 10897, 50120156-A and 30823-2021033102337869 v2).

Behavioral data acquisition

The mice and rats were introduced individually onto the recording platform (Phenotypix, Roddata, Quinsac, France), a dimly illuminated open-field environment (45 x 35cm), surrounded by 60-cm-high walls and equipped with video monitoring. The epoxy floor-plate and the walls were sprayed and wiped clean with 70% ethanol before the introduction of each animal. Spontaneous behavior was recorded continuously for durations ranging from 5 min to 3 h. In this system, the floor plate is resting on three evenly distributed (as a triangle) piezoelectric pressure sensors, all connected together to a single charge amplifier (hence receiving the sum of the signals from the three sensors), providing a continuous voltage analog signal (bandpass 0.1 Hz–9 KHz) proportional to the pressure exerted on the sensors underlying the floor plate, so that any subtle changes in floor-plate pressure due to animal movement could readily be detected. Unlike other existing phenotyping systems based on analyzing the vibrational pattern of the floor-plate to identify ongoing behavior [14, 18], the Phenotypix rather collects the minute pressure changes resulting from individual animal movements, which requires optimal signal preservation and was achieved by minimizing dampening and resonance. For this purpose, the platform laid on an antivibration table (TMC, CleanBench Laboratory, Peabody, MA, USA), made of a plain stainless steel table top (weight about 150 kg) resting on Gimbal Pistons using air pressure to keep the table top above a heavy (~100 kg) 4-legs frame. Lighter isolation platforms with pneumatic isolators (Newport Benchtop, Irvine, CA, USA) did not prove efficient enough to preserve the pressure-derived signal from vibrations, and the performance of the Phenotypix were seriously degraded. Recordings were always made with a single animal at a time to prevent interference between signals from multiple animals. Video signal was acquired at a sample rate of 25 frames/s with a webcam placed 1 m above the platform, and the electromechanical signal was recorded continuously at a sampling rate of 20 kHz. Both signals were acquired synchronously using a Power1401 digitizer and Spike2 software (CED, Cambridge, UK) and stored on a PC for offline analysis with EthoVision XT software (Noldus, Wageningen, the Netherlands) and custom-made matlab scripts (Mathworks, Natik, MA, USA).

EEG recording in freely moving rats

Rats were deeply anesthetized with isoflurane (2–5%) and implanted with individual 50-µm-diameter insulated tungsten-wires connected to an Omnetics connector fixed to the cranial bone with dental cement. For EEG recordings, the electrodes were placed within the hippocampus under EEG monitoring, at the following coordinates (Paxinos atlas): AP −3.3, L 2.5, V −2.5 to −2.8. The skin was put back on the skull and maintained with surgical glue (Gluture, WPI, Sarasota, FL, USA). Before recording, the animals were kept under daily monitoring for 1 week for healing and recovery. For recording, the animal was plugged to the recording system (L8 amplifiers, Neuralynx, Bozeman, MT, USA) with a tethered headstage (HS-16, Neuralynx), and the wide band (0.1Hz-9kHz) digitized signal continuously recorded with CED-Spike2 (in synchrony with the behavioral data) and stored on PC for offline analysis.

Fear conditioning

On day 1, WT mice were transferred from their housing room to the recording room for a fear conditioning session. After a 5 min acclimation period to the conditioning chamber, 5 trials (intertrial interval 5–10 min) were performed, each consisting of 10 intermittent white tones (80 dB, 500 ms duration separated by 1 s), the last five of which paired with electrical footshocks (duration 1 ms each, intensity 0.075J, delivered through a metallic floor mesh, Ugo Basile). The mice were brought back to their housing room after the conditioning session. On day 2, the mice were tested for contextual fear by being inserted in the recording chamber (different from the conditioning chamber but in the same experimental room with the same contextual configuration) for 15 min of free exploration after which 3 series of tones (conditioned stimulus, CS) were presented.

Exposure to predator

Individual WT mice could freely explore the recording chamber of the Phenotypix for 1 h. On the next day, they were placed again in the recording chamber, from which one of the arena walls had been removed and replaced by a cage containing an adult Sprague–Dawley rat, with a grid separating the rat (separated compartment, not in contact with the piezo sensors) from the mouse (placed on the Phenotypix platform). The spontaneous behavior of the mouse was recorded during 15 min.

Data analysis

The piezosensor-derived signal was first explored visually together with the video for identification of spontaneous behaviors. For monitoring of fast behavioral events (e.g. paw movements during grooming), the video (and synchronized EM trace) was replayed frame-by-frame (cf. Fig. 1). After visualization of the raw data, manual tagging of the different behaviors was performed by a trained expert, using Spike2 software. For further processing, the EM raw data was downsampled from 20KHz to 1250 Hz using ndmanager plugins [23]. Sonic Visualizer software was used to explore visually the time-frequency domain of the piezo derived-signal. Running and immobility periods were selected based on the animal velocity, calculated from the XY coordinates obtained through offline automatic animal tracking with Ethovision XT software (Noldus).

Grooming momentum was quantified automatically using custom matlab scripts, on manually selected periods (i.e. momentum quantification was automatic, but the periods of grooming behavior were manually identified from the video), as the peak-to-through amplitude of each body movement-related EM-signal deflection.

Breathing and heartbeat-related movements were identified in the EM signal based on their shape, kinetics and frequency of occurrence, either manually or using MiniAnalysis software (Synaptosoft, Decatur, GA), during manually determined and carefully selected periods of immobility presenting the highest and clearest signal-to-noise ratio for series of at least 20 consecutive events for heartbeat, 10 for breathing. For validation purposes, the EM signal time tags were compared to those independently

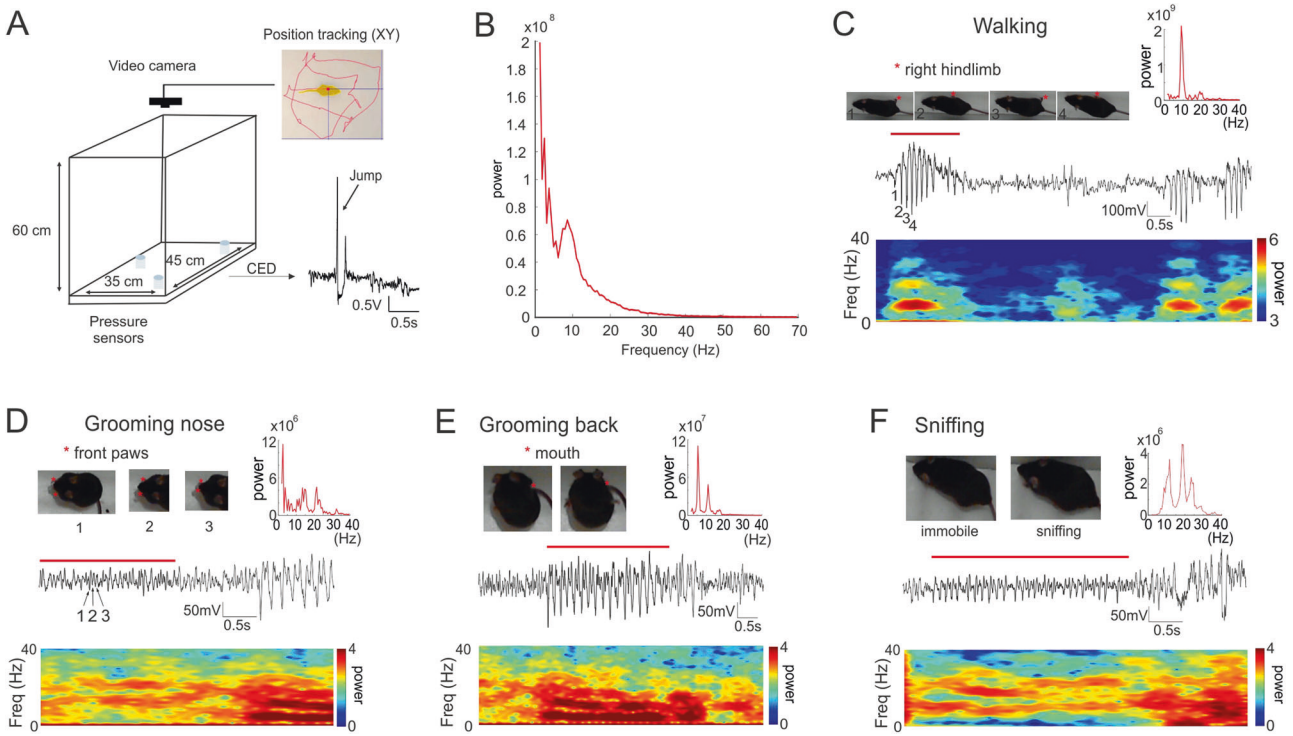


Fig. 1 Pressure-sensor-derived monitoring of various body movements with the Phenotypix system. The Phenotypix system is an open-field platform lying on pressure sensors allowing to detect various body movements of a freely moving rat or mouse with high sensitivity and fine time resolution. The video signal (25 frames per second) is recorded simultaneously with the digitized (20 kHz) electromechanical signal from the pressure sensors, allowing synchronized offline replay for analysis. **A** Schema of the Phenotypix acquisition system and the sensor-derived electromechanical (EM) signal elicited by a jumping mouse. Example tracking of the mouse with Noldus Ethovision software: yellow shape, detected mouse; red dot, central body point; vertical and horizontal blue lines, XY coordinates; red curve, mouse trajectory. **B** Spectral composition (power spectral density) of the EM signal recorded during 1 h of free open-field exploration. **C**–**F** Typical EM signal generated by different behaviors (within manually identified behavioral periods). Each trace is shown with the corresponding time-frequency spectrogram. Time of occurence of specific behaviors (**C**, locomotion >13 cm/s; **D**, nose grooming, each cycle of front paw movement appears as a separate deflection in the mechanical signal; **E**, grooming of the back; **F**, sniffing, each deflection corresponds to an individual nose-movement) is indicated with an horizontal red line, illustrated with pictures taken from the video signal, and decomposed as power spectral density (PSD). Note the main component around 10 Hz (and presumed harmonics in the 20–30 Hz range) during active behavior.

obtained by an expert observer, blind to the EM signal tags, from diaphram-EMG or video signals (see Figs. 3 and S4).

Shaking detection was done only during periods of immobility (speed <2.5 cm/s during a least 1 s). Automatic detection of shaking events was performed as threshold crossing on the bandpass filtered (65–130 Hz), squared and normalized signal. Automatic detection of freezing events was performed as threshold crossing on the 5–130 Hz bandpass filtered, squared and normalized EM signal. The thresholds for event detection were adjusted manually for each recording, and the outcome of the detection verified manually using Neuroscope visualization software [23]. Signal decomposition (Fourier Analysis) and quantification were performed using custom matlab (The Mathworks) code, available upon request.

The dynamics of locomotion were investigated within a similar speed range in WT and DS mice, during periods of intermediate running speed selected from Noldus Ethovision XY coordinates by a custom written matlab script, between 13 and 30 cm/s for a minimum duration of 700 ms. The corresponding EM signal, downsampled to 1250 Hz, was extracted using a sliding window of 800 samples. In order to discriminate between the features of locomotion signal issued from control vs CFA treated animals, we have used Support Vector Machine (SVM). The regression coefficients obtained from an autoregressive model [24] of order p were used as input features for k-means clustering [25]. We next identified "pure" clusters, containing samples from only either CFA or control mice, and performed on this sub-dataset a classification process using a linear support vector machine (SVM) [26] approach. In order to find the largest feature dataset with the highest classification performance, we conducted a grid search on the following parameters: AR order (p), window size (w), and number of clusters (k) maximizing an objective function defined by the product of the feature dataset size and the classification performance measured by *F*-score [27]. From the feature dataset maximizing the objective function we retrieved the corresponding signal windows, merging them to obtain the signal chunks where discrimination had been detected. Finally, we carried out the extraction of manually defined descriptive features on these signal chunks, which showed significant differences. Moreover, predictive SVM models were built by crossvalidation experiments using distinct data sets for training and testing, ensuring that there is no double dipping effect [28] in the estimation of the classification performance. Our 10-fold crossvalidation experiments in which the dataset was split into 10 equal subsets, each alternatively used as test-set while the remaining 9 subsets were used for training the linear SVM model, produced an *F*-score of 0.80 (data not shown), which is well above random choice classification.

Because visual inspection of the signal chunks identified by the discriminating clusters guided our attention towards the amplitude and time course of the EM signature of individual footsteps, we have performed an automatic, systematic quantification of amplitude and half width of all footsteps emitted by control and CFA mice during locomotion at comparable running speed (Fig. 5B, C). Periods of locomotion were selected during which the animal was moving between 13 and 30 cm/s without interruption and reaching at least 20 cm/s. Individual footsteps were identified as consecutive suprathreshold peak-trough-peak sequences from the EM signal, bandpass filtered at various frequencies using zero-phase distortion filters (i.e. filtering in the forward and backward direction to prevent phase-distortion). Peaks and troughs were detected as local extremas in the 0–300 Hz passband filtered EM-signal, within 50 ms of either the minima detected from the 0 to 50 Hz passband filtered signal (approximative troughs) or of the maxima detected from the 0 to 20 Hz passband filtered EM-signal (approximative peaks), respectively. Bandpass filtered 0–5 Hz signal was taken as baseline, and only local minima (troughs) of amplitude >1 SD from baseline were selected for further

footstep analysis. The amplitude of footsteps was measured as the difference between the trough and the mean of its pre- and post-peaks. The half-width was measured as the width at half amplitude.

Locomotion and gait were also analyzed at the more global level of footsteps dynamics (Fig. 5D–F) by comparing the envelopes of locomotion-related EM signal across conditions. Periods of locomotion were selected during which the animal was moving for at least 500 ms between 13 and 30 cm/s. The linear correlation coefficient between upper and lower envelopes was computed automatically for each locomotor period.

Statistics

Data processing was performed with custom-made scripts and functions from the Matlab statistics toolbox (Mathworks). Data were systematically tested for Normal distribution, either with the Lilliefors test, a modification of the Kolmogorov–Smirnov test recommended for small sample sizes [29], or with the Kolmogorov–Smirnov test for sample sizes >50. Homoscedasticity was assessed using the Levene's test. Data following Normal distributions and with homogenous variances were analyzed using parametric tests: ANOVA (F) with genotype or condition as factors (and post hoc Tukey test) for independent data sets, and Student's *t* test (t) for paired data. Data following non-normal distributions were analyzed using the non-parametric tests Kruskal–Wallis (X^2) for multiple groups comparisons (post hoc, Dunn–Sidak test) or Wilcoxon rank-sum test (z) for pairwise comparison of paired data. Results were considered significant for values of $p < 0.05$. Data are presented as mean ± SEM.

RESULTS

Resolution of individual movements during spontaneous behavior in the freely moving mouse

The behavioral phenotyping device (Phenotypix, Roddata, Bordeaux, France) was designed to transmit any pressure applied on the open-field platform (35x45cm) to the underlying piezoelectric sensors, with minimal dampening and resonance for a faithful transmission of any movement of the animal (see Online Methods section for details). The output signal of the piezoelectric sensors was recorded in synchrony with the video (cf. Fig. 1A), but at much higher sampling rate (20 kHz instead of 25 frames/s). The dynamics of animal movement can therefore be resolved with high temporal precision. As illustrated in Fig. 1B, frequency decomposition (power spectral density) of the electromechanical (EM) signal retracing the spontaneous behavior of a wild-type (WT) mouse during a 1 h open-field session suggests that animal movements are mostly expressed at frequencies between 0 and 10 Hz. A closer examination of specific behaviors such as walking, self grooming or sniffing (which periods were manually defined from the video) revealed that frequency decomposition of the signal indeed showed a common expression of main temporal dynamics around 10 Hz. Nevertheless, the signal amplitude and shape was different for each behavior, presumably resulting in signal harmonics in the 20–30 Hz range (Fig. 1C–F). Another interesting observation is that the high-frequency response of the device and sampling rate of the signal allowed to resolve individual movements within complex behaviors. As illustrated in Fig. 1C–F, frame-by-frame analysis of movements related to specific behaviors revealed that individual footsteps during locomotion, paw movements during self grooming of the nose, body twitches during grooming of the back, or coordinated head and nose movements during sniffing, could be identified and quantified, providing the time course and momentum of individual movements within complex behaviors. As a first result of interest, these observations suggest that most common behavioral motor components share the same frequency range, from 5 to 15 Hz. We hypothesize that this frequency range may be a common tuning of a variety of neuronal networks involved in the control of voluntary movement. The second interest of these results is that the resolution of the EM-signal might be used in future studies as a complement to video data to improve the automatic detection of behavior and to build ethograms with much improved precision compared to existing systems [9, 14–18]. An example is provided in the last section of results, using a combination of video data, time-frequency decomposition of the EM-signal and machine learning algorithms for the automatic detection of limp during locomotion. But in addition to behavior detection, one information readily obtained from the EM signal and most likely out of reach of visual inspection, is the strength (momentum) or amplitude of individual movements. This may be of interest in specific applications such as the experimental study of self grooming behavior.

Quantification of grooming movement

Recent work suggests that *Fmr1*-KO mice, a model of Fragile-X syndrome related with Autism Spectrum Disorders (ASD), express subtle changes in grooming behavior as a sign of stress when exposed to a novel environment [30]. Altered grooming might be related with deficits in motor coordination [31]. On the other hand, some ASD patients express scratching with excessive strength, even sometimes resulting in self injury [32]. This aspect would be interesting to investigate in animal models, but the available phenotyping devices do not offer, to our knowledge, the possibility to easily quantify grooming movement strength/amplitude (momentum) and frequency. Even though movement frequency and amplitude (e.g. the 3D trajectories of individual paws) can be investigated from video recordings using proper machine learning algorithms [33], movement strength/momentum still remains out of reach of video investigation. On the other hand, as described in Supplementary Methods and illustrated in Figs. S1 and S2, such quantitative aspects of behavior might be readily captured by the Phenotypix.

As illustrated in Fig. 2, we have here quantified the amplitude and frequency of the EM signal associated with grooming of the back and belly in *Fmr1*-KO mice ($n = 6$ and 7 animals, respectively), and found that they were differentially affected. The behavioural periods specifically spent in grooming either the back or the belly were manually defined offline from the video, and custom matlab scripts used to automatically detect the precise time of occurrence and quantify the amplitude of the EM signal associated with each grooming movement within grooming periods. The main change regarding grooming of the back was an increase in frequency ($z = -19.338$, $p < 0.001$) while amplitude was hardly affected (WT vs Fmr1-KO, $z = 2.193$, $p = 0.028$). On the other hand, the main change regarding grooming of the belly was an increase in amplitude (WT vs Fmr1-KO, $z = 29.147$, $p < 0.001$) while the frequency was hardly affected ($z = -5.080$, $p < 0.001$). Therefore, subtle changes associated with specific movements are readily detectable from the EM-signal.

Non-invasive monitoring of breathing and heartbeat for the detection of sleep and emotional states

Other very subtle movements, that can also serve as an index of emotional regulation, are breathing and heartbeat. Interestingly, heart rate is also an index of vagal/parasympathetic tonus, considered to be misregulated in some pathologies such as Fragile-X syndrome (FXS).

Within the EM signal obtained from a rat during sleep and immobility, we actually noticed events that seemed to correspond to breathing and heartbeat (Fig. S3). The signal-to-noise ratio was highest during sleep and lower during rest, probably because the movements issued from the heart and chest were transferred less directly to the sensors when the animal was resting on his paws than when his chest was in direct contact with the floor-plate. As a validation procedure, we did observe that, as described in the literature, breathing was more regular during slow wave sleep (SWS) than during REM sleep, the two main brain states here identified by the theta/delta ratio of the EEG, simultaneously recorded from the hippocampus. But as described in Supplementary Methods and illustrated in Figs. 3A–C and S4, more direct evidence was provided by concomitant recording of heart and breathing activity

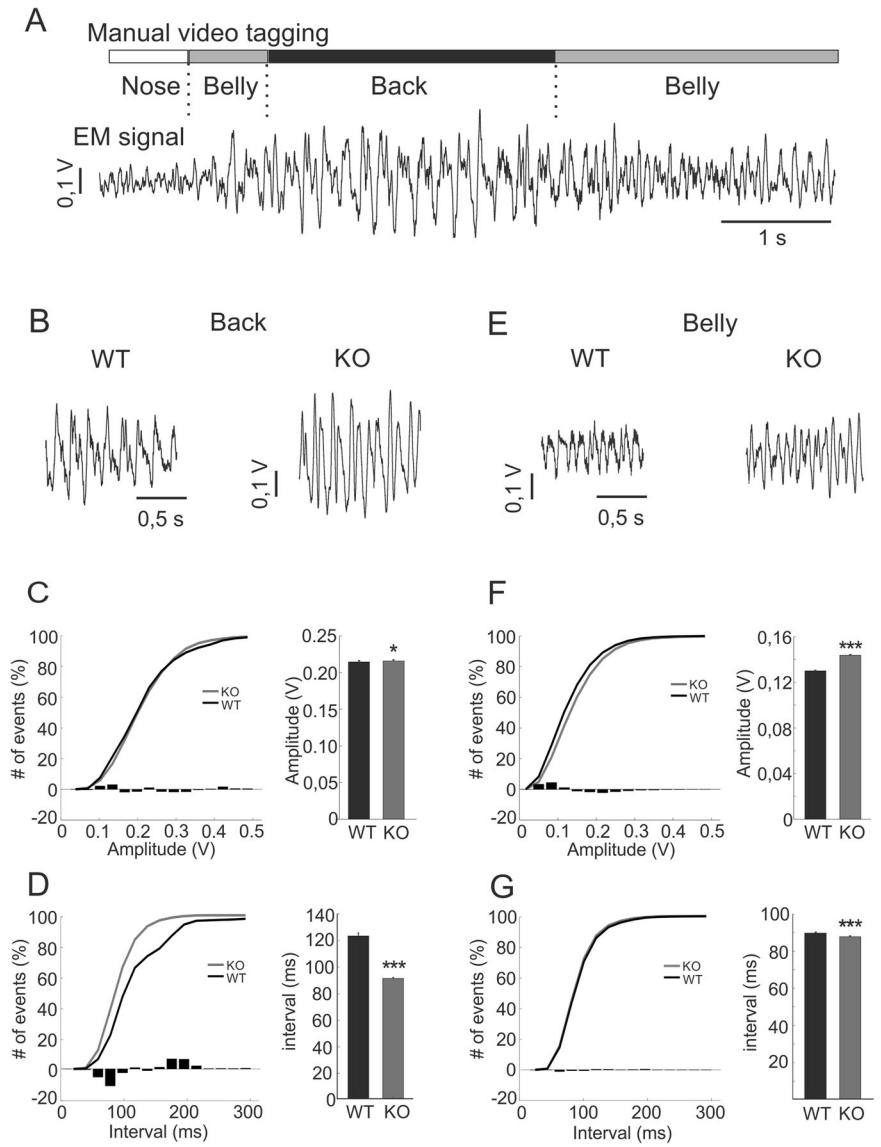


Fig. 2 Pressure-sensor-derived monitoring of grooming of the back and belly in WT and *Fmr1*-KO mice. A Typical example of sensor-derived (EM) signal related with grooming periods of different body parts identified manually from the video recording (horizontal bar: white, grooming of the nose, black, of the back, and gray, of the belly) in a WT mouse. **B**–**D** Electromechanical signal typical of a back-grooming episode, in WT mice (**B**, WT) and in *Fmr1*-KO mice (**B**, KO). The normalized cumulative distributions (**C**, **D**, left; black curves, WT; red curves, KO; superimposed bar histograms, difference between WT and KO) and averages across animals (**C**, **D**, right) of grooming signal amplitude (**C**) and inter-movement interval (**D**). **E**–**G** Same as in C, D but for grooming of the belly, indicating the amplitude and frequency of grooming of the belly in *Fmr1*-KO compared to WT mice. Note the clear increases in amplitude for grooming of the belly and in frequency (i.e. decreased inter-event intervals) for grooming of the back in *Fmr1*-KO compared to WT mice (*$p < 0.05$; ***$p < 0.001$).

using invasive electrocardiogram (ECG) and electromyogram (EMG) monitoring in freely moving animals, which demonstrated reliable monitoring of heartbeat and breathing from the EM signal. Because the animals (in particular mice, due to their small size) are likely to be perturbed by the presence of implanted devices (e.g. internal pressure sensors or ECG electrodes), we have used the EM signal as a non-invasive measure of heart rate in control WT and Fmr1-KO mice (a transgenic mouse model of FXS) at rest in a familiar environment. As illustrated in Fig. 3G, H, we have found that Fmr1-KO mice had an increased basal heart rate compared to WT mice ($t(17) = -7.26$; $p < 0.001$), rescued to normal levels by the BKCa channel agonist BMS-204352 (paired t-test, KO vs KO + BMS: $t(4) = 6.62$; $p = 0.003$, and independent samples t-test WT vs KO + BMS: $t(17) = -1.39$; $p = 0.18$). This is compatible with the clinical hypothesis that abnormal sympathetic/parasympathetic regulation may participate in the anxiety, behavioral distress, and gaze avoidance typically observed in FXS children [34–36], and confirms BKCa as a potentially relevant molecular target for the development of drug medication against FXS/ASD [30].

High-frequency shivering associated with fear

Although the temporal dynamics of normal movements seem to be mostly confined to frequencies within the 0–15 Hz range, we did notice faster components in specific experimental conditions. A behavioral condition of interest in terms of motor expression is that of fear, characterized either by the active suppression of movement (freezing), or by the expression in various body parts of high-frequency uncontrolled muscle contractions (shaking/shivering). While freezing behavior is classically quantified manually from video recordings, non-invasive detection of shaking/shivering has to our knowledge not been reported, and its behavioural expression is hardly investigated at all. Because freezing and

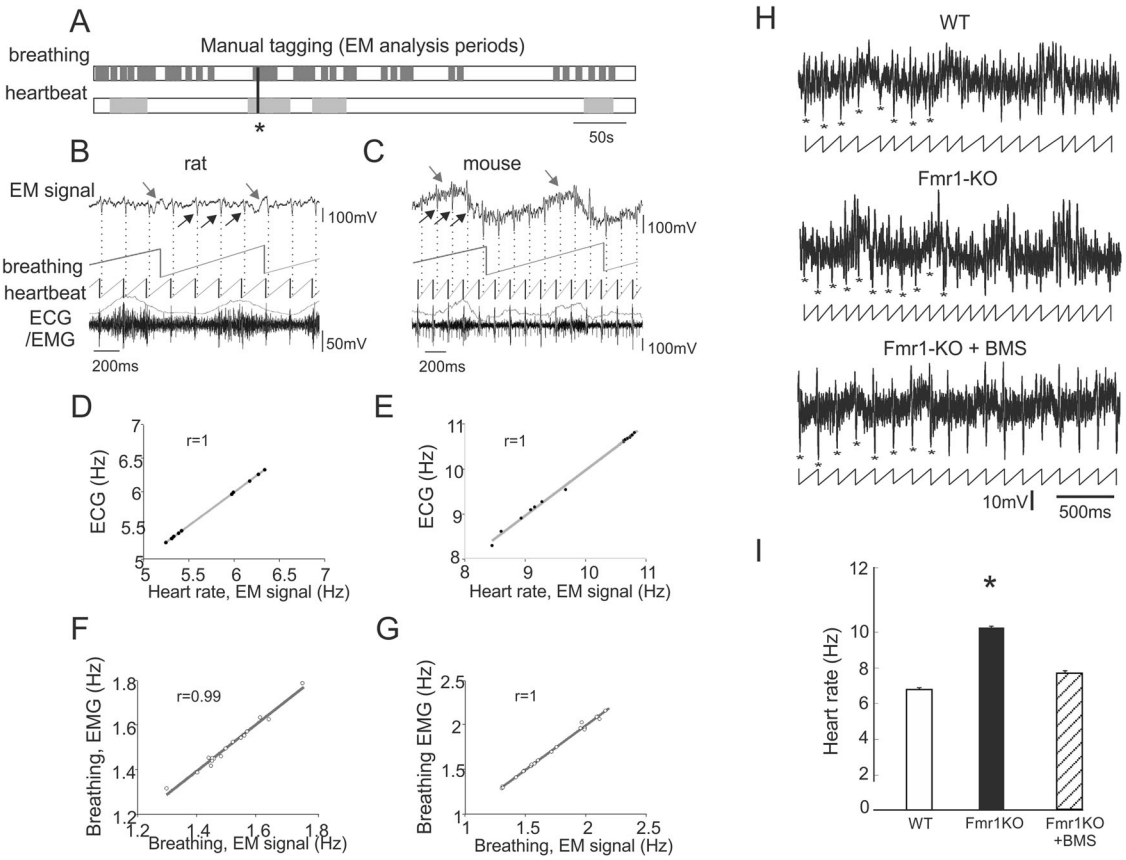


Fig. 3 Pressure-sensor-derived monitoring of breathing and heart-beat. A Schematic display of the periods with favorable signal-to-noise ratio for breathing (top, red) and heartbeat (bottom, gray) analysis, identified manually from the EM signal recorded from a freely moving mouse. The vertical black bar above the asterisk corresponds to the period which EM signal and ECG/EMG traces are shown in **C**. **B**, **C** Simultaneously recorded electromechanical signal (EM, upper traces) and electrocardiogram/electromyogram (ECG/EMG, lower traces, also shown as integrated signal in red) from the freely moving rat (**B**) and mouse (**C**). Note the slow and higher frequency components of the EM-signal derived from breathing and heartbeat, represented in middle traces (upper middle, linearized breathing cycles in red, lower middle, linearized heartbeat cycles in black) as broken lines. **D**–**G** Comparison of heart and breathing rates measured from the EM signal (X-axis) and ECG/EMG (Y-axis) in the rat (**D**, **F**) and in the mouse (**E**, **G**) over discrete periods of at least 20 contiguous heartbeat/10 breathing events. Note the tight correlation (Pearson correlation coefficient, $r > 0.99$) between EM and ECG/EMG-derived evaluation of heart and breathing rates. **H** Electromechanical signal and linearized heartbeat cycles during spontaneous immobility in a familiar environment from a representative WT (upper trace), Fmr1-KO (middle trace), and Fmr1-KO mouse injected with BMS (lower trace). **I** Average heart rate during awake immobility in WT, Fmr1-KO and Fmr1-KO mice injected with BMS (*$p < 0.05$.).

shaking may interestingly represent distinct but overlooked aspects of fear, we have looked for their potential specific signatures in the time-frequency composition of the EM signal of mice after contextual fear conditioning. Episodes of total immobility could be automatically detected with high efficiency and reliability (cf. Supplementary Methods and Fig. S5A–B) using a script collecting periods of EM signal below a manually set threshold of power in the 5–130 Hz frequency range (Fig. 4A). In addition, we noticed the high incidence of high-frequency (80–120 Hz) shaking events when the animal was inserted in the recording arena after fear conditioning (Fig. 4B). The detection of shaking/shivering from the piezo signal is based on the expression of high-frequency components in the piezo signal which are hardly expressed during immobility in control condition. Nevertheless, during active behavior (eg grooming, locomotion, etc…), movements with fast kinetics and large amplitude do carry a significant amount of high-frequency components in control conditions, which overlap with that of shaking. We have thus compared the expression of high-frequency components during the whole recording vs specific periods of either immobility or movement/locomotion. As illustrated in Fig. S5C–D (complementary to Fig. 4E), the increased expression of high-frequency components during fearful conditions could be detected from the whole recording (i.e. all behaviors included). But the main contributor to shaking-related high-frequency components is immobility, because contrary to immobility, there was no statistically significant difference between experimental conditions to reveal increased expression of shaking-related high-frequency components during movement periods. We have therefore restricted our detection analysis of shaking/shivering to immobility periods.

When we compared the times of occurrence of shaking and freezing in different behavioral conditions (Fig. 4C–F, $n = 7$ animals), we found that shaking was predominantly expressed as a behavioral response to context but not to the conditioned stimulus (Control vs Fear Context, $F(2,18) = 35.639$, $p < 0.001$; Control vs CS, $F(2,18) = 35.639$, $p = 0.953$), while it was the opposite for freezing (Control vs Fear context, $F(2,18) = 24.493$, $p = 0.614$; Control vs CS, $F(2,18) = 24.493$, $p < 0.001$), raising the possibility that shaking may be a behavioral response to diffuse threat and freezing to imminent threat. A confounding factor with freezing is that it was difficult from visual inspection to distinguish between immobility periods due to the real expression of fear from behavioral immobility associated with brief rest or active scanning of the environment. Short immobility periods (<2 s) were detected by our algorithm during the first minutes of exploration. In the literature, a classical approximation is to consider immobility periods > 2 s as freezing and to ignore those of shorter

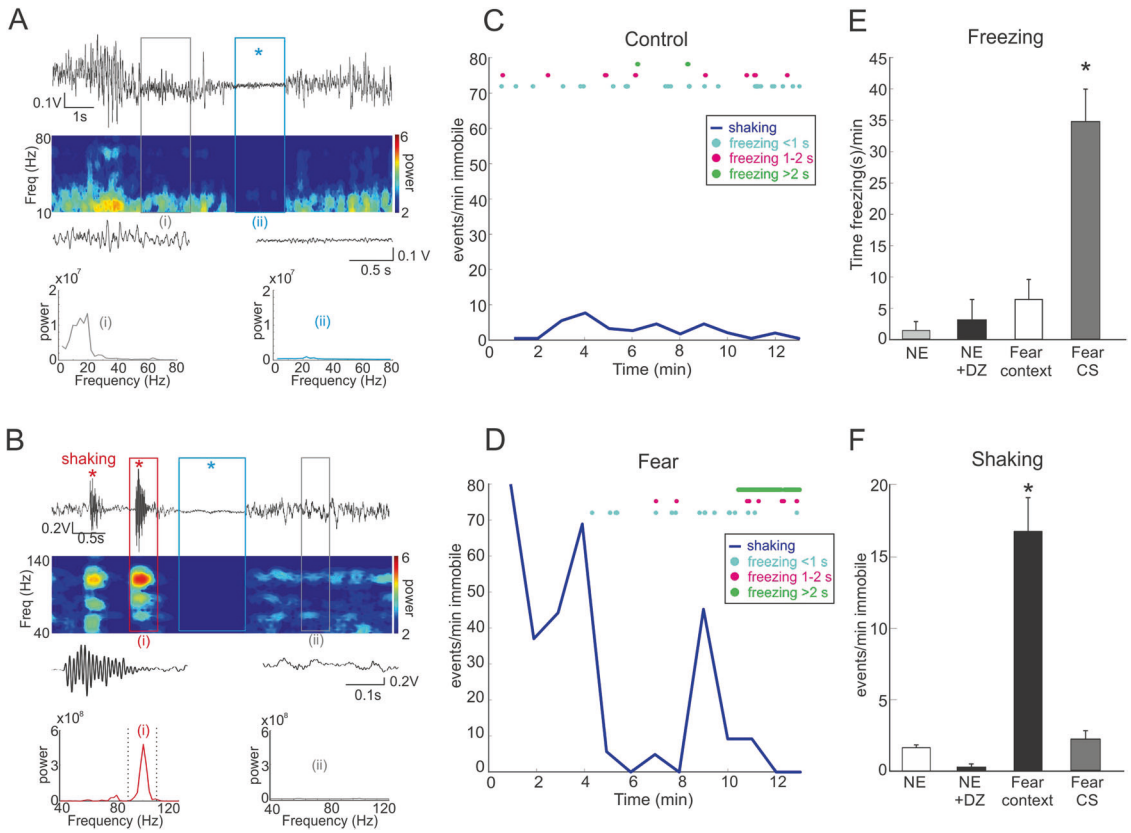


Fig. 4 Pressure-sensor-derived detection of fear-related freezing and shaking. A Electromechanical signal (top trace, raw data) and associated time-frequency spectrogram (underneath color plot, left scale is frequency range, color scale indicates power) show the presence of transient immobility periods (freezing, blue asterisk) during spontaneous exploration of a novel environment in a naive mouse. Below are shown a single freezing event (blue box, ii) vs basal resting condition (gray box, i), displayed at wider time scale above the corresponding Power Density Spectra. Note the strong drop in power at all frequencies during freezing. **B**. Electromechanical signal (top trace, raw data) and associated time-frequency spectrogram (underneath color plot, left scale is frequency range, color scale indicates power) show the presence of spontaneous transient 80–120 Hz oscillations in the signal (shaking, red asterisk) during behavioural rest from a mouse after contextual fear conditioning. Below are shown a single shaking event (red box, i) vs basal resting condition (gray box, ii), displayed at wider time scale above the corresponding Power Density Spectra. The signal in the blue box (blue asterisk) corresponds to a freezing episode. Note the high power in the 80–120 Hz frequency range during shaking. **C**, **D** Time course of occurrence of freezing (color coded horizontal time tags, freezing periods), detected as infra-threshold power in the 5–130 Hz frequency range) and shaking (blue line, detected as supra-threshold power in the 65–130 Hz frequency range and displayed as number of events per min, time bin 1 min) events over 13 min of recording before (**C**, Control) and after (**D**, Fear) contextual fear conditioning. Freezing episodes are indicated according to their duration: brief (<1 s, in cyan), intermediate (1–2 s, in magenta), long (>2 s, in green). **E**, **F** Bar plots of global expression of spontaneous freezing (**E**) and 65–130 Hz shaking events (**F**) either in control conditions (novel environment, **NE**), before and after pre-treatment with the anxiolytic Diazepam (+DZ), or after contextual fear conditioning (Fear context/CS, conditioned stimulus). Note that while freezing is the dominant behavioural expression of fear in response to CS, shaking is the dominant expression of context-related fear. ***$p < 0.001$.

durations. Accordingly, mice inserted in a novel environment ($n = 7$ animals) expressed shaking during the first few minutes while little freezing behavior (> 2 s) could be identified. Nevertheless, pre-treatment with the anxiolytic Diazepam (at the non-sedative dose of 1.5 mg/kg, $n = 6$ animals) fully abolished the shaking events expressed during the first few minutes in the environment (Control vs DZ, $t(11) = 5.052$, $p < 0.001$), but did not significantly reduce the number of freezing episodes (Control vs DZ, $t(11) = -0.517$, $p = 0.6153$). Further investigation may evaluate whether these brief immobility periods are related with mild anxiety and increased attention to potential alerts in an unfamiliar environment. The possibility that shaking and freezing might be distinct signatures of fear was further suggested by the behavioral reaction of mice exposed to the presence of a rat, one of their natural predators, which induced at times the remarkable expression of shaking with little freezing (Fig. S6). Therefore, the Phenotypix proved efficient to detect and quantify internal movements such as heartbeat or shaking/shivering, hardly detectable by the eye of a human observer.

Gait and time course of individual footsteps

Another interesting aspect of pressure sensors is the possibility to evaluate the dynamics of the coordination and strengths of limb movements (momentum) involved in locomotion. Locomotion has been extensively studied using various experimental paradigms associated with image processing tools allowing to gather increasingly sophisticated spatio-temporal information about stride or stance. Nevertheless, it has remained quite out of reach to get non-invasive information about the dynamics of momentum, which can not be evaluated by visual inspection, however sophisticated. We observed that the EM signal provides some information about the dynamics of locomotion.

Frame by frame analysis of the synchronously recorded video signal allows to depict the EM signature of individual footsteps. In the short sample of spontaneous locomotion illustrated in Fig. 5A, one can distinguish a few initial footsteps of small amplitude, that correspond to orienting behavior (the mouse was changing direction but not moving forward). The EM signature of locomotion, with the animal really starting to move ahead, then

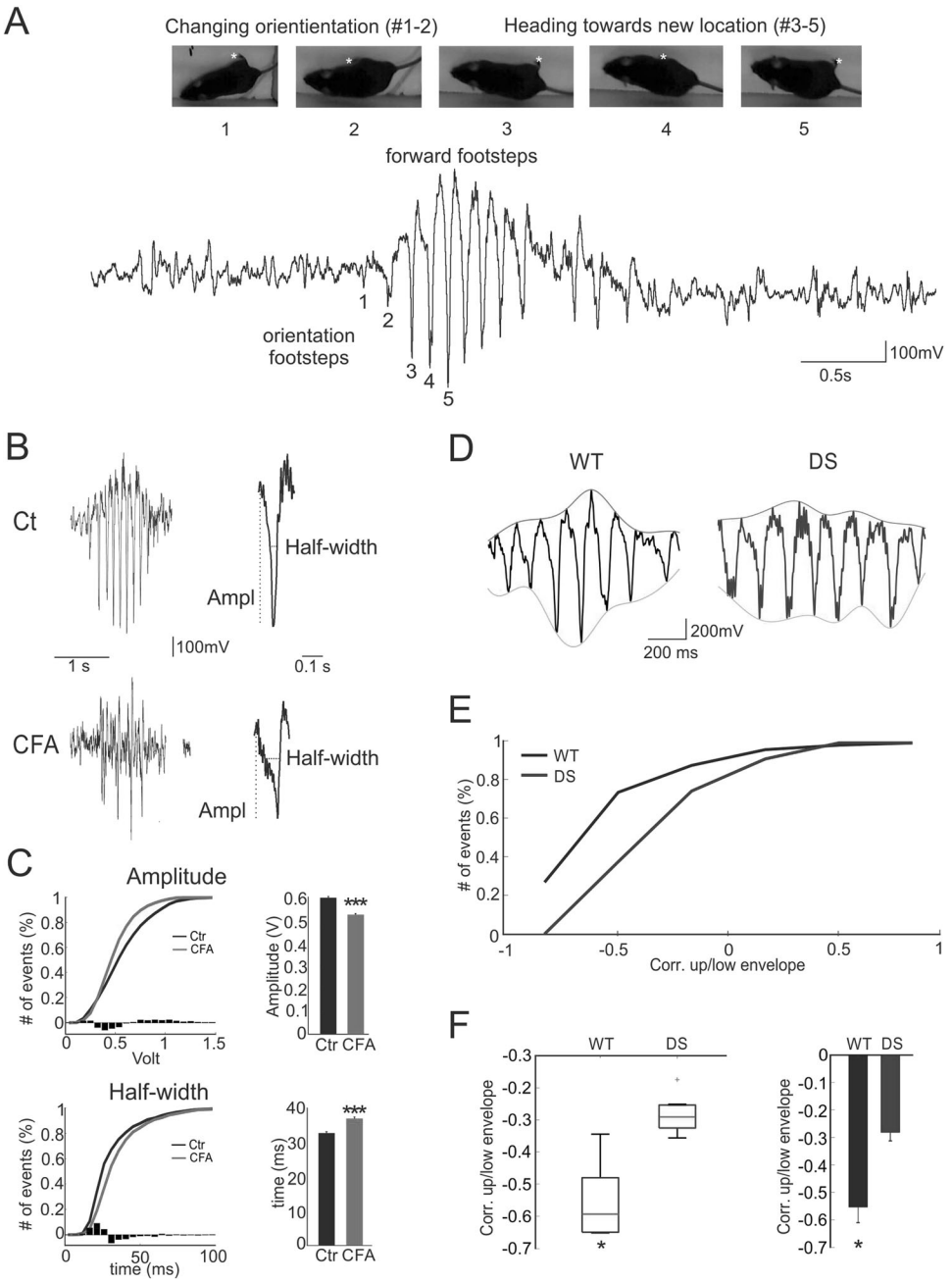


Fig. 5 Pressure-sensor-derived signature of gait during spontaneous locomotion. A. Typical Electromechanical signature of mouse locomotion. Images 1–5, successive video frames (white asterisk, right rear paw). Note the very light electromechanical signal generated by orientation footsteps (#1–2, when the mouse is changing orientation) compared to the strong signature of forward footsteps (#3–5, each footstep appears as a fast downward/upward deflection when the mouse is giving impulsion to move forward). **B**, **C** The signature of individual footsteps during locomotion is affected in mice with a sore paw. Electromechanical signal typical of a locomotor episode (speed 13–23 cm/s; right, zoom on an individual footstep), either in normal conditions (Ct, upper traces) or after CFA-induced inflammatory pain in the left rear paw (CFA, lower traces). The normalized cumulative distributions (**C**, left; black curves, Ct; red curves, CFA; superimposed bar histograms, difference between Ct and CFA) and averages across animals (**C**, right) of footsteps amplitude (upper plots) and half-width (lower plots) indicate the presence of footsteps of statistically significant (***$p < 0.001$) lower amplitude and slower kinetics in CFA compared to control mice. **D**–**F** The correlation coefficient between the upper and lower EM signal envelopes (**D**, orange and yellow lines respectively) was computed as an index of the timecourse profile of successive footsteps during locomotor events (homogenous speed range, 13–30 cm/s) in control (WT) and Ts65Dn (DS) mice. The distribution of correlation coefficients of all locomotor episodes is presented as a normalized cumulative histogram (**E**), as a moustache plot (**F**, left) and as mean and SEM (**F**, right). Note the statiscally different (*$p < 0.05$) correlation coefficients between upper and lower envelopes in WT vs DS mice.

becomes much more visible, as series of 5–10 footsteps of increasing and then decreasing amplitude, displaying a spindle pattern that turned out to be very typical of mouse locomotion. Because the EM signal is the result of the dynamic distribution of weight and of all the forces generated by a multitude of muscles within the animal's body, it is a complex mixture that depends on the coordination of the various limbs and strengths (momentum) involved in movement. Nevertheless, we think that the very

stereotypical signature of spontaneous locomotion in WT mice may serve as a reference template for the detection of motor impairment in various models of pathology.

As a first example, we recorded the EM signal of mice injected with CFA in one of the rear paws, producing local inflammation so that the animal tended to avoid pressing on the sore paw. Using a machine learning approach combining linear Support Vector Machine (SVM) classifier, autoregressive model (AR) feature extraction, and k-means clustering (see Online Methods section), we identified clusters of footsteps that differentiated control from CFA mice. Visual inspection of the signal chunks identified by the discriminating clusters guided our attention towards the amplitude and time course of the EM signature of individual footsteps. We therefore performed a systematic quantification of amplitude and half width of all footsteps emitted by control and CFA mice during locomotion at comparable running speed ($n = 9$ animals in each condition). As illustrated in Fig. 5B, C, some footsteps of CFA mice indeed turned out to be smaller and of slower time course than those of control mice (control vs CFA: amplitude, $z = 7.781$, $p < 0.001$; half-width, $z = -10.354$, $p < 0.001$), which reflects in the distributions of amplitude and half-width of the EM signal underlying individual footsteps during steady locomotion (15–30 cm/s). This is compatible with the likely consequence that CFA mice tend to avoid pressing on their sore paw.

Down Syndrom (DS) is also associated with motor impairment. Upon visual inspection of locomotion in Ts65Dn (a model of DS) and WT mice ($n = 5$ animals in each group), we noticed a disruption of the typical spindle pattern characteristic of WT mice. As illustrated in Fig. 5D–F, this was confirmed by the automatic quantification of the correlation coefficients between the lower and upper envelopes of the EM signal associated with steady locomotion (13–30 cm/s), suggesting altered balance and movement coordination in DS (WT vs DS, $t(8) = 4.2212$, $p = 0.0029$).

DISCUSSION

A novel device (the Phenotypix), made of an open-field platform resting on highly sensitive piezoelectric pressure sensors, provided access in a totally non-invasive manner to very fine components of rat or mouse spontaneous behavior. Existing systems [14, 18] based on similar principles, combined with spectral decomposition and automatic classification, are used to generate ethograms, attributing each time bin of the recording to the most likely ongoing behavior, such as walking, eating, drinking, seizures, etc… But in contrast to these systems, the fine sensitivity and high sampling rate of the Phenotypix, combined with highly efficient antivibration system to minimize dampening and resonance, allow to resolve individual movements such as individual breathing cycles, heartbeats, or single footsteps during locomotion. Through the study of various behavioral conditions and transgenic models, we could identify and quantify novel behavioral components that can be useful for the study of several fields of behavioral neuroscience such as sleep, stress, or motor symptoms of neurodevelopmental diseases and locomotion.

Although existing devices were shown to have good performance for the detection of various kinds of self-grooming behavior [14, 18], they are not used, to our knowledge, for the quantification of the frequency and of the strength/momentum or amplitude of individual self-grooming body movements. The observation of increased amplitude and frequency of the EM signal underlying body movement in self-grooming of the back and belly in *Fmr1*-KO mice is an interesting complement to recent studies pointing at fine alterations in self-grooming behavior in these mice under stressful conditions [37–39], because it may help better understand repetitive and self-injury behavior in FXS/ASD patients [30, 32, 40, 41].

The direct and non-invasive evaluation of breathing and heart rate may prove useful for the study of sleep apneas, a pathological condition we still poorly understand. A previous report [13] described the use of piezo sensors to detect breathing movements and heartbeats of a mouse placed on a small platform (7 × 13 cm). Our system reached comparable sensitivity and resolution with dimensions more compatible with the study of spontaneous behavior for mice and rats. Although the dimensions of the system described here are 45 × 35 cm, it can be extended to larger environments by the apposition of several platforms, providing a multi-compartment environment best suited to the expression of complex behavior of both rats and mice. Breathing and heartbeat are vital parameters, but also strongly related to emotions, an aspect of behavior difficult to identify in animal studies. Anxiety is classically evaluated as the avoidance of situations of innate aversion such as exposed or bright areas (e.g. center of an open field, open arms of a maze) [42]. Fear on the other hand, a more acute and stronger behavioral reaction to perceived threat, is classically quantified as freezing immobility in rat and mouse studies. From our results, we propose high-frequency (80–120 Hz) shaking as a complementary index of fear in the mouse, expressed during exposition to a fearful situation such as a novel environment, the presence of a predator or a context previously associated with fear conditioning.

Our device also allowed the detection of abnormalities in the execution of locomotion, a fundamental motor function. While a number of systems are available to measure the spatio-temporal organization of gait, analyzing the sequence of positions of the various limbs during locomotion [3, 4, 9–11, 43], the Phenotypix allowed to reveal subtle alterations in the pressure signature of individual footsteps. This compound output is the result of complex interactions, that we can not yet dissociate, between the muscular strengths and the coordination of the individual limbs involved in each footstep. Nevertheless, we could access the time course of the momentum that corresponds to individual footsteps, and identify its reduced amplitude and slower time course in limping mice. Moreover, global analysis of the dynamics of successive footsteps revealed that mouse locomotion is typically organized as series of 5–10 footsteps of increasing and then decreasing amplitude, a pattern that was disrupted in a mouse model of Down Syndrome. Our system therefore allowed to detect alterations of locomotion in different mouse models, suggesting access to novel criteria for gait analysis that may shed new light in the understanding of various forms of ataxia.

Compared to existing approaches used in behavioral studies, the specificities of the Phenotypix present some advantages and limitations, guiding its fields of application. The main thing about the Phenotypix is to be at the same time global and very sensitive. This is advantageous to detect fine components potentially overlooked by other approaches (e.g. shaking, momentum), but a limitation when it comes to underpin the specific behavioral factor responsible for the identified EM-signal (e.g. to distinguish the relative contributions of movement amplitude, speed, or strength in the EM signature of grooming). The global nature of the signal can also be a disadvantage in applications that require uninterrupted monitoring of a specific behavioral component. For example, the Phenotypix allows to detect heartbeat and breathing in a majority of animals, but only during some periods of immobility, and alternative methods such as ECG/EMG or nasally implanted thermocouples [44] may thus be preferred for uninterrupted monitoring, although these approaches also have their own disadvantages (e.g. to be invasive). Overall, rather than an alternative to video approaches, EM signals might prove very helpful as a complement to image processing algorithms by bringing complementary non-visual information to feed machine learning algorithms, which progress at tremendous pace. It is thus very likely that the combination of EM signal and video monitoring, as provided in the Phenotypix system, should considerably improve the performance in building automated ethograms in the future.

REFERENCES

1. Welker WI. Analysis of sniffing of the albino rat 1. Behaviour. 1964;22:223–244.
2. Kabra M, Robie AA, Rivera-Alba M, Branson S, Branson K. JAABA: interactive machine learning for automatic annotation of animal behavior. Nat Methods. 2013;10:64–67.
3. Pereira TD, Aldarondo DE, Willmore L, Kislin M, Wang SSH, Murthy M, et al. Fast animal pose estimation using deep neural networks. Nat Methods. 2019;16:117–25.
4. Mathis A, Mamidanna P, Cury KM, Abe T, Murthy VN, Mathis MW, et al. DeepLabCut: markerless pose estimation of user-defined body parts with deep learning. Nat Neurosci. 2018;21:1281–9.
5. Ou-Yang TH, Tsai ML, Yen CT, Lin TT. An infrared range camera-based approach for three-dimensional locomotion tracking and pose reconstruction in a rodent. J Neurosci Methods. 2011;201:116–23.
6. Wiltschko AB, Johnson MJ, Iurilli G, Peterson RE, Katon JM, Pashkovski SL, et al. Mapping sub-second structure in mouse behavior. Neuron. 2015;88:1121–35.
7. von Ziegler L, Sturman O, Bohacek J. Big behavior: challenges and opportunities in a new era of deep behavior profiling. Neuropsychopharmacology. 2021;46:33–44.
8. Sturman O, von Ziegler L, Schläppi C, Akyol F, Privitera M, Slominski D, et al. Deep learning-based behavioral analysis reaches human accuracy and is capable of outperforming commercial solutions. Neuropsychopharmacology. 2020;45:1942–52.
9. Clarke KA, Still J. Gait analysis in the mouse. Physiol Behav. 1999;66:723–9.
10. Machado AS, Darmohray DM, Fayad J, Marques HG, Carey MR. A quantitative framework for whole-body coordination reveals specific deficits in freely walking ataxic mice. eLife. 2015;4:e07892.
11. Zorner B, Filli L, Starkey ML, Gonzenbach R, Kasper H, Rothlisberger M, et al. Profiling locomotor recovery: comprehensive quantification of impairments after CNS damage in rodents. Nat Methods. 2010;7:701–8.
12. Sato S, Yamada K, Inagaki N. System for simultaneously monitoring heart and breathing rate in mice using a piezoelectric transducer. Med Biol Eng Comput. 2006;44:353–62.
13. Sato S. Quantitative evaluation of ontogenetic change in heart rate and its autonomic regulation in newborn mice with the use of a noninvasive piezoelectric sensor. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2008;294:H1708–H1715.
14. Brodkin J, Frank D, Grippo R, Hausfater M, Gulinello M, Achterholt N, et al. Validation and implementation of a novel high-throughput behavioral phenotyping instrument for mice. J Neurosci Methods. 2014;224:48–57.
15. Mang GM, Nicod J, Emmenegger Y, Donohue KD, O'Hara BF, Franken P. Evaluation of a piezoelectric system as an alternative to electroencephalogram/ electromyogram recordings in mouse sleep studies. Sleep. 2014;37:1383–92.
16. Donohue KD, Medonza DC, Crane ER, O'Hara BF. Assessment of a non-invasive high-throughput classifier for behaviours associated with sleep and wake in mice. Biomed Eng Online 2008;7:14.
17. Daldrup T, Remmes J, Lesting J, Gaburro S, Fendt M, Meuth P, et al. Expression of freezing and fear-potentiated startle during sustained fear in mice. Genes Brain Behav. 2015;14:281–91.
18. Van de Weerd HA, Bulthuis RJA, Bergman AF, Schlingmann F, Tolboom J, Van Loo PLP, et al. Validation of a new system for the automatic registration of behaviour in mice and rats. Behav Processes 2001;53:11–20.
19. Reeves RH, Irving NG, Moran TH, Wohn A, Kitt C, Sisodia SS, et al. A mouse model for Down syndrome exhibits learning and behaviour deficits. Nat. Genet. 1995;11:177–84.
20. Mientjes EJ, Nieuwenhuizen I, Kirkpatrick L, Zu T, Hoogeveen-Westerveld M, Severijnen L, et al. The generation of a conditional Fmr1 knock out mouse model to study Fmrp function in vivo. Neurobiol Dis. 2006;21:549–55.
21. Hébert B, Pietropaolo S, Même S, Laudier B, Laugeray A, Doisne N, et al. Rescue of fragile X syndrome phenotypes in Fmr1 KO mice by a BKCa channel opener molecule. Orphanet J Rare Dis. 2014;9:1–10.
22. Zhang Y, Bonnan A, Bony G, Ferezou I, Pietropaolo S, Ginger M, et al. Dendritic channelopathies contribute to neocortical and sensory hyperexcitability in Fmr1 (-/y) mice. Nat Neurosci 2014;17:1701–9.
23. Hazan L, Zugaro M, Buzsaki G. Klusters, NeuroScope, NDManager: a free software suite for neurophysiological data processing and visualization. J Neurosci Methods. 2006;155:207–16.
24. Mills, TC. Time Series Techniques for Economists. Cambridge University Press; 1991.
25. Hartigan JA, Wong MA. Algorithm AS 136: a k-means clustering algorithm. Appl Stat. 1979;28:100–8.
26. Cortes C, Vapnik V. Support-vector networks. Mach Learn. 1995;20:273–97.
27. Rijsbergen, CJV. Information Retrieval. Butterworth-Heinemann; 1979.
28. Kriegeskorte N, Simmons WK, Bellgowan PSF, Baker CI. Circular analysis in systems neuroscience – the dangers of double dipping. Nat Neurosci. 2009;12:535–40.
29. Razali NM, Bee Wah Y. Power comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling tests. J Stat Model Anal. 2011;2:21–33.
30. Carreno-Munoz MI, Martins F, Medrano MC, Aloisi E, Pietropaolo S, Dechaud C, et al. Potential involvement of impaired BKCa channel function in sensory defensiveness and some behavioral disturbances induced by unfamiliar environment in a mouse model of fragile X syndrome. Neuropsychopharmacology. 2018;43:492–502.
31. Uutela M, Lindholm J, Louhivuori V, Wei H, Louhivuori LM, Pertovaara A, et al. Reduction of BDNF expression in Fmr1 knockout mice worsens cognitive deficits but improves hyperactivity and sensorimotor deficits. Genes Brain Behav. 2012;11:513–23.
32. Symons FJ, Clark RD, Hatton DD, Skinner M, Bailey DB. Self-injurious behavior in young boys with fragile X syndrome. Am J Med Genet Part A. 2003;118A:115–21.
33. Bova, A, Kernodle, K, Mulligan, K, Leventhal, D. Automated rat single-pellet reaching with 3-dimensional reconstruction of paw and digit trajectories. J Vis Exp. 2019; 10.3791/59979.
34. Boccia ML, Roberts JE. Behavior and autonomic nervous system function assessed via heart period measures: the case of hyperarousal in boys with fragile X syndrome. Behav Res Methods Instrum Comput. 2000;32:5–10.
35. Roberts JE, Tonnsen B, Robinson A, Shinkareva SV. Heart activity and autistic behavior in infants and toddlers with fragile X syndrome. Am J Intellect Dev Disabil. 2012;117:90–102.
36. Hessl D, Glaser B, Dyer-Friedman J, Blasey C, Hastie T, Gunnar M, et al. Cortisol and behavior in fragile X syndrome. Psychoneuroendocrinology. 2002;27:855–72.
37. Song C, Berridge KC, Kalueff AV. 'Stressing' rodent self-grooming for neuroscience research. Nat Rev Neurosci. 2016;17:591–591.
38. van Erp AMM, Kruk MR, Meelis W, Willekens-Bramer DC. Effect of environmental stressors on time course, variability and form of self-grooming in the rat: Handling, social contact, defeat, novelty, restraint and fur moistening. Behav Brain Res. 1994;65:47–55.
39. Meshalkina, DA, and Kalueff, AV. Commentary: ethological evaluation of the effects of social defeat stress in mice: beyond the social interaction ratio. Frontiers in Behavioral Neuroscience. 2016;10:155.
40. Baranek GT, Foster LG, Berkson G. Tactile defensiveness and stereotyped behaviors. Am J Occup Ther. 1997;51:91–95.
41. Merenstein SA, Sobesky WE, Taylor AK, Riddle JE, Tran HX, Hagerman RJ. Molecular-clinical correlations in males with an expanded FMR1 mutation. Am J Med Genet. 1996;64:388–94.
42. Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. Eur J Pharm. 2003;463:3–33.
43. Brooks SP, Dunnett SB. Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. Nat Rev Neurosci. 2009;10:519–29.
44. Moore JD, Deschênes M, Furuta T, Huber D, Smear MC, Demers M, et al. Hierarchy of orofacial rhythms revealed through whisking and breathing. Nature. 2013;497:205–10.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Yannick Jeantet for fruitful discussions and comments, Delphine Gonzales, Nathalie Aubailly, and all the personnel of the Animal Facility platforms of the NeuroCentre Magendie and of INMED for animal care.

FUNDING

This work was supported by funding from: INSERM (XL and AF), Région Nouvelle Aquitaine (XL), Agence Nationale pour la Recherche (ANR, XL), and Fondation Jerôme Lejeune (AF). We thank the Animal Housing and Genotyping facilities, supported by funding from INSERM and LabEX BRAIN (ANR-10-LABX-43). MICM was supported by an international PhD fellowship (ANR-10-IDEX-03-02).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

XL conceived the project and collected pilot data. MICM, MCM, and XL planned the research. MICM, MCM, MB, FM, ML, FA, AFGDS, CG, CM, and XL participated in animal preparation. MICM, MCM, MB, FM, ES, AFGDS, and XL performed data acquisition. AF provided lab and breeding space. MICM, MCM, MB, FM, MG, TL, CM, AFGDS, and XL analyzed the data. MICM, MCM, MG, and XL wrote the paper. All the authors have read and commented on the manuscript.

COMPETING INTERESTS

XL is shareholder of Roddata. The other authors declare no competing interests.

ADDITIONAL INFORMATION

Supplementary information The online version contains supplementary material available at https://doi.org/10.1038/s41386-021-01217-w.

Correspondence and requests for materials should be addressed to Xavier Leinekugel.

Reprints and permission information is available at http://www.nature.com/reprints

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Supplementary Methods: Validation of the EM signal with independent (ECG/EMG) and gold standard (manual video analysis) methods

ECG/EMG recording in freely moving rats and mice

Rats and mice were deeply anesthetized with isoflurane (2-5%) and implanted with two individual copper-wires (insulated except for 3 mm at the tips, diameter 0.1 mm) connected to an Omnetics connector fixed to the cranial bone with dental cement. As described in a previous study[1], the free tips of the two wires were guided subcutaneously from an incision in the dorsal part of the neck to an hemi-laparotomy, and then inserted between the liver and the diaphragm. The resulting ECG/EMG signals were recorded against that of a reference electrode placed in conjonctive tissue between the skin and the frontal part of the calvarium, soldered to the Omnetics connector and maintained on the skull by dental cement. The skin was then sutured, analgesic treatment provided (Rimadyl, 0.5 mg/kg and buprenorphine, 0.1mg/kg, SC), and the animal was kept under daily monitoring for 1 week for healing and recovery. The animal was recorded in the freely moving condition on the Phenotypix platform. ECG/EMG signals obtained from an Intan 16-channel tethered headstage equipped with accelerometers (3 independent channels, X,Y,Z), were sampled at 20KHz using OpenEphys and stored on PC for offline analysis. The electromechanical signal (EM) from each of the 3 sensors was synchronously acquired on 3 additional independent OpenEphys channels (digitized at similar sampling rate). The video acquisition was performed at 50 frames per second using a laterally positioned BFS-U3-162M camera (FLIR), driven by the Spinview software (FLIR). The TTL pulses emitted by the camera upon emission of each video frame were collected in a separate channel in OpenEphys to monitor video and ECG/EMG/EM/accelerometer data synchrony. The synchronized video, EM and ECG/EMG signals were replayed offline for analysis, using the CED Spike2 software (v10).

Grooming

For validation purposes, we have compared the EM signals collected on the Phenotypix during grooming behavior with those collected simultaneously by accelerometers positioned on the top of the animal's head (n=2 rats and 2 mice). As illustrated in Figure S1 (mouse) and S2 (rat), there was a tight relationship between EM and accelerometer signals during grooming behaviors involving movements of the head (here facial and body grooming). In order to know to what extent the system loses its ability to capture the signal when bedding or objects are placed into the arena, recordings were also performed with bedding (up to about 150g of litter, providing between 0.5 and 1cm-thick floor coverage) and a couple of hard objects (cardboard dome / plastic beaker, for a total weight of about 100g with rats and 15g with mice) on the floor-plate. As illustrated in Figure S1 and S2, individual movements were still readily captured by the EM sensors, with tight relationship with that of accelerometers, which might enlarge the breadth of possible applications requiring the presence of bedding or objects.

Heartbeat and breathing

Direct validation of the EM signal for heartbeat and breathing was provided by concomitant recording of heart and breathing activity using invasive electrocardiogram (ECG) and electromyogram (EMG) monitoring in freely moving animals. In the two mice and 2 rats equipped with electrode-wires implanted against the diaphragm (to collect ECG and EMG), electro-mechanical signals related to heartbeat and breathing movements were manually tagged by an experienced operator, blind relative to video and ECG/EMG signals. Because heartbeat and breathing signals can be reliably detected only during periods of time when the animal is quiet and in a favorable body position, the tagging was performed during carefully selected periods presenting the highest and clearest signal-to-noise ratio for series of at least 20 consecutive events for heartbeat, 10 for breathing. Compared to ECG/EMG (ground truth), the rates of true positives were 100% for both heartbeat and breathing and in both mice and rats (from respectively 625 and 422 manually detected events for heartbeat, 530 and 263 events for breathing), and there were no supernumerary (false positives, 0%) or missed (false negatives, 0%) events. Heart rates and breathing rates were evaluated as the mean interval between consecutive events manually detected from the EM signal, and then compared to the ground truth ECG/EMG signals. As illustrated in Fig.3, the Pearson correlation coefficients were respectively 1 (n=17 periods totalizing 377 events from 2 mice) and 1 (n=12 periods totalizing 287 events from 2 rats) for heart rates, and 1 (n=22 periods for a total of 406 events from 2 mice) and 0.99 (n=16 periods for a total of 247 events from 2 rats) for breathing rates. As for grooming, we also observed that heartbeat and breathing-related movements we readily captured in presence of bedding (up to about 150g of litter, providing between 0.5 and 1cm thick floor coverage) and a couple of hard objects (cardboard dome / plastic beaker, for a total weight of about 100g with rats and 15g with mice) on the floor-plate. The manually tagged EM signals for heartbeat were validated by the simultaneously recorded ECG. Detection rates were 100% of true positives for both rats and mice, with no false positives or false negatives. And as illustrated in Figure S4, correlation coefficients of heart rates evaluated from manually detected events in the EM signal (in series of at least 20 consecutive events) and compared to the ground truth ECG, were respectively 1 (n=18 periods totalizing 426 events from 2 mice) and 1 (n=7 periods totalizing 179 events from 1 rat). Contrary to our recordings in mice, diaphragm EMG was unfortunately not available in our recordings in rats in the presence of bedding and hard objects on the floor-plate. We have tested the possibility to use manual tagging of video recordings to detect breathing movements in the rat, and found detection rates of 98.2% true positives with no false positives (n=162 events from 1 rat). Instead of the diaphragm EMG used in mice, we have therefore used manual tagging of breathing-related movements from the video as ground truth to validate their detection from the EM signals in rats. As for heartbeat, we report reliable detection of breathing-related movements in both rats and mice in the presence of bedding and hard objects on the floor plate, with respectively 96.9% and 99.3% of true positives for rats and mice, with no false positives (n=1270 events from 2 rats and 530 events for 2 mice), and as illustrated in Figure S4, correlation coefficients of respectively 0.98 (n=21 periods totalizing 257 events from 2

mice) and 0.95 (n=40 periods totalizing 1061 events from 2 rats) for breathing rates evaluated from manually detected events in the EM signal (in series of at least 10 consecutive events) and compared to the ground truth ECG/video tags. These results suggest that EM signal analysis of heartbeat and breathing-related movements was superior to video monitoring, in which breathing-related movements were possible to investigate using manual tagging but at the cost of much more tedious work, moreover limited since heartbeat could not be detected from the video in our recording conditions. It however does not preclude this might be possible with more advanced video/imaging techniques[2].

Freezing

In order to evaluate the performance of freezing detection from the EM signal (either manually during offline replay of the synchronized video and EM signal, or through automatic detection using matlab scripts), total freezing durations were compared to the freezing periods identified manually by an expert human operator from the videos of the same recordings, as in Brodkin et al. 2014. As now illustrated in Figure S5A-B, there was a tight correlation (Pearson correlation coefficient r=0.99, n=20 recordings from 13mice) between total freezing durations detected using the EM signal compared to the gold standard of manual scoring from the video. Nevertheless, it is important to note that one important aspect of the EM signal, compared to video monitoring, is the possibility to grasp visually an extended period of time, while video signals are instantaneous. Thus, beside the possibility for automatic detection of events that could also be manually tagged from video recordings (e.g. freezing), the use of the piezo signal in addition to the video (simultaneous replay) can considerably facilitate manual analysis, allowing its performance within a fraction of the time necessary for manual analysis from the video only. For example, while the detection of the beginning of a freezing episode (period of immobility longer than 2s) using only the video requires to watch at least the following 2s (and then often to come back to identify the precise starting point), this is considerably easier on the EM-signal trace which simultaneously displays several seconds of signal (see for example Figure 4A-B in which freezing periods can be identified instantaneously by the naked eye across several seconds of data). Not to mention that the possibility to use classical signal analysis tools (e.g. time frequency decomposition) is a considerable advantage over video monitoring, which analysis is much more complex.

Supplementary references

1. Roda, F., Pio, J., Bianchi, A.L., and Gestreau, C. (2004). Effects of anesthetics on hypoglossal nerve discharge and c-Fos expression in brainstem hypoglossal premotor neurons. J Comp Neurol *468*, 571-586.
2. Grimaud, J., and Murthy, V.N. (2018). How to monitor breathing in laboratory rodents: a review of the current methods. Journal of Neurophysiology *120*, 624-632.

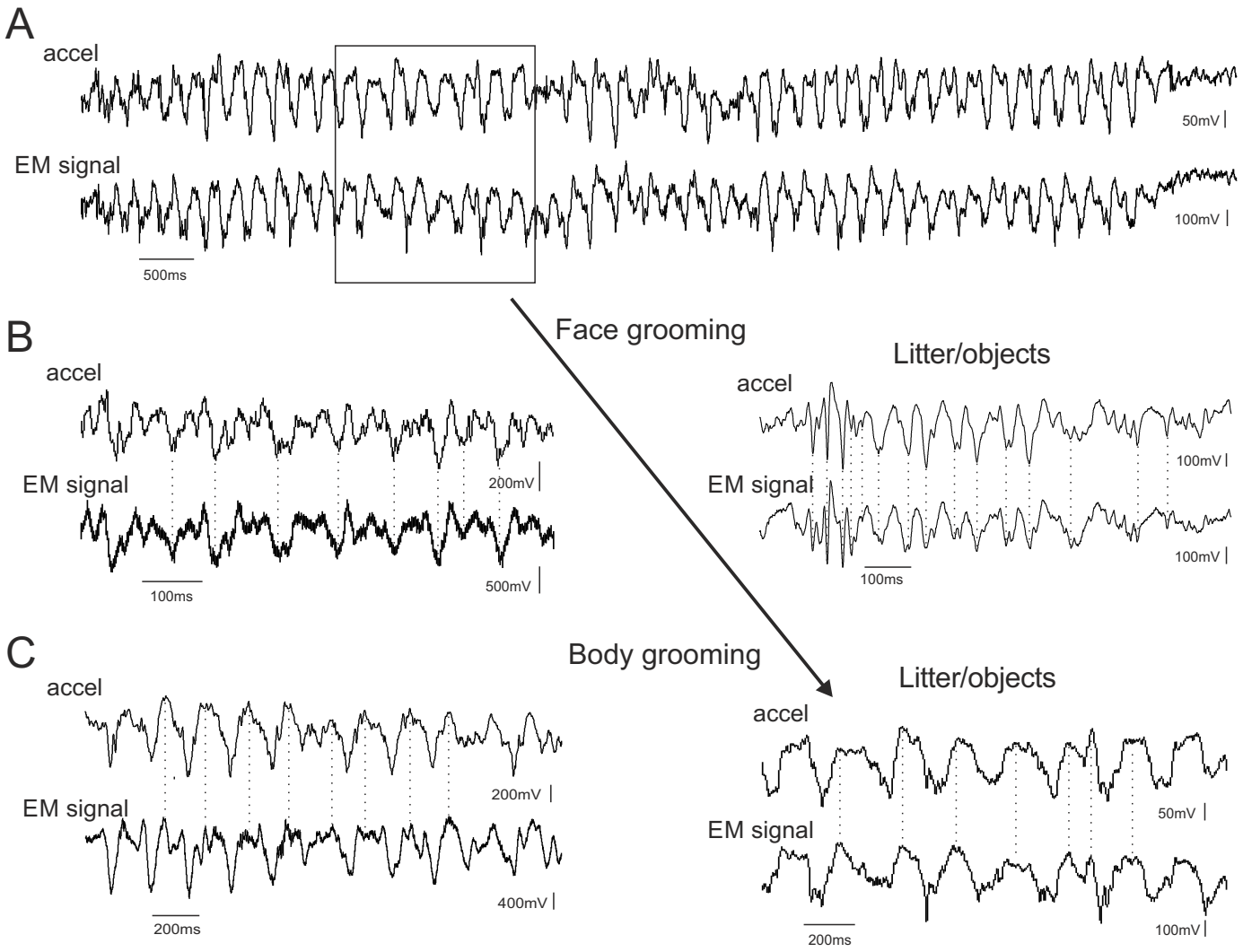


Figure S1: Validation of grooming movements by accelerometers in the mouse

Simultaneously recorded accelerometer (**accel, upper traces**) and electromechanical signal (**EM, lower traces**) from the freely moving mouse during grooming behaviour, in presence or absence of litter and objects on the floor plate.

A. Body grooming in presence of litter and objects on the floor plate. The portion of the trace in the **box in A** is presented at a larger scale in **C** (**arrow**)

B-C. Grooming of the face (**B**) or the body (**C**) in control conditions (**left traces**) and in the presence of litter and objects on the floor plate (**right traces**).
Note the tight temporal relationship between EM and accelerometer signals.

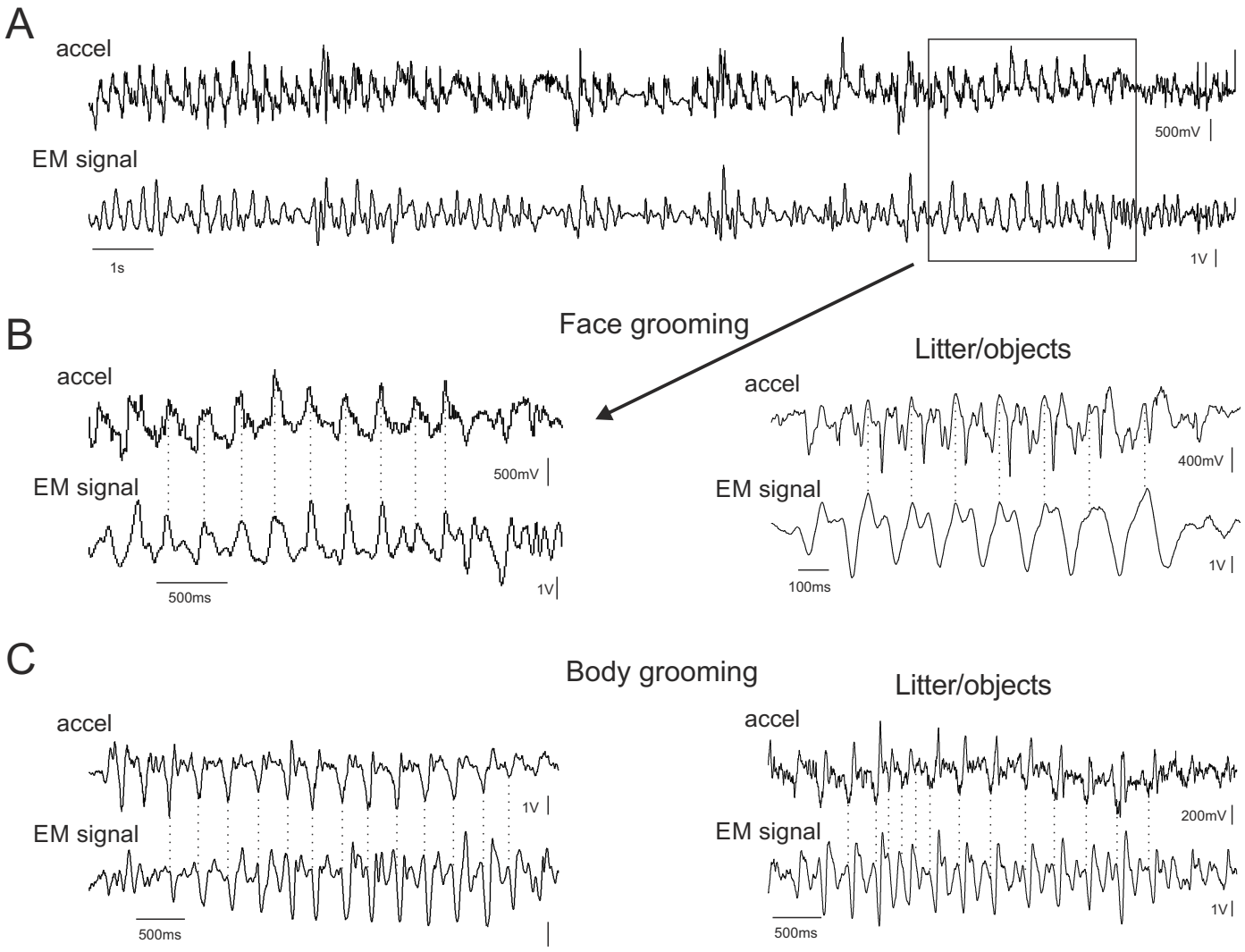


Figure S2: Validation of grooming movements by accelerometers in the rat

Simultaneously recorded accelerometer (**accel, upper traces**) and electromechanical signal (**EM, lower traces**) from the freely moving rat during grooming behaviour, in presence or absence of litter and objects on the floor plate.

A. Face grooming in absence of litter or objects on the floor plate. The portion of the trace in the **box in A** is presented at a larger scale in **B** (**arrow**)

B-C. Grooming of the face (**B**) or the body (**C**) in control conditions (**left traces**) and in the presence of litter and objects on the floor plate (**right traces**).
Note the tight temporal relationship between EM and accelerometer signals.

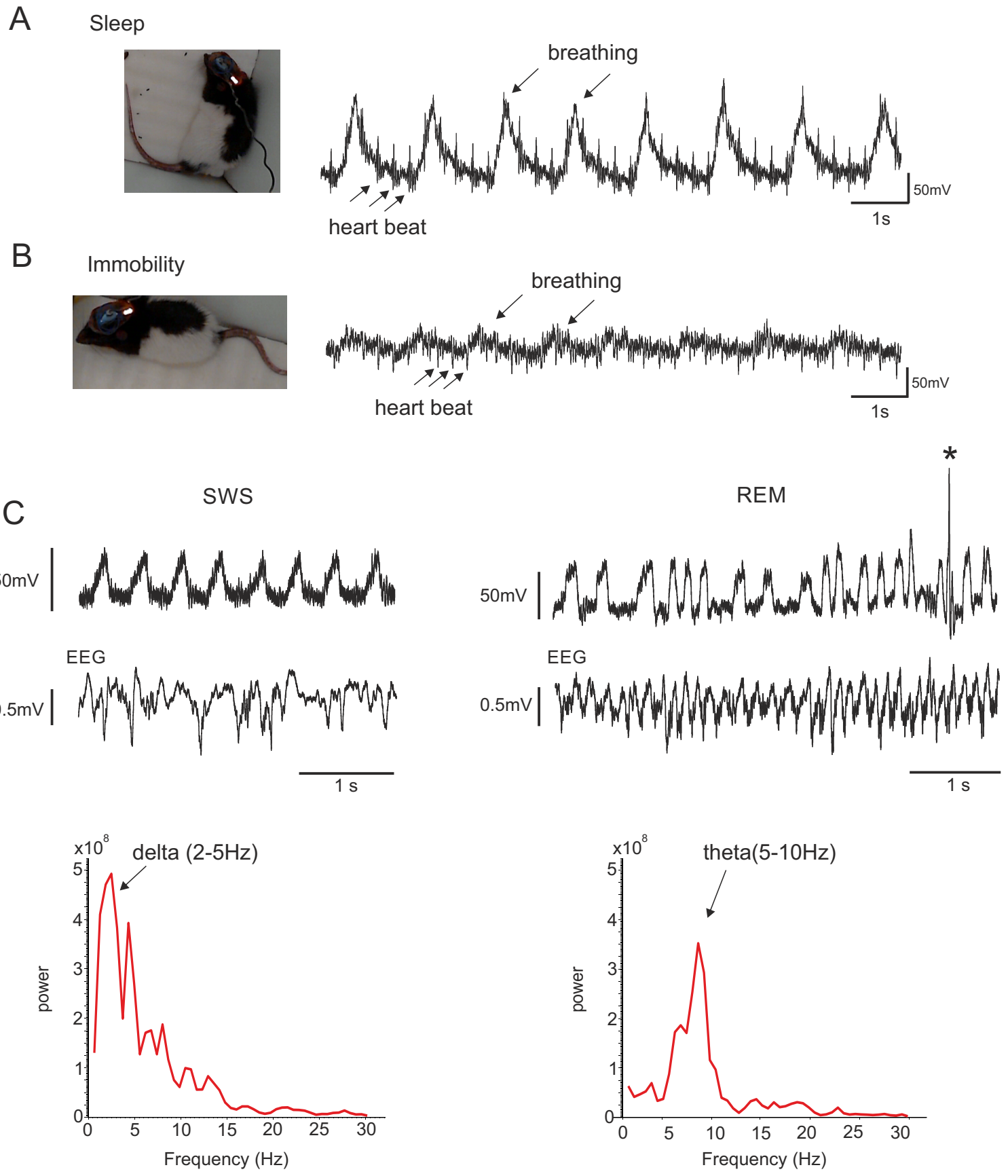


Figure S3: Pressure-sensor-derived monitoring of breathing and heart-beat during immobility and sleep

A-B. Sensor-derived signal from a rat during sleep and immobility. Note the higher amplitude of breathing and heart-beat signals when the animal is lying on the floor (**A**, Sleep) compared to resting on his paws (**B**, immobility).

C. Simultaneously recorded sensor-derived (upper trace) and EEG (lower trace) signal from a mouse during sleep. Power spectral decomposition of EEG traces (below) identifies slow wave sleep (SWS, left traces) as high delta (2-5Hz) and low theta (6-10Hz) power, and REM sleep (right traces) as low delta and high theta power. Note that SWS is characterized by very regular breathing and absence of any other movement, while REM sleep shows irregular breathing as well as occasional movements (twitches, *).

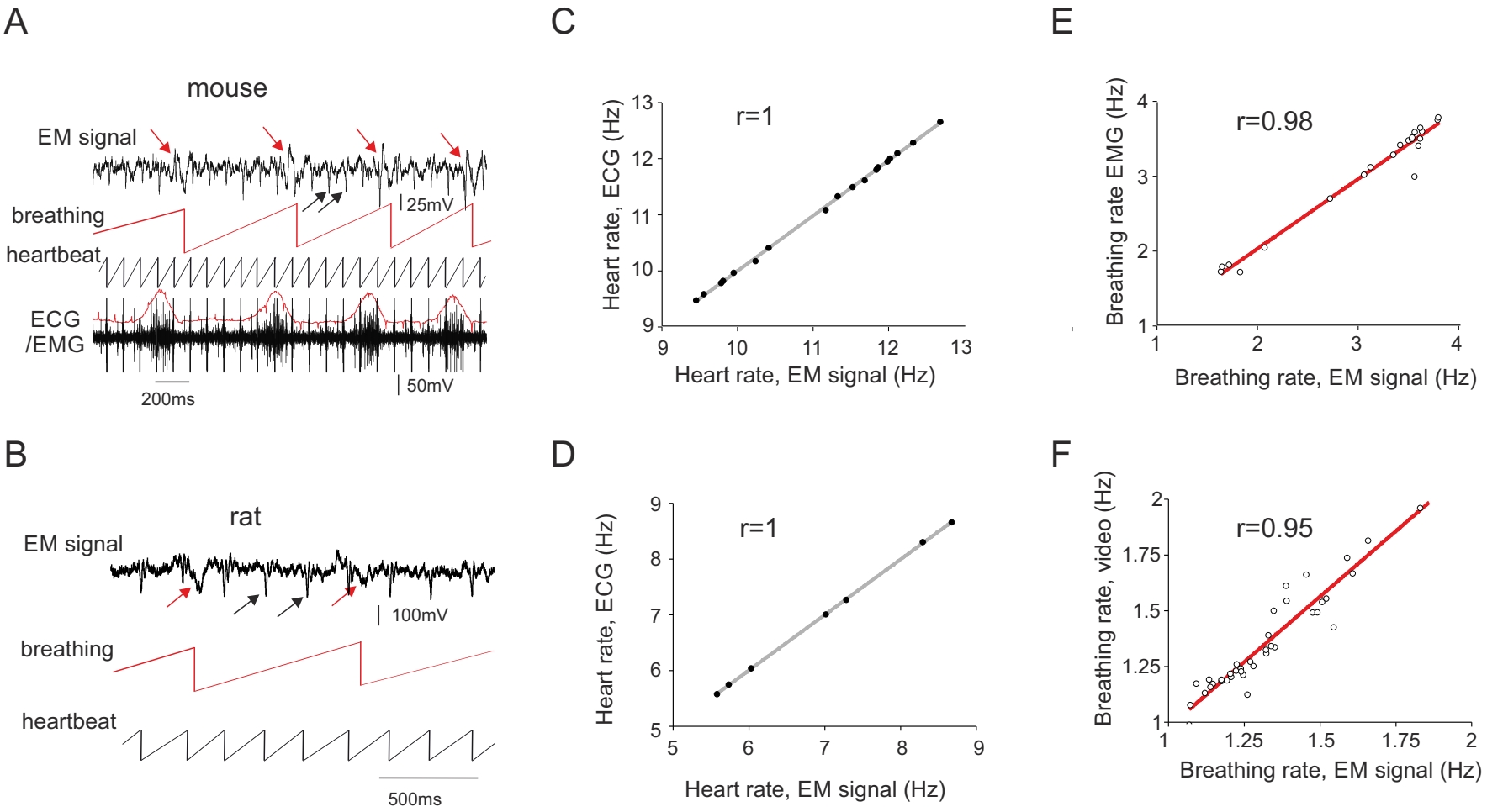


Figure S4: Pressure-sensor-derived monitoring of breathing and heartbeat in presence of litter and objects on the floor-plate

A. Simultaneously recorded electromechanical signal (**EM, upper trace**) and electrocardiogram / electromyogram (**ECG/EMG, lower traces**, also shown as integrated signal in **red**) from a freely moving mouse, in presence of litter and objects on the floor plate. **Upper middle broken lines (in red)**, linearized breathing cycles; **lower middle broken lines (in black)**, linearized heartbeat cycles.

B. Same as in **A** for a freely moving rat (litter and objects on the floor plate), except that ground truth (reference events) for breathing movements was provided by manual tagging of breathing-related movements from the video instead of diaphragm EMG (unavailable in this recording). **Upper trace**, EM signal; **upper middle broken lines (in red)**, linearized breathing cycles; **lower broken lines (in black)**, linearized heartbeat cycles.

C-F. Comparison of heart and breathing rates measured from the EM signal (**X-axis**) and ECG/EMG/video tags (**Y-axis**) in the mouse (**C, E**) and in the rat (**D, F**). Note the tight correlation (**Pearson correlation coefficient**, r>0.95) between EM and ECG/EMG/video tags -derived evaluation of heart and breathing rates.

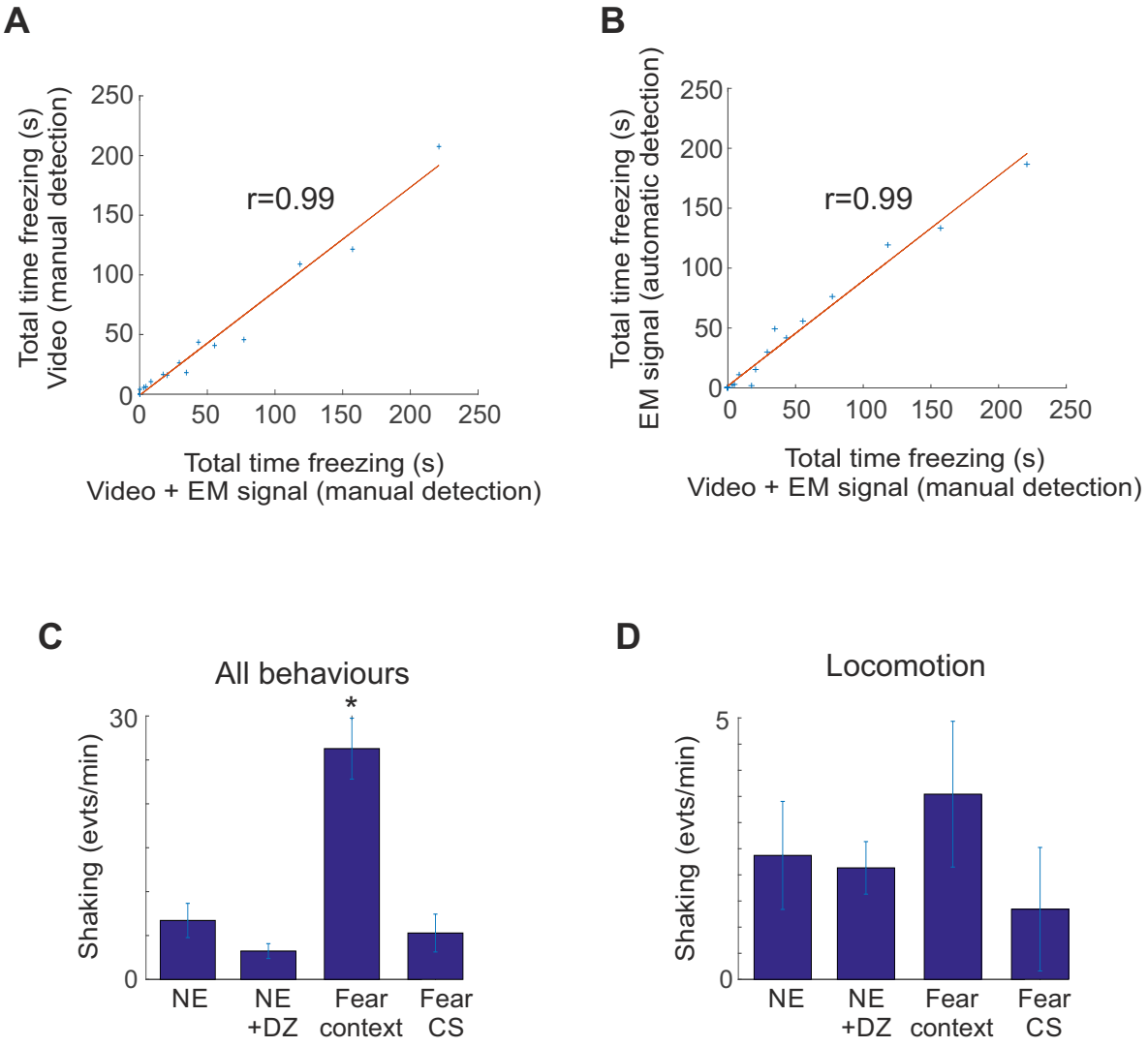


Figure S5: Validation of freezing and shaking detection

A-B. Total freezing duration, quantified both manually using the video and electromechanical (EM) signal (**A**) and automatically from the piezo signal (**B**). Note the tight correlation beetween manual detection from the video (gold standard) and the manual and automatic detections from the EM signal.

C-D. Shaking detected and quantified (events/min, same recordings as in Figure 4E) either during the whole recording (**C**) or only during periods of movement (**D**, locomotion speed

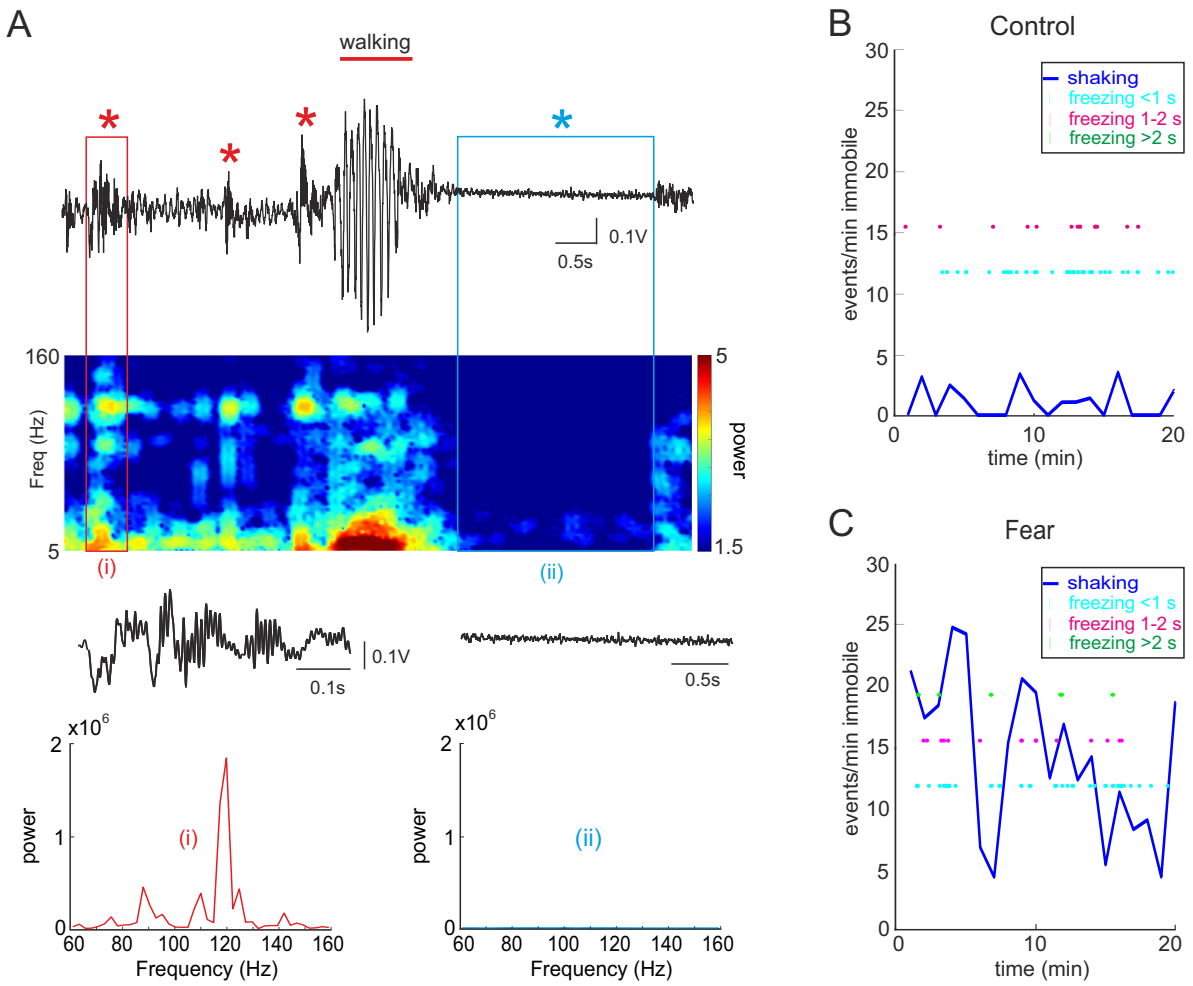


Figure S6: Pressure-sensor-derived detection of fear of predator

A. Electromechanical signal (**top trace**, raw data) and associated time-frequency spectrogram (**underneath color plot**, left scale is frequency range, color scale indicates power) show the presence of both freezing (**blue ***) and 80-130Hz shaking (**red ***) during exposure of a mouse to a predator (a rat behind bars on the side of the open field, so that the mouse can see and smell but not get in direct physical contact with it). Below are shown a single freezing event (**blue box, ii**) vs 65-130Hz shaking event (**red box, i**), displayed at wider time scale above the corresponding Power Density Spectra. Note the high power in the 65-130Hz frequency range during shaking vs the strong drop in power at all frequencies during freezing.

B-C. Time course of occurrence of freezing (color coded **half-circles**) and shaking (**blue line**) events over 20min before (**B, Control**) and during (**C, Fear**) exposition of a freely moving mouse to the predator. Freezing episodes are indicated according to their duration: short (1-2s, in **magenta ticks**) or long (>2s, in **green ticks**). Note the prominent expression of shaking in response to the exposure to a predator.

Résultats

Dans la première publication de mon travail de thèse (Dubanet et al, 2021), nous avons mis en évidence la possibilité de détecter les évènements GABAergiques périsomatiques *in vivo* dans la région CA3 de l'hippocampe par leur signature en tant que potentiels de champs (fIPSPs = field Inihibitory Post Synaptic Potentials). Cette méthologie originale permet d'évaluer de façon totalement non invasive la fonction inhibitrice périsomatique, *in vivo,* ce qui n'était pas possible jusque-là. Dans la suite de ma thèse, j'ai exploité la même approche méthodologique pour explorer l'expression de l'inhibition périsomatique dans le développement précoce et certaines conditions pathologiques neurodéveloppementales. Ces travaux n'étant pas encore assez finalisés pour publication, je vais maintenant les présenter succinctement, sous forme abrégée. La partie méthodologique étant largement décrite dans l'article publié (Dubanet et al, 2021), elle ne sera pas reprise ici.

1. Extension de l'approche des potentiels de champs unitaires GABAergiques au cortex entorhinal médian (MEC), rétrosplénial (RSC) et à l'amygdale baso-latérale (BLA)

A l'issue de l'acceptation du papier dans le journal Cell Reports (Dubanet et al, 2021), l'éditeur du journal associé STAR Protocols (Cell Press), très intéressé par ces résultats, nous a sollicité pour écrire un article méthodologique, ce que nous avons accepté. A cette occasion, j'ai entrepris de clarifier dans quelle mesure la méthodologie développée dans CA3 pourrait être généralisée à d'autres structures cérébrales. J'ai ainsi effectué des enregistrements extracellulaires dans plusieurs structures d'intérêt (**Figure 24**).

Par des enregistrements multisites (silicon probes) *in vivo* sur l'animal anesthésié (souris C57BL/6), j'ai ainsi pu mettre en évidence la présence de fIPSPs spontanés dans le cortex entorhinal médian, le cortex retrosplénial et l'amygdale basolatéral. La fréquence des IPSPs y est variable (très élevée dans le CA3 et le MEC, >300/min, Figure 5.D, moindre dans le RSC et la BLA, <100/min), mais l'inhibition "time locked" associée à ces évènements GABAergiques périsomatiques est dans tous les cas très claire. Cette approche devrait donc permettre l'évaluation d'altérations potentielles de la transmission GABAergique dans divers types de pathologies, au-delà du circuit hippocampique.

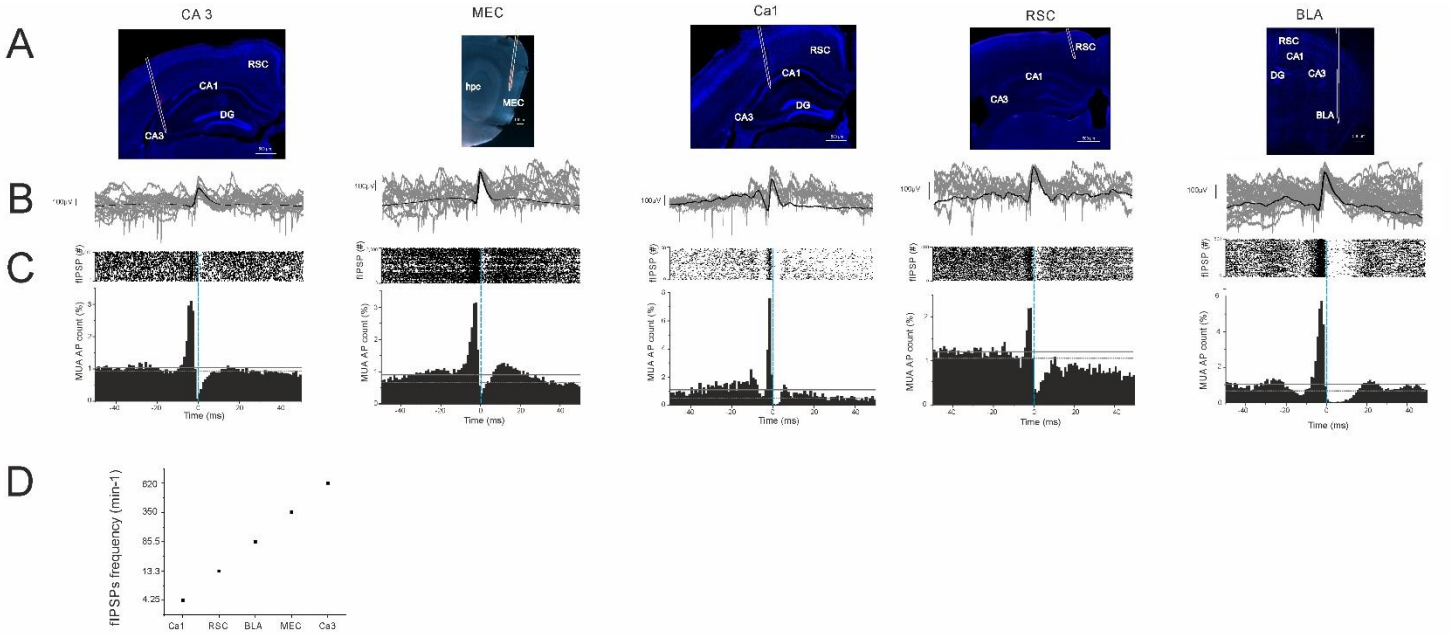


Figure 24 : Spontaneous extracellular field inhibitory postsynaptic potentials (fIPSPs) *in vivo* in several cerebral regions. A. Schematic of electrode track and histological verification of recording location within the different regions: CA3, CA1, retrosplenial cortex (RSC), basolateral amygdala (BLA) and medial entorhinal cortex (MEC) (1,1-dioctadecyl-3,3,3,3-tetramethylindocarbocyanine perchlorate [DiI]-labeled silicon probe in red, DAPI staining in blue). B. Example traces of fIPSPs (gray, superimposed, black, average; scale bar, 100 uV). C. Upper plot. Raster display of spike firing aligned on fIPSP occurrence (vertical blue line, fIPSP peak). Lower plot, normalized peri-event time histogram (time bin, 1 ms) of multi units discharge (MUA AP count) relative to fIPSP peak (reference, vertical blue line). D. Summary plot representing the mean fIPSPs frequency (min-1) in all structures.

J'ai également examiné ce qu'il en était du circuit CA1, considéré comme à la fois différent (absence de connectivité excitatrice récurrente) et semblable (présence des mêmes types cellulaires et notamment d'interneurones aux projections périsomatiques) au circuit de CA3. Des résultats issus d'enregistrements effectués ex-vivo dans une publication précédente de l'équipe (Beyeler et al., 2013), suggèrent que des fIPSPs peuvent être enregistrés dans la région CA1, mais comme évènements isolés, avec une fréquence d'occurrence extrêmement faible. J'ai confirmé ces résultats *in vivo* par l'observation d'une fréquence d'occurrence très faible, mais par contre, de façon intéressante, j'ai remarqué que les fIPSPs semblaient clairement associés aux "oscillations" à haute fréquence typiques de l'activité hippocampique que sont les ripples. Afin d'approfondir la question, j'ai étudié spécifiquement la relation entre fIPSPs et ripples, selon une double approche développementale et chimiogénétique.

2. Ripples et potentiels de champs unitaires GABAergiques dans les régions CA1 et CA3

Des résultats publiés suggèrent que les interneurones PV joueraient un rôle essentiel dans la génération des ripples (Stark et al., 2014), mais les arguments expérimentaux ne sont pas totalement convaincants. D'une part les oscillations déclenchées par l'activation expérimentale d'interneurones PV présentaient une fréquence sensiblement inférieure à celle des ripples spontanées (autour de 100Hz au

lieu de 150Hz), et d'autre part lors du blocage des interneurones PV qui bloquait effectivement l'expression des ripples, les contrôles n'ont pas été effectués afin de s'assurer que la disparition des ripples ne pouvait être due à un changement global de l'activité cérébrale (brain state) dans un mode sans ripple (par exemple épileptiforme), au-delà du simple blocage de l'inhibition périsomatique. Pour clarifier la question des relations entre inhibition périsomatique et ripples, j'ai utilisé 2 stratégies. D'une part, j'ai examiné si l'émergence de l'inhibition périsomatique (fIPSPs) coïncidait avec celle des ripples dans les circuits CA1 et CA3, et d'autre part j'ai effectué des enregistrements bilatéraux dans CA1 avec un blocage unilatéral des interneurones PV, permettant de s'assurer qu'une disparition locale des ripples n'était pas due à un changement global d'état cérébral.

Un autre intérêt de l'approche développementale était la possibilité de potentiellement résoudre la question d'une expression transitoire d'un GABA excitateur aux phases précoces du développement, bien établie ex vivo mais controversée *in vivo*. L'approche des fIPSPs, selon l'âge auquel ils apparaissent au cours du développement, pourrait éventuellement résoudre la question de la polarité de la transmission GABAergique au cours du développement. Nous avons donc décidé d'effectuer deux séries d'enregistrements. Une première série d'enregistrements conjoints dans CA3 et CA1 au fil du développement, afin de déterminer le profil développemental des fIPSPs et de l'apparition des ripples dans les circuits de CA3 et CA1, et une deuxième série à l'âge adulte avec une stratégie d'inhibition chimiogénétique des interneurones PV locaux (i.e. spécifiquement soit dans CA3, soit dans CA1) afin de clarifier leurs relations avec les ripples.

Comme illustré dans la **Figure 25**, les fIPSPs sont absent du circuit de CA3 jusqu'au 6e jour post-natal. Leur apparition se fait à partir du jour 7 dans la région CA3a de l'hippocampe, à une fréquence comprise entre 2 et 50 évènements par minutes (n=4 souris). De plus, on note la présence de spikes dans les fIPSPs qui pourraient indiquer une immaturité de l'inhibition GABAergique périsomatique. L'émergence de l'inhibition "time locked" se fait de manière progressive jusqu'à p18 (fréquence ~300 fIPSPs/min) où elle reste encore inachevée puisqu'on note une fréquence moyenne d'environ 500 fIPSPs/min chez l'adulte (p>60 ; n=6 souris).

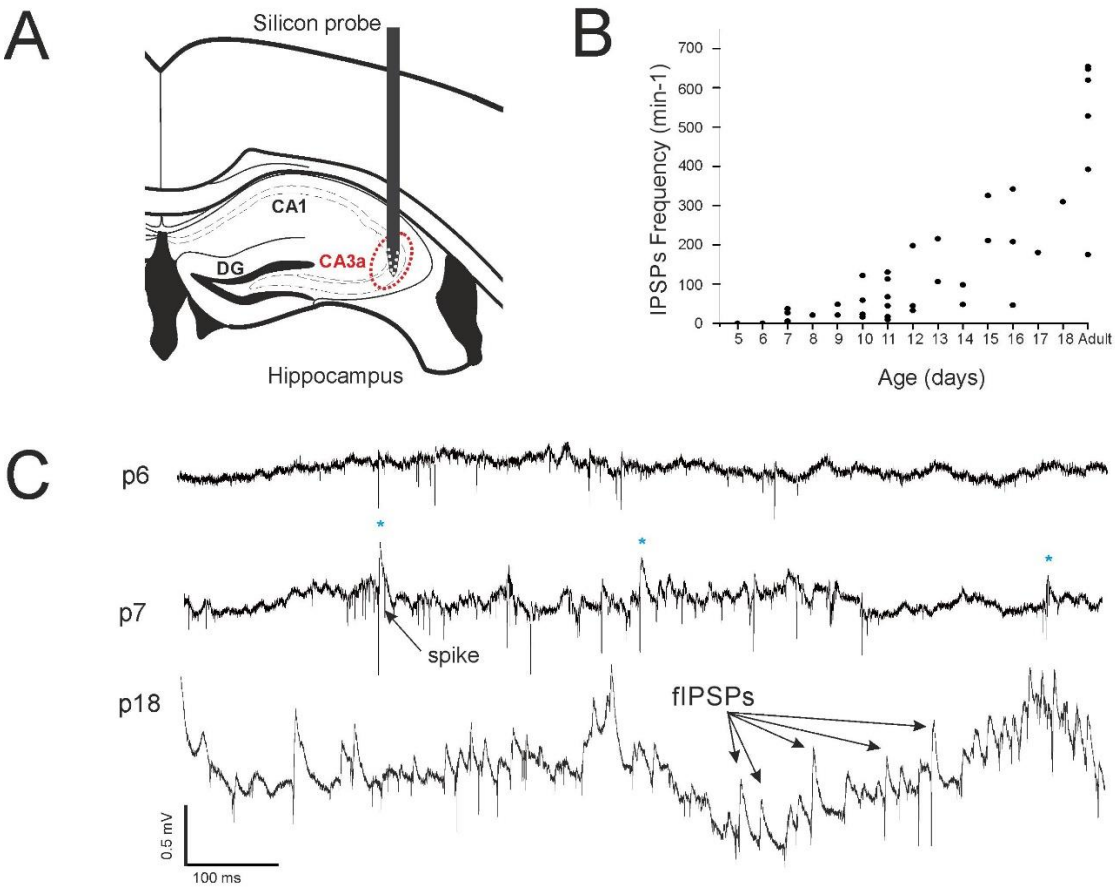


Figure 25 : Developmental emergence of fIPSPs in CA3. A. Schematic representation of an electrode in a specific subregion of Ca3 (red circle). B. Plot representing the total fIPSPs frequency throughout the development. C. Example trace of spontaneous wide-band (0.1Hz–9KHz) field-recording activity in the CA3 pyramidal layer in representative p6, p7, p18 subjects (scale bars, 100 ms, 0.5 mV; each blue asterisk represents a fIPSP). Note the emergence of fIPSPs at P7 and the progressive increase in their frequency of occurrence throughout development.

De manière intéressante, en plus de l'émergence des fIPSPs à p7 on a observé une apparition concomitante des ripples dans le CA3 (p5-6 : 0/min, n=5 ; p7-9 : ~0.2/min, n=8) (**Figure 26**), se traduisant par une tâche isolée clairement définie dans le spectrogramme associé à un pic de puissance proche des 100 Hz dans le PSD, caractéristique des ripples. Toutefois aux stades les plus précoces, on note l'expression de "proto ripples" caractérisées par une expression moins bien définie du pic de puissance dans le spectrogramme. Développementalement, les proto ripples représentent la majorité des évènements entre p7 et p12 (p7-9 : ~80%, n=8 ; p10-12 : ~70%, n=13) avant de disparaitre soudainement à p13 (p10-12 : ~8%, n=6 ; p16-18 : ~1%, n=6) où l'on observe en grande partie des ripples. De plus, la fréquence totale de ripples, comprenant les ripples claires et les proto ripples, est multipliée par 4 entre p7-9 et p10-p12 (p7-9 : 0.2/min, n=8 ; p10-12 : ~0.9/min, n=13) et subit une augmentation rapide (x3) à p13 (p13-15 : ~2.7/min, n=6 ; p16-18 : ~2.9/min, n=6). Cette augmentation soudaine semble correspondre avec la disparition brusque des proto ripples.

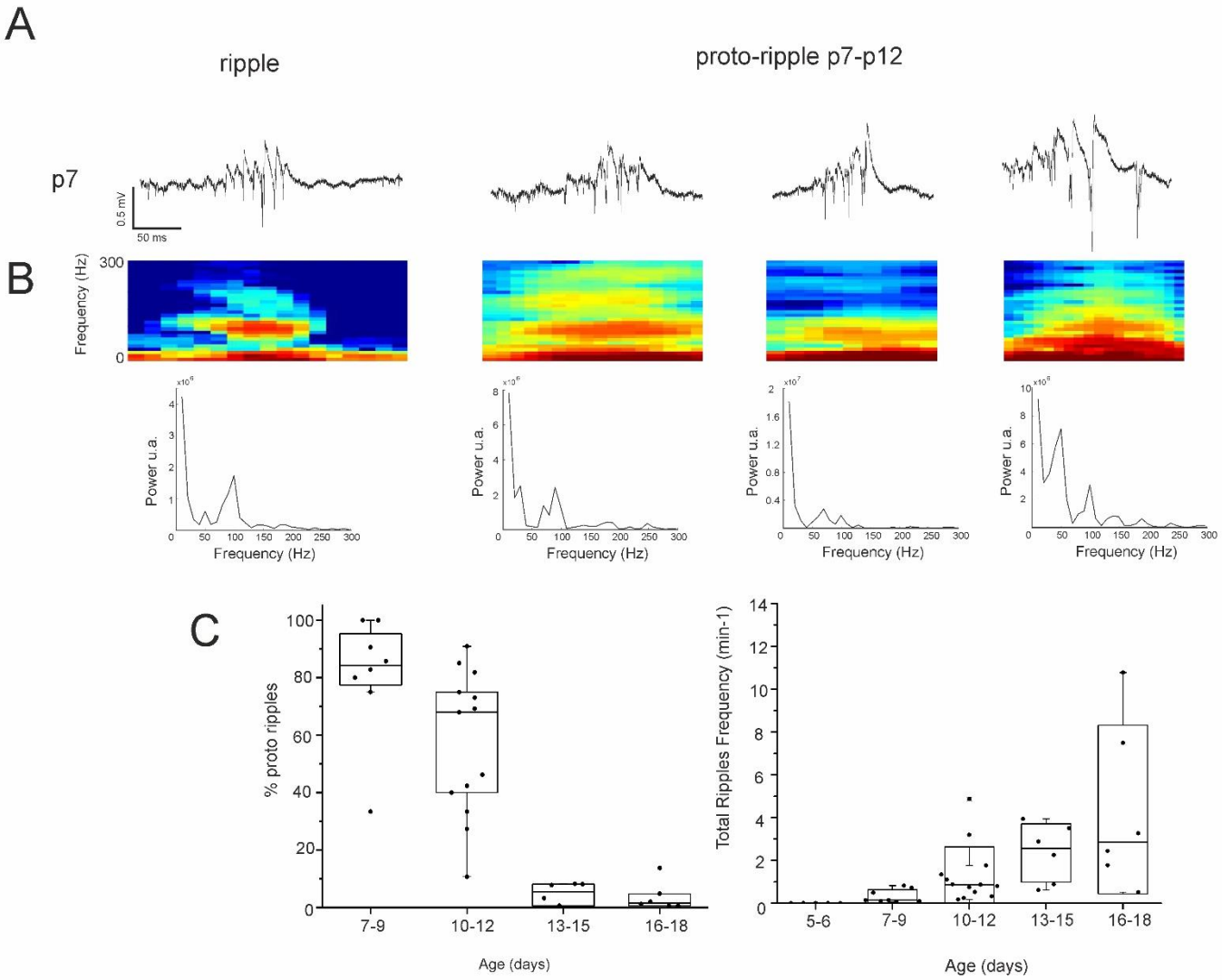


Figure 26 : Developmental emergence of ripples in CA3. A. Wide-band (0.1 Hz-9 KHz) traces of field recording activity in the CA3 pyramidal layer (scale bars, 0.5 ms, 0.5 mV). Representative ripple at p7 (Left trace) and example of proto ripples between p7 and p12 (right traces). B. Signal decomposition in time frequency spectrogram (top panel) and power spectral density (PSD) (bottom panel) of each trace. Note the pic at the main ripple frequency (70-100Hz). C. Box plot representing the percentage occurrence of proto ripples (left panel) and the total ripples frequency (right panel) throughout the development. Note the progressive emergence of ripples at P7 and the abrupt disappearance of proto ripples at P13.

De façon intéressante, nous avons observé une corrélation similaire dans la région CA1 (**Figure 27**), mais de façon décalée dans le temps. On y note en effet l'apparition de ripples à partir de p11 (p9-10 = 0/min, n=4 ; p11-12 : ~0.2/min, n=7), avec comme dans le CA3, une proportion initialement majoritaire de proto ripples durant les premiers jours. Ces dernières disparaissent rapidement à p13-14 (~25%, n=4) pour atteindre un taux inférieur à 10% à p15 (n=6). Inversement, la fréquence totale de ripples augmente drastiquement à p13-14 (~7/min, n=4), âge auquel l'expression de proto ripples disparait.

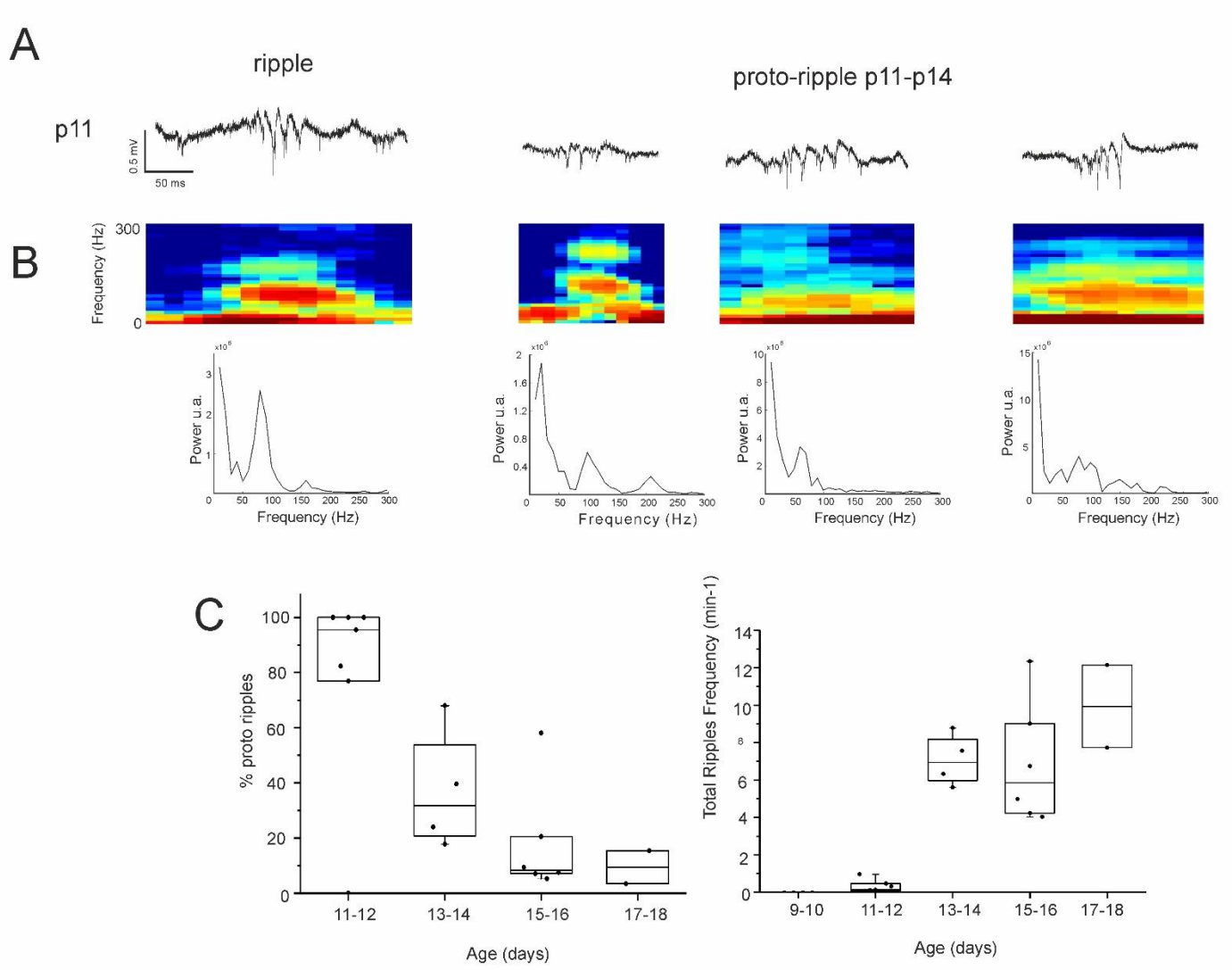


Figure 27 : Developmental emergence of ripples in CA1. A. Wide-band (0.1 Hz-9 KHz) traces of field recording activity in the CA1 pyramidal layer. Representative ripple at p11 (Left trace) and example of proto ripples between p11 and p14 (right traces). B. Signal decomposition in time frequency spectrogram (top panel) and power spectral density (PSD) (bottom panel) of each trace. Note the pic at the main ripple frequency (70-100Hz). C. Box plot representing the percentage occurrence of proto ripples (left panel) and the total ripples frequency of occurrence (right panel) throughout the development. Note the abrupt emergence of ripples at P13 and the progressive disappearance of proto ripples from P11 to P18.

L'émergence de fIPSPs dans CA1 semble coïncider avec celle des ripples, mais dans la mesure où les fIPSPs sont de toute façon très rarement exprimés dans CA1 hors des ripples, nous avons décidé de recourir à une stratégie chimiogénétique d'inhibition des interneurones PV dans un modèle de souris transgénique PV-Cre avec l'aide d'une construction DREADDs inhibitrice, AAV9-hSyn-DIO-hM4D(Gi)-mCherry (Krashes et al., 2011) (**Figure 28**). Pour cela nous avons injecté la construction viruale unilatéralement et enregistré bilatéralement dans le CA1. L'application du ligand (Clozapine N-Oxide, sous-cutané) entraine une suppression des ripples dans le côté ipsilatéral (n=5 souris, $p<0.05$ t-test pour échantillon appariés). Comme observé dans une précédente publication (Stark et al., 2014), nous avons observé une disparition des ripples suite au blocage des interneurones PV, mais par contre nous n'avons pas observé de modification notable de l'état du réseau en terme de fréquence globale de décharge, confirmant ainsi la relation entre fIPSPs et ripples dans CA1. De plus, les enregistrements bilatéraux nous ont permis d'une part de s'assurer que le ligand chimiogénétique n'affectait pas l'expression des ripples hors de la zone d'inhibition des interneurones PV, et d'autre part de montrer que les bouffées de potentiels d'actions qui accompagnent les ripples (ici contralatérales) sont toujours observées du côté ipsilatéral après le blocage local des ripples, mais sous forme désorganisée, n'étant plus associées aux cycles discrets au sein des ripples. Ces résultats mettent en évidence l'importance du rôle des interneurones PV dans la genèse des ripples, mais également dans l'organisation temporelle des décharges neuronales à l'intérieur de celles-ci.

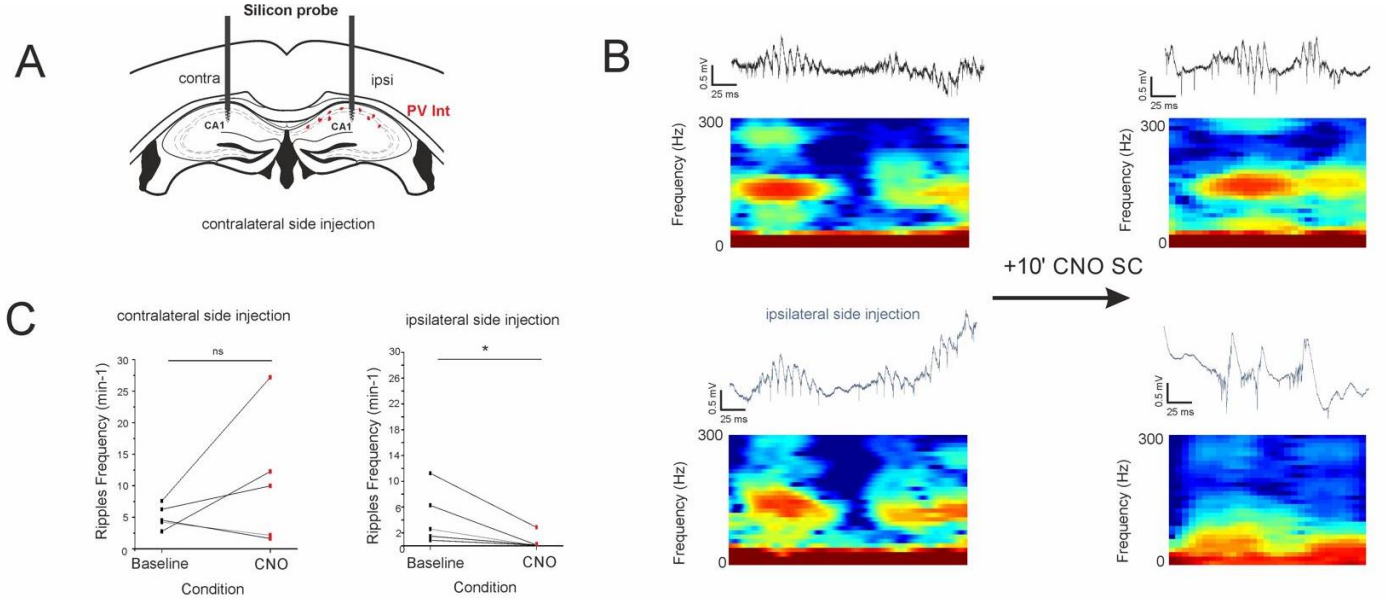


Figure 28 : Suppression of ripples by chemogenetic inactivation of PV interneurons in CA1. A. Schematic representation of an electrode and injection site in PV-Cre mice with AAV-driven hM4D(Gi) and mCherry expression in CA1 PV interneurons (left panel). B. Wide-band (0.1 Hz-9 KHz) traces of field recording activity in the CA1 pyramidal layer (scale bars, 0.25 ms, 0.5 mV) and decomposed signal as time frequency spectrogram (below) in ipsilateral (dark traces) and contralateral (blue traces) side before and after subcutaneous Clozapine N-Oxide injection. C. Summary plots (mean ± SD, n = 5 mice) of ripples frequency (ipsilateral: left; contralateral: right) in control (baseline) and in the presence of CNO (*$p<0.05$).

3. Potentiels de champs unitaires GABAergiques et altérations neurodéveloppementales de l'inhibition périsomatique dans la région CA3

Enfin, dans un dernier temps je me suis intéressé à l'étude d'un certains nombres de modèles pathologiques où l'on soupçonne une altération de l'inhibition périsomatique. En effet, des expériences *in vitro* et *in vivo* réalisées dans des modèles pathologiques de développement neurologique ont proposé que la maturation défectueuse de la transmission synaptique GABAergique, avec la persistance du GABA excitateur jusqu'à l'âge adulte, pourrait être une cause principale de l'évolution physiologique et comportementale défavorable. Cependant, la fiabilité de l'évaluation *in vitro* de la polarité (c'est-à-dire excitatrice ou inhibitrice) de la transmission GABAergique a été remise en question, et la pertinence directe des résultats *in vitro* pour les conditions *in vivo* reste à étudier de manière directe. Afin de tester l'hypothèse d'une altération de la transmission GABAergique par une approche directe et physiologique, nous avons tiré parti de l'approche informative et non invasive des enregistrements extracellulaires multi-sites, avec lesquels nous avons commencé à étudier, comme décrit dans le papier Dubanet et al. 2021, l'incidence des fIPSPs sur la décharge de neurones du circuit hippocampique mais également les interactions directes (mono-synaptiques) entre les cellules pyramidales et les interneurones de l'hippocampe.

Cette technique nous permet d'accéder à l'activité neuronale avec une précision de l'ordre du millième de seconde tout en préservant le gradient Cl- intact. Les enregistrements à l'aide d'électrodes multi-sites et l'analyse du tri des spikes (décharges neuronales) permettent d'enregistrer l'activité de plusieurs neurones, avec une résolution de cellule unique. Il est intéressant de noter que le nombre de connexions testées croît de façon exponentielle avec le nombre de cellules enregistrées simultanément : comme chacune des N cellules enregistrées simultanément interagit potentiellement avec chacune des N-1 autres cellules, le nombre de connexions testées est de Nx(N-1). Cela constitue donc un avantage considérable de pouvoir enregistrer plusieurs neurones simultanément. Enfin, sur la base de la forme des spikes et de leur autocorrélogramme, nous pouvons également discriminer les cellules pyramidales individuelles des interneurones.

Les résultats obtenus, et en cours d'analyse, sont les suivants :

-Trouble de la voie de la polarité planaire et cellulaire

Un groupe de 6 souris (3 WT et 3 vangl2-KO) a été entraîné pendant 8 semaines à effectuer une tâche locomotrice dépendant du contexte sur une roue de course. Cette tâche s'est avérée plus difficile que prévu. Contrairement à toutes les souris WT, aucune des souris vangl2-KO ne s'est avérée capable de réaliser la tâche. Nous avons donc décidé d'enregistrer à partir d'animaux anesthésiés. Nous avons enregistré l'activité de l'hippocampe avec 2 éléctrodes insérées dans les régions CA3 et DG/hilus de 20 souris (11 contrôles et 9 vangl2-KO). L'état d'anesthésie permet des conditions de stabilité

d'enregistrement si favorables que nous avons identifié la décharge d'un total de plus de 2600 neurones (provenant vraisemblablement de 7 types cellulaires distincts), fournissant un total de plus de 70 000 connexions synaptiques (à partir de neurones enregistrés simultanément et dont nous pouvons maintenant étudier les interactions monosynaptiques présumées). Les détails sont les suivants :

- chez les animaux témoins, 1 187 neurones DG (dont 312 cellules granulaires (CG), 515 cellules moussues (CM) et 192 interneurones (Int)) et 535 neurones CA3 (dont 269 cellules pyramidales (pyr) et 47 interneurones), pour un total de **54 332** connexions monosynaptiques (dont 19 252 au sein de DG, 8 559 au sein de CA3 et 26 521 entre DG et CA3)
- chez les souris vangl2-KO, 602 neurones DG (dont 90 CG, 264 CM et 81 Int) et 290 neurones CA3 (dont 165 pyr et 26 int), pour un total de **20 300** connexions monosynaptiques (dont 7 097 à l'intérieur de DG, 3 687 à l'intérieur de CA3 et 9 516 entre DG et CA3).

-Modèles de trouble du spectre autistique

Nous avons enregistré l'activité unitaire de plusieurs modèles de troubles du spectre autistique et de leurs contrôles.

Pour le modèle valproate (n=12) et son contrôle (n=6, injection de solution saline au lieu du valproate), nous avons identifié un total de plus de 500 neurones (provenant vraisemblablement de 2 types cellulaires distincts), fournissant un total de plus de 16 500 connexions synaptiques. Les détails sont les suivants:

- chez les animaux témoins, 218 neurones CA3 (dont 193 cellules pyramidales et 19 interneurones) pour un total de 7 232 connexions monosynaptiques.
- chez les animaux traités au valproate, 318 neurones CA3 (dont 274 cellules pyramidales et 25 interneurones) pour un total de 9 434 connexions monosynaptiques.

Pour le modèle FMR1-KO (n=11) et ses contrôles (n=8, animaux FMR1-WT), nous avons identifié un total de plus de 300 neurones, fournissant un total de plus de 5 800 connexions synaptiques. Les détails sont les suivants:

- chez les animaux FMR1-WT, 144 neurones CA3 (dont 161 cellules pyramidales et 19 interneurones) pour un total de 3 078 connexions monosynaptiques.
- chez les animaux FMR1-KO, 183 neurones CA3 (dont 274 cellules pyramidales et 25 interneurones) pour un total de 2 872 connexions monosynaptiques.

Pour le modèle BTBR (n=12) et ses contrôles (n=3, animaux de type sauvage c57bl6), nous avons identifié un total de 349 neurones, fournissant un total de plus de 8 000 connexions synaptiques. Les détails sont les suivants:

- chez les animaux de type sauvage, 47 neurones CA3 (dont 42 cellules pyramidales et 4 interneurones) pour un total de 730 connexions monosynaptiques.

- chez les animaux BTBR, 296 neurones CA3 (dont 256 cellules pyramidales et 27 interneurones) pour un total de 7 692 connexions monosynaptiques.

-Modèle du syndrome de Down

Nous avons enregistré l'activité de l'hippocampe de souris transgéniques Dp1Yey et de leurs congénères WT.

Pour Dp1Yey-KO (n=7) et Dp1Yey-WT (n=5), nous avons identifié un total de plus de 400 neurones, fournissant un total de plus de 11 500 connexions synaptiques. Les détails sont les suivants

- chez les animaux témoins, 164 neurones CA3 (dont 193 cellules pyramidales et 19 interneurones) pour un total de 3 440 connexions monosynaptiques.
- chez les animaux Dp1Yey, 239 neurones CA3 (dont 274 cellules pyramidales et 25 interneurones) pour un total de 8 338 connexions monosynaptiques.

Selon l'hypothèse du GABA excitateur, on pourrait s'attendre à observer une excitation monosynaptique des neurones pyramidaux déclenché par la décharge des interneurones pré-synaptiques, qui se traduirait par un pic de courte latence dans le crosscorrélogramme entre les décharges des paires interneurone-cellule pyramidale.

	CA3										
	Pyr-Pyr	Pyra-Int	Pyra-Unk	Inter-Int	Inter-Pyr	Inter-Unk	Unk-Unk	Unk-Pyr	Unk-Int	Total	
Valproate	7584	489	361	40	489	40	30	361	40	9434	
Saline	5534	589	209	46	589	24	8	209	24	7232	
FMR1-KO	2284	234	37	32	234	7	0	37	7	2872	
FMR1-WT	2664	150	46	16	150	2	2	46	2	3078	
BTBR	6132	523	205	36	523	25	18	205	25	7692	
Wild Type	570	58	16	6	58	3	0	16	3	730	
Dp1Yey-WT	1886	370	256	70	370	52	128	256	52	3440	
Dp1Yey-KO	5694	836	359	120	836	57	20	359	57	8338	
CamVangl2-WT	6566	1058	600	184	1058	89	62	600	89	10306	
CamVangl2-KO	2844	474	211	84	474	38	36	211	38	4410	
										57532	
	Dentate gyrus										
	Granul-granul	Mossy-mossy	Unk-unk	Int-int	Granul-mossy	Granul-unk	Granul-int	Mossy-unk	Mossy-int	Int-unk	Total
CamVangl2-WT	3326	8962	594	624	554	838	740	1417	1774	423	19252
CamVangl2-KO	740	3318	662	182	155	298	185	739	590	228	7097
											26349

Tableau résumant toutes les connexions monosynaptiques à évaluer dans divers modèles de troubles neurodéveloppementaux. Pyr= pyramide, Int=interneurone, Unk=Inconnu

Ces résultats sont encore en cours de traitement pour une quantification automatisée, mais nous pouvons déjà dire que les altérations observées sont plutôt inattendues, n'indiquant pas d'interactions excitatrices entre interneurones et cellules pyramidales contrairement à ce qui a été montré dans les études *in vitro*.

DISCUSSION GENERALE

Dans l'hippocampe, le fonctionnement des circuits neuronaux repose sur des interactions complexes entre cellules pyramidales glutamatergiques excitatrices et divers types d'interneurones GABAergiques inhibiteurs. L'altération des interactions synaptiques entre cellules pyramidales et interneurones de l'hippocampe est à la base de nombreuses pathologies telles que l'épilepsie ou certains troubles neurodéveloppementaux (TSA, Syndrome de Down). Les interneurones exerçant une inhibition périsomatique semblent jouer un rôle important dans l'équilibre du circuit pour éviter que l'excitation réciproque entre cellules pyramidales ne dégénère mais aussi dans le codage de l'information. Aujourd'hui, on connait mal leur rôle exact car il est très difficile de l'étudier *in vivo*. Durant ma thèse, je me suis intéressé au développement de la fonction inhibitrice périsomatique et aux altérations du circuit hippocampique et du phénotype comportemental associés aux troubles neurodéveloppementaux chez la souris.

Ma thèse s'est donc articulée sur 3 aspects :

1. Une nouvelle approche méthodologique permettant d'évaluer l'inhibition périsomatique dans le circuit adulte normal et pathologique, appliquée initialement à l'étude de l'épileptogénèse, puis à différentes pathologique neurodéveloppementales
2. Etude des relations entre l'inhibition périsomatique et les ripples dans les régions CA3 et CA1 de l'hippocampe, chez l'adulte et au cours du développement
3. Validation d'un nouveau dispositif de phénotypage comportemental qui permet entre autres de détecter l'expression d'altérations motrices et émotionnelles dans les troubles neurodéveloppementaux.

1 : Evaluation de la transmission GABAergique périsomatique via les fIPSPs dans le CA3

La première partie de ma thèse a consisté à mettre en évidence que la réponse post-synaptique directe des cellules pyramidales de l'hippocampe à la transmission GABAergiques périsomatique dans le CA3 peut être enregistrée de manière extracellulaire *in vivo*, en tant que potentiel post-synaptique inhibiteur de champ (fIPSP). La détection automatique de ces évènements est basée sur des critères de cinétiques du signal, dont un « rise time » (c'est-à-dire le temps pour atteindre le pic) très rapide de l'ordre de 2 à 3ms (**Figure 29**) semble une condition *sine qua non* d'obtention d'une inhibition effective.

Notre hypothèse est que les fIPSPs détectés localement c'est-à-dire proche de notre électrode d'enregistrement possèdent un rise time rapide et les fIPSPs plus lointains des cinétiques plus lentes, qui pourrait s'expliquer par le filtrage tissulaire du signal en fonction de la distance, à l'instar des IPSPs enregistrés en intracellulaires dont les cinétiques sont plus rapides lorsqu'ils sont somatiques que lorsqu'ils sont plus distants du soma et filtrés par l'arbre dendritique. On sait que les cellules en panier

ont une innervation très dense mais très circonscrite, locale. Il est donc important de détecter uniquement les fIPSPs correspondant à l'inhibition locale contrairement aux fIPSPs (avec un rise time plus long) émis à distance qui exercent une inhibition qui n'est pas dans notre champ d'enregistrement.

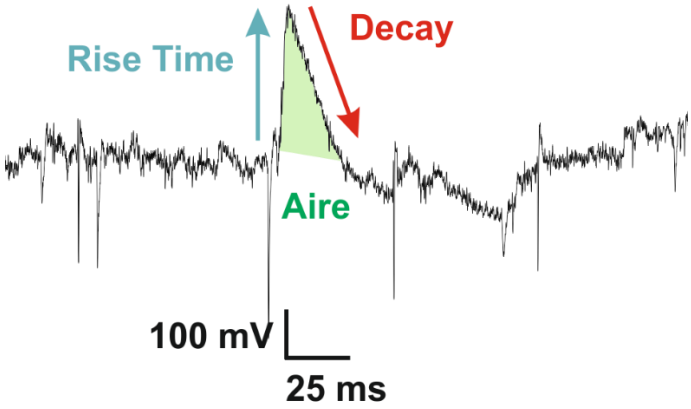


Figure 29 : Les paramètres de détection des fIPSPs utilisés avec le logiciel Mini Analysis. Enregistrement *in vivo* extracellulaire du CA3 de l'hippocampe avec un fIPSPs. Les paramètres utilisés pour la détection sont le rise time, le decay et l'aire.

2 : L'inhibition GABAergique périsomatique durant le développement

La question de la polarité de la transmission GABAergique durant le développement *in vivo* reste irrésolue. D'un côté il a été montré dans le cortex chez la souris que la stimulation optogénétique des interneurones exprimant la GAD *in vivo* de P3 à P8 entrainait une diminution de la fréquence de décharge des évènements excitateurs (Valeeva et al., 2016) mettant en évidence une nature inhibitrice du GABA. De l'autre côté (Murata et Colonnese, 2020) ont montré qu'une réduction de l'excitabilité des interneurones dans le CA1 à P3 est associée à une diminution de l'activité globale hippocampique, alors qu'à P7 la réduction de l'excitabilité des interneurones est associée à une augmentation de l'activité de l'hippocampe, mettant en évidence un effet excitateur du GABA durant les premiers jours postnataux. Durant ma thèse, nous avons voulu aborder la question en évaluant la polarité des fIPSPs et les réponses post-synaptiques durant les premiers jours postnataux. Nous avons observé que les fIPSPs apparaissent à partir du 7ème jour postnatal ce qui ne nous permet pas d'éclaircir la question des stades très précoces du développement auxquels le GABA serait potentiellement excitateur. Toutefois, de nombreuses études suggèrent un retard de la maturation GABAergique dans plusieurs pathologies neurodéveloppementales dont l'autisme, le syndrome de Down ou encore l'épilepsie (Ben-Ari, 2017 ; Moore et al., 2019 ; Pisella et al., 2019 ; He et al., 2014 ; Deidda et al., 2015). L'approche des fIPSPs, validée dès P7 dans le CA3, pourrait constituer un outil efficace pour évaluer un potentiel retard de

maturation dans ces pathologies, dans lesquelles une altération voire une inversion de la transmission GABAergique est suspectée.

Nos enregistrements électrophysiologiques simultanés dans le CA1 et CA3 *in vivo* chez la souris anesthésiée suggèrent une apparition plus précoce des ripples et des fIPSPs dans le CA3 (p7) que dans le CA1 (p11). La question sur l'apparition des ripples dans le CA1 a déjà largement été étudiée chez le rat (Leinekugel et al., 2002 ; Buhl et Buzsaki., 2005), en revanche peu ou pas d'études n'ont été réalisé à ma connaissance sur le développement des ripples dans le CA3. Cette apparition conjointe des ripples et des fIPSPs soutient l'hypothèse que les interneurones PV sont impliqués dans la génération des ripples. De façon intéressante, l'analyse histologique des terminaisons des interneurones destinées à exprimer la parvalbumine (marquage Synaptotagmin 2) dans le CA1 et dans le CA3 ne semble pas coïncider avec nos résultats puisque l'on observe une augmentation abrupte de l'arborisation axonale périsomatique entre P3 et P5 dans le CA3 (**Figure 30**, A. Baude, personal communication) et à P9 dans le CA1 (Dard et al., 2022), alors que nos observations relèvent une émergence des fIPSPs et des ripples 2 jours plus tard, dans CA3 comme dans CA1.

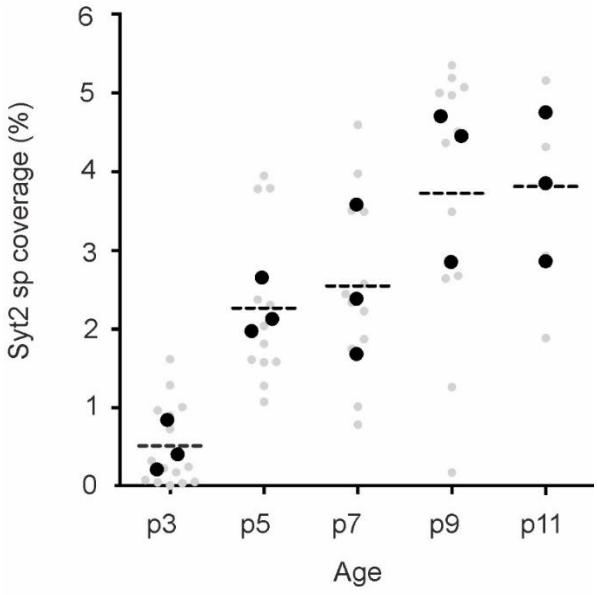


Figure 30 : Emergence de l'innervation de l'inhibition perisomatique GABAergique dans le CA3.
Fraction de la couche cellulaire pyramidale couverte par un marquage Synaptotagmine 2 positif en fonction de l'âge. Chaque point gris représente le pourcentage moyen de recouvrement pour deux images prise par coupe. Les points noirs représentent la valeur moyenne de l'ensemble des coupes par animal.

Nous pouvons faire l'hypothèse soit que le système inhibiteur ait besoin d'atteindre un seuil supérieur de développement pour se traduire en inhibition collective synchrone, soit que le gradient Cl- rende les fIPSPs invisibles dans une période initiale. Des études complémentaires d'activation contrôlée des interneurones et d'enregistrement des réponses post-synaptiques par exemple sur des neurones hyperpolarisés ou dépolarisés (pour s'assurer que leur potentiel de repos ne soit pas à l'inversion des courants GABA-A) seront nécessaires pour résoudre la question.

3 : L'inhibition GABAergique périsomatique et le codage neuronal

Durant ma thèse j'ai pu mettre en évidence grâce à une technique chimiogénétique que lors de l'inhibition des interneurones PV dans le CA1, l'oscillation qui accompagne normalement les ripples était supprimée mais pas la décharge neuronale, qui se produit bien mais de façon désorganisée. Les interneurones PV joueraient ainsi le rôle de chef d'orchestre durant les ripples où il permettrait via les oscillations de contrôler temporellement les décharges des assemblées cellulaires. Il serait intéressant de savoir si les interneurones PV jouent le même rôle dans les ripples de CA3. J'ai tenté d'appliquer la même méthode, mais pour une raison inconnue, l'expression des DREADDs n'a pas permis l'inhibition des interneurones PV dans la région CA3 hippocampique. Nous prévoyons d'utiliser un autre outil chimiogénétique (PSAM-GlyR) qui a déjà fait preuve de son efficacité dans CA3, bien que des problèmes d'approvisionnement et de correspondance entre le récepteur et le ligand (PSEM) nous aient empêché jusque-là de mener ces expériences à bien.

De plus, lors du développement nous avons observé une précocité du circuit CA3 dans la génération des ripples par rapport au circuit CA1. Ainsi, les décharges observées dans CA1 entre P7 et P11 en réponse aux ripples de CA3 ressemblent à celles observées lorsque nous avons inhibé les PV chez l'adulte, c'est à dire une bouffée d'activité qui semble désorganisée (**Figure 31**).

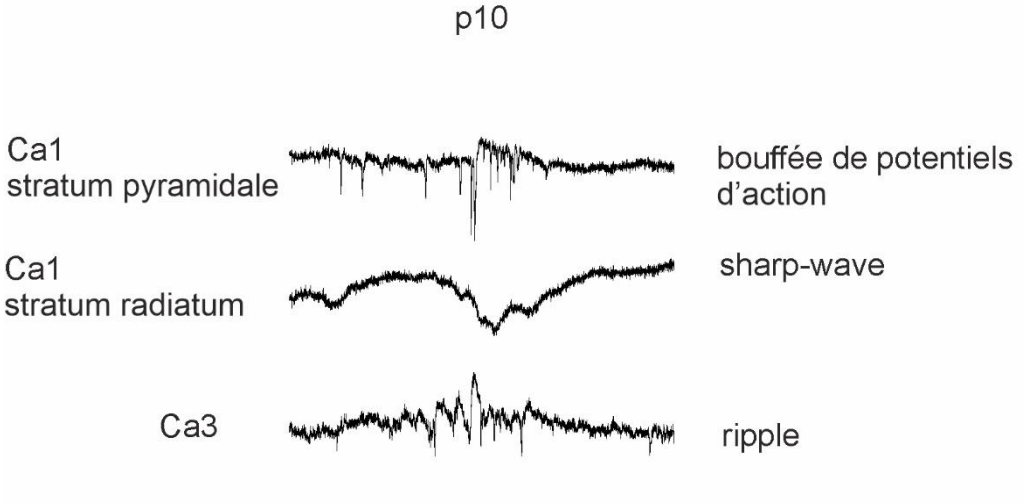


Figure 31 : Différence de maturité de ripples à p10. Exemple de tracé électrophysiologique *in vivo* extracellulaire dans le CA3, CA1 (sp + sr). On note la ripple (ou proto ripple) dans le CA3, la Sharp-wave dans le stratum radiatum et une bouffée de spike dans le CA1.

Une publication récente (Farooq et Dragoi 2019) suggère que l'expression de séquences neuronales correspondant à des trajectoires dans un environnement physique exploré n'apparaitrait dans les ripples de CA1 qu'entre P19 et P23. Il serait intéressant de regarder si des séquences commencent à être exprimées dans les circuits de CA3 et CA1 lors de l'émergence des ripples (i.e. dès P7 dans CA3, P11 dans CA1), et si c'est le cas, si leur expression serait sensible au blocage des interneurones responsables de leur génération. Toutefois pour réaliser ce genre d'expériences nous devons avoir

suffisamment de neurones lors de nos enregistrements ce qui n'est pas forcément chez la souris. Le développement de modèle transgénique chez le rat nous permettrait de réaliser la même expérience en obtenant une quantité de neurones bien plus conséquente.

De plus, après avoir démontré l'importance des interneurones PV dans la genèse des ripples et la synchronisation des décharges neuronales à l'intérieur de celle-ci, il pourrait être intéressant d'observer l'impact de cette suppression dans différentes tâches cognitives mettant en jeu par exemple la mémoire spatiale, le codage et les assemblées cellulaires.

4 : Le phénotypage comportemental

Un objectif fondamental consiste à caractériser les altérations comportementales associées aux dysfonctionnements des circuits neuronaux. De nombreux tests standardisés sont couramment utilisés pour une évaluation rapide et efficace des principales composantes cognitives, motrices et émotionnelles, mais les progrès technologiques récents et l'intérêt croissant pour une description moins réductrice du comportement ont fortement contribué au développement d'une approche plus éthologique du phénotypage comportemental. Durant ma thèse j'ai contribué à la validation d'un nouveau dispositif de phénotypage comportemental. Le Phenotypix est un open field constitué d'une plateforme reposant sur des capteurs de pression extrêmement sensibles et permettant de détecter de façon totalement non invasive les moindres mouvements de l'animal, au cours du comportement spontané, avec une sensibilité et une précision temporelle sans équivalent dans les systèmes existants. On peut ainsi détecter chaque battement de cœur ou chaque cycle de respiration pendant l'immobilité, le décours temporel de la force et de la coordination des mouvements au sein de chaque pas lors de la locomotion, ou des tremblements/frissons exprimés en réponse à la douleur ou à la peur. L'application de cet outil à des modèles pathologiques pourrait apporter des informations inédites. On pourrait par exemple détecter les crises « silencieuses » chez des souris épileptique, ou encore détecter des altérations motrices et/ou émotionnelles dans des modèles de troubles neurodéveloppementaux. Enfin, il pourrait également être intéressant d'adapter le Phenotypix à d'autres tests comportementaux comme par exemple un Phenotypix en forme de labyrinthe en Y pour avoir accès à de nombreux paramètre lors de prise de décisions (notamment dans le domaine de l'addiction), ou encore en labyrinthe en croix surélevé pour avoir accès à ces paramètres lors d'un test révélant des comportements de type anxieux.

BIBLIOGRAPHIE

Acton, Brooke A., Vivek Mahadevan, Adrianna Mercado, Pavel Uvarov, Yanli Ding, Jessica Pressey, Matti S. Airaksinen, David B. Mount, et Melanie A. Woodin. 2012. « Hyperpolarizing GABAergic Transmission Requires the KCC2 C-Terminal ISO Domain ». Journal of Neuroscience 32(25):8746‑51. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6089-11.2012.

Akaike, Norio. 1996. « Gramicidin Perforated Patch Recording and Intracellular Chloride Activity in Excitable Cells ». Progress in Biophysics and Molecular Biology 65(3):251‑64. doi: 10.1016/S0079-6107(96)00013-2.

Alkondon, Manickavasagom, et Edson X. Albuquerque. 2001. « Nicotinic Acetylcholine Receptor α7 and α4β2 Subtypes Differentially Control GABAergic Input to CA1 Neurons in Rat Hippocampus ». Journal of Neurophysiology 86(6):3043‑55. doi: 10.1152/jn.2001.86.6.3043.

Amaral, D. G., et M. P. Witter. 1989. « The Three-Dimensional Organization of the Hippocampal Formation: A Review of Anatomical Data ». Neuroscience 31(3):571‑91.

Anderson, David J., et Pietro Perona. 2014. « Toward a Science of Computational Ethology ». Neuron 84(1):18‑31. doi: 10.1016/j.neuron.2014.09.005.

Angers, Stephane, et Randall T. Moon. 2009. « Proximal Events in Wnt Signal Transduction ». Nature Reviews Molecular Cell Biology 10(7):468‑77. doi: 10.1038/nrm2717.

Assaf, Fadi, et Yitzhak Schiller. 2016. « The antiepileptic and ictogenic effects of optogenetic neurostimulation of PV-expressing interneurons ». Journal of Neurophysiology 116(4):1694‑1704. doi: 10.1152/jn.00744.2015.

Avila, Ariel, Laurent Nguyen, et Jean-Michel Rigo. 2013. « Glycine Receptors and Brain Development ». Frontiers in Cellular Neuroscience 0. doi: 10.3389/fncel.2013.00184.

Ayala, G. F., H. Matsumoto, et R. J. Gumnit. 1970. « Excitability changes and inhibitory mechanisms in neocortical neurons during seizures. » Journal of Neurophysiology 33(1):73‑85. doi: 10.1152/jn.1970.33.1.73.

Baker, Monya. 2011. « Inside the Minds of Mice and Men ». Nature 475(7354):123‑28. doi: 10.1038/475123a.

Báldi, Rita, Csaba Varga, et Gábor Tamás. 2010. « Differential Distribution of KCC2 along the Axo-Somato-Dendritic Axis of Hippocampal Principal Cells ». European Journal of Neuroscience 32(8):1319‑25. doi: 10.1111/j.1460-9568.2010.07361.x.

Barmashenko, Gleb, Stefan Hefft, Ad Aertsen, Timo Kirschstein, et Rüdiger Köhling. 2011. « Positive Shifts of the GABAA Receptor Reversal Potential Due to Altered Chloride Homeostasis Is Widespread after Status Epilepticus ». Epilepsia 52(9):1570‑78. doi: 10.1111/j.1528-1167.2011.03247.x.

Baroncelli, Laura, Maria Cristina Cenni, Riccardo Melani, Gabriele Deidda, Silvia Landi, Roberta Narducci, Laura Cancedda, Lamberto Maffei, et Nicoletta Berardi. 2017. « Early IGF-1 Primes Visual Cortex Maturation and Accelerates Developmental

Switch between NKCC1 and KCC2 Chloride Transporters in Enriched Animals ». Neuropharmacology 113:167‑77. doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.02.034.

Barria, Andres, Dominique Muller, Victor Derkach, Leslie C. Griffith, et Thomas R. Soderling. 1997. « Regulatory Phosphorylation of AMPA-Type Glutamate Receptors by CaM-KII During Long-Term Potentiation ». Science. doi: 10.1126/science.276.5321.2042.

Bartos, Marlene, Imre Vida, et Peter Jonas. 2007. « Synaptic Mechanisms of Synchronized Gamma Oscillations in Inhibitory Interneuron Networks ». Nature Reviews Neuroscience 8(1):45‑56. doi: 10.1038/nrn2044.

Bassetti, Davide. 2022. « Keeping the Balance: GABAB Receptors in the Developing Brain and Beyond ». Brain Sciences 12(4):419. doi: 10.3390/brainsci12040419.

Baude, Agnès, Catherine Bleasdale, Yannis Dalezios, Peter Somogyi, et Thomas Klausberger. 2007. « Immunoreactivity for the GABAA Receptor A1 Subunit, Somatostatin and Connexin36 Distinguishes Axoaxonic, Basket, and Bistratified Interneurons of the Rat Hippocampus ». Cerebral Cortex 17(9):2094‑2107. doi: 10.1093/cercor/bhl117.

Baumann, Sabine W., Roland Baur, et Erwin Sigel. 2003. « Individual Properties of the Two Functional Agonist Sites in GABAA Receptors ». Journal of Neuroscience 23(35):11158‑66. doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-35-11158.2003.

Bazelot, Michaël, Céline Dinocourt, Ivan Cohen, et Richard Miles. 2010. « Unitary Inhibitory Field Potentials in the CA3 Region of Rat Hippocampus ». The Journal of Physiology 588(12):2077‑90. doi: 10.1113/jphysiol.2009.185918.

Belelli, Delia, Neil L. Harrison, Jamie Maguire, Robert L. Macdonald, Matthew C. Walker, et David W. Cope. 2009. « Extrasynaptic GABAA Receptors: Form, Pharmacology, and Function ». Journal of Neuroscience 29(41):12757‑63. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3340-09.2009.

Ben-Ari, Y. 1997. « GABAA, NMDA and AMPA Receptors: A Developmentally Regulated "Ménage à Trois" ». Trends in Neurosciences 20(11):523‑29. doi: 10.1016/S0166-2236(97)01147-8.

Ben-Ari, Y., E. Cherubini, R. Corradetti, et J. L. Gaiarsa. 1989. « Giant Synaptic Potentials in Immature Rat CA3 Hippocampal Neurones. » The Journal of Physiology 416(1):303‑25. doi: 10.1113/jphysiol.1989.sp017762.

Ben-Ari, Yehezkel. 2002. « Excitatory Actions of Gaba during Development: The Nature of the Nurture ». Nature Reviews Neuroscience 3(9):728‑39. doi: 10.1038/nrn920.

Ben-Ari, Yehezkel. 2017. « NKCC1 Chloride Importer Antagonists Attenuate Many Neurological and Psychiatric Disorders ». Trends in Neurosciences 40(9):536‑54. doi: 10.1016/j.tins.2017.07.001.

Ben-Ari, Yehezkel, Jean-Luc Gaiarsa, Roman Tyzio, et Rustem Khazipov. 2007. « GABA: A Pioneer Transmitter That Excites Immature Neurons and Generates Primitive Oscillations ». Physiological Reviews 87(4):1215‑84. doi: 10.1152/physrev.00017.2006.

Benarroch, Eduardo E. 2012. « GABAB Receptors: Structure, Functions, and Clinical Implications ». Neurology 78(8):578‑84. doi: 10.1212/WNL.0b013e318247cd03.

Bennett, Allyson J., et Dario L. Ringach. 2016. « Animal Research in Neuroscience: A Duty to Engage ». Neuron 92(3):653‑57. doi: 10.1016/j.neuron.2016.10.034.

Berman, Gordon J. 2018. « Measuring Behavior across Scales ». BMC Biology 16(1):1‑11. doi: 10.1186/s12915-018-0494-7.

Beyeler, Anna, Aude Retailleau, Colin Molter, Amine Mehidi, Janos Szabadics, et Xavier Leinekugel. 2013. « Recruitment of Perisomatic Inhibition during Spontaneous Hippocampal Activity In Vitro ». PLOS ONE 8(6):e66509. doi: 10.1371/journal.pone.0066509.

Bezaire, Marianne J., et Ivan Soltesz. 2013. « Quantitative Assessment of CA1 Local Circuits: Knowledge Base for Interneuron-Pyramidal Cell Connectivity ». Hippocampus 23(9):751‑85. doi: 10.1002/hipo.22141.

Blaesse, Peter, Matti S. Airaksinen, Claudio Rivera, et Kai Kaila. 2009. « Cation-Chloride Cotransporters and Neuronal Function ». Neuron 61(6):820‑38. doi: 10.1016/j.neuron.2009.03.003.

Bliss, T. V. P., et T. Lømo. 1973. « Long-Lasting Potentiation of Synaptic Transmission in the Dentate Area of the Anaesthetized Rabbit Following Stimulation of the Perforant Path ». The Journal of Physiology 232(2):331‑56. doi: 10.1113/jphysiol.1973.sp010273.

Blitzer, Robert D., Orlando Gil, et Emmanuel M. Landau. 1990. « Cholinergic Stimulation Enhances Long-Term Potentiation in the CA1 Region of Rat Hippocampus ». Neuroscience Letters 119(2):207‑10. doi: 10.1016/0304-3940(90)90835-W.

de Boer, Hanneke M., Marco Mula, et Josemir W. Sander. 2008. « The Global Burden and Stigma of Epilepsy ». Epilepsy & Behavior 12(4):540‑46. doi: 10.1016/j.yebeh.2007.12.019.

Booker, Sam A., et Imre Vida. 2018. « Morphological Diversity and Connectivity of Hippocampal Interneurons ». Cell and Tissue Research 373(3):619‑41. doi: 10.1007/s00441-018-2882-2.

Bos, Rémi, et Laurent Vinay. 2012. « Glucose is an adequate energy substrate for the depolarizing action of GABA and glycine in the neonatal rat spinal cord in vitro ». Journal of Neurophysiology 107(11):3107‑15. doi: 10.1152/jn.00571.2011.

Bragin, A., G. Jando, Z. Nadasdy, M. van Landeghem, et G. Buzsaki. 1995. « Dentate EEG spikes and associated interneuronal population bursts in the hippocampal hilar region of the rat ». Journal of Neurophysiology 73(4):1691‑1705. doi: 10.1152/jn.1995.73.4.1691.

Bragin, Denis E., Jennifer L. Sanderson, Steven Peterson, John A. Connor, et Wolfgang S. Müller. 2009. « Development of Epileptiform Excitability in the Deep Entorhinal Cortex after Status Epilepticus ». European Journal of Neuroscience 30(4):611‑24. doi: 10.1111/j.1460-9568.2009.06863.x.

Brickley, Stephen G., Victoria Revilla, Stuart G. Cull-Candy, William Wisden, et Mark Farrant. 2001. « Adaptive Regulation of Neuronal Excitability by a Voltage-Independent Potassium Conductance ». Nature 409(6816):88‑92. doi: 10.1038/35051086.

Browne, Thomas R., et Gregory L. Holmes. 2001. « Epilepsy ». Https://Doi-Org.Proxy.Insermbiblio.Inist.Fr/10.1056/NEJM200104123441507. Consulté 12 septembre 2022 (http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJM200104123441507).

Bruining, Hilgo, Laurien Passtoors, Natalia Goriounova, Floor Jansen, Britt Hakvoort, Maretha de Jonge, et Simon-Shlomo Poil. 2015. « Paradoxical Benzodiazepine Response: A Rationale for Bumetanide in Neurodevelopmental Disorders? » Pediatrics 136(2):e539‑43. doi: 10.1542/peds.2014-4133.

Buhl, E. H., Z. S. Han, Z. Lorinczi, V. V. Stezhka, S. V. Karnup, et P. Somogyi. 1994. « Physiological Properties of Anatomically Identified Axo-Axonic Cells in the Rat Hippocampus ». Journal of Neurophysiology. doi: 10.1152/jn.1994.71.4.1289.

Buhl, Eberhard H., Katalin Halasy, et Peter Somogyi. 1994. « Diverse Sources of Hippocampal Unitary Inhibitory Postsynaptic Potentials and the Number of Synaptic Release Sites ». Nature 368(6474):823‑28. doi: 10.1038/368823a0.

Burgard, Edward C., et John M. Sarvey. 1990. « Muscarinic Receptor Activation Facilitates the Induction of Long-Term Potentiation (LTP) in the Rat Dentate Gyrus ». Neuroscience Letters 116(1‑2):34‑39. doi: 10.1016/0304-3940(90)90382-J.

Burnashev, Nail, Ralf Schoepfer, Hannah Monyer, J. Peter Ruppersberg, Willy Günther, Peter H. Seeburg, et Bert Sakmann. 1992. « Control by Asparagine Residues of Calcium Permeability and Magnesium Blockade in the NMDA Receptor ». Science. doi: 10.1126/science.1382314.

Buzsáki, G. 1989. « Two-Stage Model of Memory Trace Formation: A Role for "Noisy" Brain States ». Neuroscience 31(3):551‑70. doi: 10.1016/0306-4522(89)90423-5.

Buzsáki, G., M. Penttonen, Z. Nádasdy, et A. Bragin. 1996. « Pattern and Inhibition-Dependent Invasion of Pyramidal Cell Dendrites by Fast Spikes in the Hippocampus in Vivo. » Proceedings of the National Academy of Sciences 93(18):9921‑25. doi: 10.1073/pnas.93.18.9921.

Buzsáki, György. 2002. « Theta Oscillations in the Hippocampus ». Neuron 33(3):325‑40. doi: 10.1016/S0896-6273(02)00586-X.

Buzsáki, György. 2015. « Hippocampal Sharp Wave-Ripple: A Cognitive Biomarker for Episodic Memory and Planning ». Hippocampus 25(10):1073‑1188. doi: 10.1002/hipo.22488.

Buzsáki, György, et James J. Chrobak. 1995. « Temporal Structure in Spatially Organized Neuronal Ensembles: A Role for Interneuronal Networks ». Current Opinion in Neurobiology 5(4):504‑10. doi: 10.1016/0959-4388(95)80012-3.

Buzsáki, György, et Walter Freeman. 2015. « Editorial Overview: Brain Rhythms and Dynamic Coordination ». Current Opinion in Neurobiology 31:v‑ix. doi:

10.1016/j.conb.2015.01.016.

Buzsáki, György, et Xiao-Jing Wang. 2012. « Mechanisms of Gamma Oscillations ». Annual Review of Neuroscience 35(1):203‑25. doi: 10.1146/annurev-neuro-062111-150444.

Capó-Aponte, José E., Zheng Wang, Victor N. Bildin, Kathryn S. Pokorny, et Peter S. Reinach. 2007. « Fate of Hypertonicity-Stressed Corneal Epithelial Cells Depends on Differential MAPK Activation and P38MAPK/Na–K–2Cl Cotransporter1 Interaction ». Experimental Eye Research 84(2):361‑72. doi: 10.1016/j.exer.2006.10.011.

Cardarelli, Ross A., Karen Jones, Lucie I. Pisella, Heike J. Wobst, Lisa J. McWilliams, Paul M. Sharpe, Matthew P. Burnham, David J. Baker, Ilona Chudotvorova, Justine Guyot, Liliya Silayeva, Danielle H. Morrow, Niek Dekker, Stephen Zicha, Paul A. Davies, Jörg Holenz, Mark E. Duggan, John Dunlop, Robert J. Mather, Qi Wang, Igor Medina, Nicholas J. Brandon, Tarek Z. Deeb, et Stephen J. Moss. 2017. « The Small Molecule CLP257 Does Not Modify Activity of the K+–Cl− Co-Transporter KCC2 but Does Potentiate GABAA Receptor Activity ». Nature Medicine 23(12):1394‑96. doi: 10.1038/nm.4442.

Cardin, Jessica A., Marie Carlén, Konstantinos Meletis, Ulf Knoblich, Feng Zhang, Karl Deisseroth, Li-Huei Tsai, et Christopher I. Moore. 2009. « Driving Fast-Spiking Cells Induces Gamma Rhythm and Controls Sensory Responses ». Nature 459(7247):663‑67. doi: 10.1038/nature08002.

Cellot, Giada, Laura Maggi, Maria Amalia Di Castro, Myriam Catalano, Rosanna Migliore, Michele Migliore, Maria Luisa Scattoni, Gemma Calamandrei, et Enrico Cherubini. 2016. « Premature Changes in Neuronal Excitability Account for Hippocampal Network Impairment and Autistic-like Behavior in Neonatal BTBR T+tf/J Mice ». Scientific Reports 6(1):31696. doi: 10.1038/srep31696.

Chalifoux, Jason R., et Adam G. Carter. 2011. « GABAB Receptor Modulation of Synaptic Function ». Current Opinion in Neurobiology 21(2):339‑44. doi: 10.1016/j.conb.2011.02.004.

Chamma, Ingrid, Quentin Chevy, Jean Christophe Poncer, et Sabine Levi. 2012. « Role of the Neuronal K-Cl Co-Transporter KCC2 in Inhibitory and Excitatory Neurotransmission ». Frontiers in Cellular Neuroscience 0. doi: 10.3389/fncel.2012.00005.

Chavas, Joël, Maria Elisa Forero, Thibault Collin, Isabel Llano, et Alain Marty. 2004. « Osmotic Tension as a Possible Link between GABAA Receptor Activation and Intracellular Calcium Elevation ». Neuron 44(4):701‑13. doi: 10.1016/j.neuron.2004.11.002.

Chavas, Joël, et Alain Marty. 2003. « Coexistence of Excitatory and Inhibitory GABA Synapses in the Cerebellar Interneuron Network ». Journal of Neuroscience 23(6):2019‑31. doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-06-02019.2003.

Chebib, M. 2004. « Gabac Receptor Ion Channels ». Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology 31(11):800‑804. doi: 10.1111/j.1440-

1681.2004.04083.x.

Chen, Lulan, Li Wan, Zheng Wu, Wanting Ren, Yian Huang, Binbin Qian, et Yun Wang. 2017. « KCC2 downregulation facilitates epileptic seizures ». Scientific Reports 7. doi: 10.1038/s41598-017-00196-7.

Cherubini, Enrico, Jean L. Gaiarsa, et Yehezkel Ben-Ari. 1991. « GABA: An Excitatory Transmitter in Early Postnatal Life ». Trends in Neurosciences 14(12):515‑19. doi: 10.1016/0166-2236(91)90003-D.

Chrobak, J. J., et G. Buzsáki. 1998. « Gamma Oscillations in the Entorhinal Cortex of the Freely Behaving Rat ». Journal of Neuroscience 18(1):388‑98. doi: 10.1523/JNEUROSCI.18-01-00388.1998.

Claiborne, Brenda J., David G. Amaral, et W. Maxwell Cowan. 1986. « A Light and Electron Microscopic Analysis of the Mossy Fibers of the Rat Dentate Gyrus ». Journal of Comparative Neurology 246(4):435‑58. doi: 10.1002/cne.902460403.

Cobb, S. R., E. H. Buhl, K. Halasy, O. Paulsen, et P. Somogyi. 1995. « Synchronization of Neuronal Activity in Hippocampus by Individual GABAergic Interneurons ». Nature 378(6552):75‑78. doi: 10.1038/378075a0.

Cohen, Ivan, Vincent Navarro, Stéphane Clemenceau, Michel Baulac, et Richard Miles. 2002. « On the Origin of Interictal Activity in Human Temporal Lobe Epilepsy in Vitro ». Science. doi: 10.1126/science.1076510.

Colgin, Laura Lee. 2016. « Rhythms of the Hippocampal Network ». Nature Reviews Neuroscience 17(4):239‑49. doi: 10.1038/nrn.2016.21.

Cossart, Rosa, Christophe Bernard, et Yehezkel Ben-Ari. 2005. « Multiple Facets of GABAergic Neurons and Synapses: Multiple Fates of GABA Signalling in Epilepsies ». Trends in Neurosciences 28(2):108‑15. doi: 10.1016/j.tins.2004.11.011.

Cossart, Rosa, et Roustem Khazipov. 2021. « How development sculpts hippocampal circuits and function ». Physiological Reviews 102(1):343‑78. doi: 10.1152/physrev.00044.2020.

Cowan, Linda D. 2002. « The Epidemiology of the Epilepsies in Children ». Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews 8(3):171‑81. doi: 10.1002/mrdd.10035.

Crépel, Valérie, Dmitriy Aronov, Isabel Jorquera, Alfonso Represa, Yehezkel Ben-Ari, et Rosa Cossart. 2007. « A Parturition-Associated Nonsynaptic Coherent Activity Pattern in the Developing Hippocampus ». Neuron 54(1):105‑20. doi: 10.1016/j.neuron.2007.03.007.

Crépel, Valérie, et Christophe Mulle. 2015. « Physiopathology of Kainate Receptors in Epilepsy ». Current Opinion in Pharmacology 20:83‑88. doi: 10.1016/j.coph.2014.11.012.

Cryan, John F., et Andrew Holmes. 2005. « The Ascent of Mouse: Advances in Modelling Human Depression and Anxiety ». Nature Reviews Drug Discovery 4(9):775‑90. doi:

10.1038/nrd1825.

Csicsvari, Jozsef, Hajime Hirase, András Czurkó, Akira Mamiya, et György Buzsáki. 1999. « Oscillatory Coupling of Hippocampal Pyramidal Cells and Interneurons in the Behaving Rat ». Journal of Neuroscience 19(1):274‑87. doi: 10.1523/JNEUROSCI.19-01-00274.1999.

Csicsvari, Jozsef, Hajime Hirase, Akira Mamiya, et György Buzsáki. 2000. « Ensemble Patterns of Hippocampal CA3-CA1 Neurons during Sharp Wave–Associated Population Events ». Neuron 28(2):585‑94. doi: 10.1016/S0896-6273(00)00135-5.

Csicsvari, Jozsef, Brian Jamieson, Kensall D. Wise, et György Buzsáki. 2003. « Mechanisms of Gamma Oscillations in the Hippocampus of the Behaving Rat ». Neuron 37(2):311‑22. doi: 10.1016/S0896-6273(02)01169-8.

Dard, Robin F., Erwan Leprince, Julien Denis, Shrisha Rao Balappa, Dmitrii Suchkov, Richard Boyce, Catherine Lopez, Marie Giorgi-Kurz, Tom Szwagier, Théo Dumont, Hervé Rouault, Marat Minlebaev, Agnès Baude, Rosa Cossart, et Michel A. Picardo. 2022. « The rapid developmental rise of somatic inhibition disengages hippocampal dynamics from self-motion » édité par A. Peyrache, L. L. Colgin, et S. J. Butt. eLife 11:e78116. doi: 10.7554/eLife.78116.

Dasari, Sameera, et Allan T. Gulledge. 2010. « M1 and M4 Receptors Modulate Hippocampal Pyramidal Neurons ». Journal of Neurophysiology 105(2):779‑92. doi: 10.1152/jn.00686.2010.

Datta, Sandeep Robert, David J. Anderson, Kristin Branson, Pietro Perona, et Andrew Leifer. 2019. « Computational Neuroethology: A Call to Action ». Neuron 104(1):11‑24. doi: 10.1016/j.neuron.2019.09.038.

Davies, Ceri H., Sarah J. Starkey, Mario F. Pozza, et Graham L. Collingridge. 1991. « GABAB Autoreceptors Regulate the Induction of LTP ». Nature 349(6310):609‑11. doi: 10.1038/349609a0.

Deidda, Gabriele, Martina Parrini, Shovan Naskar, Ignacio F. Bozarth, Andrea Contestabile, et Laura Cancedda. 2015. « Reversing Excitatory GABAAR Signaling Restores Synaptic Plasticity and Memory in a Mouse Model of Down Syndrome ». Nature Medicine 21(4):318‑26. doi: 10.1038/nm.3827.

Delpire, E., M. I. Rauchman, D. R. Beier, S. C. Hebert, et S. R. Gullans. 1994. « Molecular Cloning and Chromosome Localization of a Putative Basolateral Na(+)-K(+)-2Cl-Cotransporter from Mouse Inner Medullary Collecting Duct (MIMCD-3) Cells. » Journal of Biological Chemistry 269(41):25677‑83. doi: 10.1016/S0021-9258(18)47302-4.

Delpire, Eric, Aleksandra Baranczak, Alex G. Waterson, Kwangho Kim, Nathan Kett, Ryan D. Morrison, J. Scott Daniels, C. David Weaver, et Craig W. Lindsley. 2012. « Further Optimization of the K-Cl Cotransporter KCC2 Antagonist ML077: Development of a Highly Selective and More Potent in Vitro Probe ». Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 22(14):4532‑35. doi: 10.1016/j.bmcl.2012.05.126.

Demarque, Michael, Alfonso Represa, Hélène Becq, Ilgam Khalilov, Yehezkel Ben-Ari, et

Laurent Anikstejn. 2002. « Paracrine Intercellular Communication by a Ca2+- and SNARE-Independent Release of GABA and Glutamate Prior to Synapse Formation ». Neuron 36(6):1051‑61. doi: 10.1016/S0896-6273(02)01053-X.

D'Hulst, Charlotte, John R. Atack, et R. Frank Kooy. 2009. « The Complexity of the GABAA Receptor Shapes Unique Pharmacological Profiles ». Drug Discovery Today 14(17):866‑75. doi: 10.1016/j.drudis.2009.06.009.

Di Cristo, Graziella, Patricia N. Awad, Shabnam Hamidi, et Massimo Avoli. 2018. « KCC2, Epileptiform Synchronization, and Epileptic Disorders ». Progress in Neurobiology 162:1‑16. doi: 10.1016/j.pneurobio.2017.11.002.

Dine, Julien, Claudia Kühne, Jan M. Deussing, et Matthias Eder. 2014. « Optogenetic Evocation of Field Inhibitory Postsynaptic Potentials in Hippocampal Slices: A Simple and Reliable Approach for Studying Pharmacological Effects on GABAA and GABAB Receptor-Mediated Neurotransmission ». Frontiers in Cellular Neuroscience 0. doi: 10.3389/fncel.2014.00002.

Dingledine, Raymond, Karin Borges, Derek Bowie, et Stephen F. Traynelis. 1999. « The Glutamate Receptor Ion Channels ». Pharmacological Reviews 51(1):7‑62.

Donato, Flavio, R. Irene Jacobsen, May-Britt Moser, et Edvard I. Moser. 2017. « Stellate Cells Drive Maturation of the Entorhinal-Hippocampal Circuit ». Science. doi: 10.1126/science.aai8178.

Doyon, Nicolas, Francesco Ferrini, Martin Gagnon, et Yves De Koninck. 2013. « Treating Pathological Pain: Is KCC2 the Key to the Gate? » Expert Review of Neurotherapeutics 13(5):469‑71. doi: 10.1586/ern.13.40.

Doyon, Nicolas, Laurent Vinay, Steven A. Prescott, et Yves De Koninck. 2016. « Chloride Regulation: A Dynamic Equilibrium Crucial for Synaptic Inhibition ». Neuron 89(6):1157‑72. doi: 10.1016/j.neuron.2016.02.030.

Dragoi, George, et György Buzsáki. 2006. « Temporal Encoding of Place Sequences by Hippocampal Cell Assemblies ». Neuron 50(1):145‑57. doi: 10.1016/j.neuron.2006.02.023.

Dubanet, Olivier. 2019. « Dynamique des interactions entre excitation et inhibition périsomatique dans le circuit hippocampique normal et épileptique in vivo ». phdthesis, Université de Bordeaux.

Dudok, Barna, Peter M. Klein, Ernie Hwaun, Brian R. Lee, Zizhen Yao, Olivia Fong, John C. Bowler, Satoshi Terada, Fraser T. Sparks, Gergely G. Szabo, Jordan S. Farrell, Jim Berg, Tanya L. Daigle, Bosiljka Tasic, Jordane Dimidschstein, Gord Fishell, Attila Losonczy, Hongkui Zeng, et Ivan Soltesz. 2021. « Alternating Sources of Perisomatic Inhibition during Behavior ». Neuron 109(6):997-1012.e9. doi: 10.1016/j.neuron.2021.01.003.

Dupont, Jean-Claude. 2022. « PLASTICITÉ CÉRÉBRALE ». Encyclopædia Universalis. Consulté 14 septembre 2022 (https://www.universalis.fr/encyclopedie/plasticite-cerebrale/).

Duran, Charity, Christopher H. Thompson, Qinghuan Xiao, et Criss Hartzell. 2010. « Chloride Channels: Often enigmatic, rarely predictable ». Annual review of physiology 72:95‑121. doi: 10.1146/annurev-physiol-021909-135811.

Durand, Guylaine M., Yury Kovalchuk, et Arthur Konnerth. 1996. « Long-Term Potentiation and Functional Synapse Induction in Developing Hippocampus ». Nature 381(6577):71‑75. doi: 10.1038/381071a0.

Dzhala, V., G. Valeeva, J. Glykys, R. Khazipov, et K. Staley. 2012. « Traumatic Alterations in GABA Signaling Disrupt Hippocampal Network Activity in the Developing Brain ». Journal of Neuroscience 32(12):4017‑31. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5139-11.2012.

Dzhala, Volodymyr I., Delia M. Talos, Dan A. Sdrulla, Audrey C. Brumback, Gregory C. Mathews, Timothy A. Benke, Eric Delpire, Frances E. Jensen, et Kevin J. Staley. 2005. « NKCC1 Transporter Facilitates Seizures in the Developing Brain ». Nature Medicine 11(11):1205‑13. doi: 10.1038/nm1301.

Ebihara, S., K. Shirato, N. Harata, et N. Akaike. 1995. « Gramicidin-Perforated Patch Recording: GABA Response in Mammalian Neurones with Intact Intracellular Chloride. » The Journal of Physiology 484(1):77‑86. doi: 10.1113/jphysiol.1995.sp020649.

Elfant, David, Balázs Zoltán Pál, Nigel Emptage, et Marco Capogna. 2008. « Specific Inhibitory Synapses Shift the Balance from Feedforward to Feedback Inhibition of Hippocampal CA1 Pyramidal Cells ». European Journal of Neuroscience 27(1):104‑13. doi: 10.1111/j.1460-9568.2007.06001.x.

English, Daniel F., Adrien Peyrache, Eran Stark, Lisa Roux, Daniela Vallentin, Michael A. Long, et György Buzsáki. 2014. « Excitation and Inhibition Compete to Control Spiking during Hippocampal Ripples: Intracellular Study in Behaving Mice ». Journal of Neuroscience 34(49):16509‑17. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2600-14.2014.

Ennaceur, A. 2014. « Tests of Unconditioned Anxiety — Pitfalls and Disappointments ». Physiology & Behavior 135:55‑71. doi: 10.1016/j.physbeh.2014.05.032.

Erker, Thomas, Claudia Brandt, Kathrin Töllner, Philipp Schreppel, Friederike Twele, Alina Schidlitzki, et Wolfgang Löscher. 2016. « The Bumetanide Prodrug BUM5, but Not Bumetanide, Potentiates the Antiseizure Effect of Phenobarbital in Adult Epileptic Mice ». Epilepsia 57(5):698‑705. doi: 10.1111/epi.13346.

Escayg, Andrew, et Alan L. Goldin. 2010. « Sodium Channel SCN1A and Epilepsy: Mutations and Mechanisms ». Epilepsia 51(9):1650‑58. doi: 10.1111/j.1528-1167.2010.02640.x.

Ezan, Jérôme, et Mireille Montcouquiol. 2013. « Revisiting Planar Cell Polarity in the Inner Ear ». Seminars in Cell & Developmental Biology 24(5):499‑506. doi: 10.1016/j.semcdb.2013.03.012.

Fagiolini, Michela, et Takao K. Hensch. 2000. « Inhibitory Threshold for Critical-Period Activation in Primary Visual Cortex ». Nature 404(6774):183‑86. doi: 10.1038/35004582.

Farooq, U., et G. Dragoi. 2019. « Emergence of Preconfigured and Plastic Time-Compressed Sequences in Early Postnatal Development ». Science 363(6423):168‑73. doi: 10.1126/science.aav0502.

Farrant, Mark, et Zoltan Nusser. 2005. « Variations on an Inhibitory Theme: Phasic and Tonic Activation of GABAA Receptors ». Nature Reviews Neuroscience 6(3):215‑29. doi: 10.1038/nrn1625.

Fatemi, S. Hossein, Amy R. Halt, Joel M. Stary, Reena Kanodia, S. Charles Schulz, et George R. Realmuto. 2002. « Glutamic Acid Decarboxylase 65 and 67 KDa Proteins Are Reduced in Autistic Parietal and Cerebellar Cortices ». Biological Psychiatry 52(8):805‑10. doi: 10.1016/S0006-3223(02)01430-0.

Feigenspan, A., et J. Bormann. 1994. « Differential Pharmacology of GABAA and GABAC Receptors on Rat Retinal Bipolar Cells ». European Journal of Pharmacology 288(1):97‑104. doi: 10.1016/0922-4106(94)90014-0.

Fisher, Robert S., Walter van Emde Boas, Warren Blume, Christian Elger, Pierre Genton, Phillip Lee, et Jerome Engel Jr. 2005. « Epileptic Seizures and Epilepsy: Definitions Proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE) ». Epilepsia 46(4):470‑72. doi: 10.1111/j.0013-9580.2005.66104.x.

Fiumelli, Hubert, Adrian Briner, Martin Puskarjov, Peter Blaesse, Bebyanda JT Belem, Alex G. Dayer, Kai Kaila, Jean-Luc Martin, et Laszlo Vutskits. 2013. « An Ion Transport-Independent Role for the Cation-Chloride Cotransporter KCC2 in Dendritic Spinogenesis In Vivo ». Cerebral Cortex 23(2):378‑88. doi: 10.1093/cercor/bhs027.

Forro, Thomas, Ornella Valenti, Balint Lasztoczi, et Thomas Klausberger. 2015. « Temporal Organization of GABAergic Interneurons in the Intermediate CA1 Hippocampus During Network Oscillations ». Cerebral Cortex 25(5):1228‑40. doi: 10.1093/cercor/bht316.

Freund, T. F., et G. Buzsáki. 1996. « Interneurons of the Hippocampus ». Hippocampus 6(4):347‑470. doi: 10.1002/(SICI)1098-1063(1996)6:4<347::AID-HIPO1>3.0.CO;2-I.

Fricker, Desdemona, et Richard Miles. 2000. « EPSP Amplification and the Precision of Spike Timing in Hippocampal Neurons ». Neuron 28(2):559‑69. doi: 10.1016/S0896-6273(00)00133-1.

Fu, Peicai, Ronghua Tang, Zhiyuan Yu, Shanshan Huang, Minjie Xie, Xiang Luo, et Wei Wang. 2015. « Bumetanide-Induced NKCC1 Inhibition Attenuates Oxygen–Glucose Deprivation-Induced Decrease in Proliferative Activity and Cell Cycle Progression Arrest in Cultured OPCs via p-38 MAPKs ». Brain Research 1613:110‑19. doi: 10.1016/j.brainres.2015.04.006.

Fuchs, Elke C., Aleksandar R. Zivkovic, Mark O. Cunningham, Steven Middleton, Fiona E. N. LeBeau, David M. Bannerman, Andrei Rozov, Miles A. Whittington, Roger D. Traub, J. Nicholas P. Rawlins, et Hannah Monyer. 2007. « Recruitment of Parvalbumin-Positive Interneurons Determines Hippocampal Function and Associated Behavior ».

Neuron 53(4):591‑604. doi: 10.1016/j.neuron.2007.01.031.

Gagnon, Kenneth B. E., Roger England, et Eric Delpire. 2006. « Characterization of SPAK and OSR1, Regulatory Kinases of the Na-K-2Cl Cotransporter ». Molecular and Cellular Biology. doi: 10.1128/MCB.26.2.689-698.2006.

Gagnon, Martin, Marc J. Bergeron, Guillaume Lavertu, Annie Castonguay, Sasmita Tripathy, Robert P. Bonin, Jimena Perez-Sanchez, Dominic Boudreau, Bin Wang, Lionel Dumas, Isabelle Valade, Karine Bachand, Marième Jacob-Wagner, Christian Tardif, Irenej Kianicka, Paul Isenring, Giorgio Attardo, Jeffrey A. M. Coull, et Yves De Koninck. 2013. « Chloride Extrusion Enhancers as Novel Therapeutics for Neurological Diseases ». Nature Medicine 19(11):1524‑28. doi: 10.1038/nm.3356.

Gaiarsa, J. L., H. McLean, P. Congar, X. Leinekugel, R. Khazipov, V. Tseeb, et Y. Ben-Ari. 1995. « Postnatal Maturation of Gamma-Aminobutyric AcidA and B-Mediated Inhibition in the CA3 Hippocampal Region of the Rat ». Journal of Neurobiology 26(3):339‑49. doi: 10.1002/neu.480260306.

Galvez, Thierry, Laurent Prézeau, Gérald Milioti, Miloslav Franek, Cécile Joly, Wolfgang Froestl, Bernhard Bettler, Hugues-Olivier Bertrand, Jaroslav Blahos, et Jean-Philippe Pin. 2000. « Mapping the Agonist-Binding Site of GABAB Type 1 Subunit Sheds Light on the Activation Process of GABABReceptors ». Journal of Biological Chemistry 275(52):41166‑74. doi: 10.1074/jbc.M007848200.*

Gamba, Gerardo. 2005. « Molecular Physiology and Pathophysiology of Electroneutral Cation-Chloride Cotransporters ». Physiological Reviews 85(2):423‑93. doi: 10.1152/physrev.00011.2004.

Gan, Jian, Shih-ming Weng, Alejandro J. Pernía-Andrade, Jozsef Csicsvari, et Peter Jonas. 2017. « Phase-Locked Inhibition, but Not Excitation, Underlies Hippocampal Ripple Oscillations in Awake Mice In Vivo ». Neuron 93(2):308‑14. doi: 10.1016/j.neuron.2016.12.018.

Garaschuk, Olga, Eric Hanse, et Arthur Konnerth. 1998. « Developmental Profile and Synaptic Origin of Early Network Oscillations in the CA1 Region of Rat Neonatal Hippocampus ». The Journal of Physiology 507(1):219‑36. doi: 10.1111/j.1469-7793.1998.219bu.x.

Giancardo, Luca, Diego Sona, Huiping Huang, Sara Sannino, Francesca Managò, Diego Scheggia, Francesco Papaleo, et Vittorio Murino. 2013. « Automatic Visual Tracking and Social Behaviour Analysis with Multiple Mice ». PLOS ONE 8(9):e74557. doi: 10.1371/journal.pone.0074557.

Girardeau, Gabrielle, Karim Benchenane, Sidney I. Wiener, György Buzsáki, et Michaël B. Zugaro. 2009. « Selective Suppression of Hippocampal Ripples Impairs Spatial Memory ». Nature Neuroscience 12(10):1222‑23. doi: 10.1038/nn.2384.

Glickfeld, Lindsey L., Bassam V. Atallah, et Massimo Scanziani. 2008. « Complementary Modulation of Somatic Inhibition by Opioids and Cannabinoids ». Journal of Neuroscience 28(8):1824‑32. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4700-07.2008.

Glickfeld, Lindsey L., J. David Roberts, Peter Somogyi, et Massimo Scanziani. 2009.

« Interneurons Hyperpolarize Pyramidal Cells along Their Entire Somatodendritic Axis ». Nature Neuroscience 12(1):21‑23. doi: 10.1038/nn.2230.

Glykys, J., V. Dzhala, K. Egawa, T. Balena, Y. Saponjian, K. V. Kuchibhotla, B. J. Bacskai, K. T. Kahle, T. Zeuthen, et K. J. Staley. 2014. « Local Impermeant Anions Establish the Neuronal Chloride Concentration ». Science 343(6171):670‑75. doi: 10.1126/science.1245423.

Glykys, Joseph, et Istvan Mody. 2007. « Activation of GABAA Receptors: Views from Outside the Synaptic Cleft ». Neuron 56(5):763‑70. doi: 10.1016/j.neuron.2007.11.002.

Glykys, Joseph, et Kevin J. Staley. 2016. « Developmental Decrease of Neuronal Chloride Concentration Is Independent of Trauma in Thalamocortical Brain Slices ». PLOS ONE 11(6):e0158012. doi: 10.1371/journal.pone.0158012.

Goldberg, Ethan M., et Douglas A. Coulter. 2013. « Mechanisms of Epileptogenesis: A Convergence on Neural Circuit Dysfunction ». Nature Reviews Neuroscience 14(5):337‑49. doi: 10.1038/nrn3482.

Gomez-Di Cesare, C. M., K. L. Smith, F. L. Rice, et J. W. Swann. 1997. « Axonal Remodeling during Postnatal Maturation of CA3 Hippocampal Pyramidal Neurons ». The Journal of Comparative Neurology 384(2):165‑80.

Gomez-Marin, Alex, Joseph J. Paton, Adam R. Kampff, Rui M. Costa, et Zachary F. Mainen. 2014. « Big Behavioral Data: Psychology, Ethology and the Foundations of Neuroscience ». Nature Neuroscience 17(11):1455‑62. doi: 10.1038/nn.3812.

Goutierre, Marie, Sana Al Awabdh, Florian Donneger, Emeline François, Daniel Gomez-Dominguez, Theano Irinopoulou, Liset Menendez de la Prida, et Jean Christophe Poncer. 2019. « KCC2 Regulates Neuronal Excitability and Hippocampal Activity via Interaction with Task-3 Channels ». Cell Reports 28(1):91-103.e7. doi: 10.1016/j.celrep.2019.06.001.

Guinaudeau, Ophélie. 2019. « Neurone abstrait : une formalisation de l'intégration dendritique et ses propriétés algébriques ». phdthesis, Université Côte d'Azur.

Gulledge, Allan T., et Greg J. Stuart. 2003. « Excitatory Actions of GABA in the Cortex ». Neuron 37(2):299‑309. doi: 10.1016/S0896-6273(02)01146-7.

Gulyás, Attila I., Gergely G. Szabó, István Ulbert, Noémi Holderith, Hannah Monyer, Ferenc Erdélyi, Gábor Szabó, Tamás F. Freund, et Norbert Hájos. 2010. « Parvalbumin-Containing Fast-Spiking Basket Cells Generate the Field Potential Oscillations Induced by Cholinergic Receptor Activation in the Hippocampus ». Journal of Neuroscience 30(45):15134‑45. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4104-10.2010.

Guo, Yong, Min Su, Michael A. McNutt, et Jiang Gu. 2009. « Expression and Distribution of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator in Neurons of the Human Brain »: Journal of Histochemistry & Cytochemistry. doi: 10.1369/jhc.2009.953455.

Hadjikhani, Nouchine, Nicole R. Zürcher, Ophelie Rogier, Torsten Ruest, Loyse Hippolyte, Yehezkel Ben-Ari, et Eric Lemonnier. 2013. « Improving Emotional Face Perception in Autism with Diuretic Bumetanide: A Proof-of-Concept Behavioral and Functional

Brain Imaging Pilot Study ». Autism. doi: 10.1177/1362361313514141.

Halasy, Katalin, Eberhard H. Buhl, Zoltán Lörinczi, Gábor Tamás, et Peter Somogyi. 1996. « Synaptic Target Selectivity and Input of GABAergic Basket and Bistratified Interneurons in the CA1 Area of the Rat Hippocampus ». Hippocampus 6(3):306‑29. doi: 10.1002/(SICI)1098-1063(1996)6:3<306::AID-HIPO8>3.0.CO;2-K.

Harris, Kenneth D., Jozsef Csicsvari, Hajime Hirase, George Dragoi, et György Buzsáki. 2003. « Organization of Cell Assemblies in the Hippocampus ». Nature 424(6948):552‑56. doi: 10.1038/nature01834.

Hartmann, Anna-Maria, Meike Wenz, Adriana Mercado, Christof Störger, David B. Mount, Eckhard Friauf, et Hans Gerd Nothwang. 2010. « Differences in the Large Extracellular Loop between the K+-Cl− Cotransporters KCC2 and KCC4 ». Journal of Biological Chemistry 285(31):23994‑2. doi: 10.1074/jbc.M110.144063.*

Hasselmo, M. E., et L. M. Giocomo. 2006. « Cholinergic Modulation of Cortical Function ». Journal of Molecular Neuroscience 30(1):133‑35. doi: 10.1385/JMN:30:1:133.

Hasselmo, M. E., et E. Schnell. 1994. « Laminar Selectivity of the Cholinergic Suppression of Synaptic Transmission in Rat Hippocampal Region CA1: Computational Modeling and Brain Slice Physiology ». Journal of Neuroscience 14(6):3898‑3914. doi: 10.1523/JNEUROSCI.14-06-03898.1994.

Hasselmo, Michael E. 2006. « The Role of Acetylcholine in Learning and Memory ». Current Opinion in Neurobiology 16(6):710‑15. doi: 10.1016/j.conb.2006.09.002.

Hasselmo, Michael E., et Jill McGaughy. 2004. « High Acetylcholine Levels Set Circuit Dynamics for Attention and Encoding and Low Acetylcholine Levels Set Dynamics for Consolidation ». P. 207‑31 in Progress in Brain Research. Vol. 145. Elsevier.

Hasselmo, Michael E., et Bradley P. Wyble. 1997. « Free Recall and Recognition in a Network Model of the Hippocampus: Simulating Effects of Scopolamine on Human Memory Function ». Behavioural Brain Research 89(1‑2):1‑34. doi: 10.1016/S0166-4328(97)00048-X.

He, Qionger, Toshihiro Nomura, Jian Xu, et Anis Contractor. 2014. « The Developmental Switch in GABA Polarity Is Delayed in Fragile X Mice ». Journal of Neuroscience 34(2):446‑50. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4447-13.2014.

Hebb, D. O. 1950. « The Organization of Behavior: A Neuropsychological Theory. New York: John Wiley and Sons, Inc., 1949. 335 p. » Science Education 34(5):336‑37. doi: 10.1002/sce.37303405110.

Hjorth-Simonsen, A. 1972. « Projection of the Lateral Part of the Entorhinal Area to the Hippocampus and Fascia Dentata ». Journal of Comparative Neurology 146(2):219‑31. doi: 10.1002/cne.901460206.

Hjorth-Simonsen, A., et B. Jeune. 1972. « Origin and termination of the hippocampal perforant path in the rat studied by silver impregnation ». Journal of Comparative Neurology 144(2):215‑31. doi: 10.1002/cne.901440206.

Holmgren, Carl D., Marat Mukhtarov, Anton E. Malkov, Irina Y. Popova, Piotr Bregestovski, et Yuri Zilberter. 2010. « Energy Substrate Availability as a Determinant of Neuronal Resting Potential, GABA Signaling and Spontaneous Network Activity in the Neonatal Cortex in Vitro ». Journal of Neurochemistry 112(4):900‑912. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06506.x.

Huang, Wendy C., Shaohua Xiao, Fen Huang, Brian D. Harfe, Yuh Nung Jan, et Lily Yeh Jan. 2012. « Calcium-Activated Chloride Channels (CaCCs) Regulate Action Potential and Synaptic Response in Hippocampal Neurons ». Neuron 74(1):179‑92. doi: 10.1016/j.neuron.2012.01.033.

Huang, Z. Josh, Alfredo Kirkwood, Tommaso Pizzorusso, Vittorio Porciatti, Bernardo Morales, Mark F. Bear, Lamberto Maffei, et Susumu Tonegawa. 1999. « BDNF Regulates the Maturation of Inhibition and the Critical Period of Plasticity in Mouse Visual Cortex ». Cell 98(6):739‑55. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81509-3.

Huberfeld, Gilles, Thomas Blauwblomme, et Richard Miles. 2015. « Hippocampus and epilepsy: findings from human tissues ». Revue neurologique 171(3):236‑51. doi: 10.1016/j.neurol.2015.01.563.

Huberfeld, Gilles, Lucia Wittner, Stéphane Clemenceau, Michel Baulac, Kai Kaila, Richard Miles, et Claudio Rivera. 2007. « Perturbed Chloride Homeostasis and GABAergic Signaling in Human Temporal Lobe Epilepsy ». Journal of Neuroscience 27(37):9866‑73. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2761-07.2007.

Hübner, Christian A., Valentin Stein, Irm Hermans-Borgmeyer, Torsten Meyer, Klaus Ballanyi, et Thomas J. Jentsch. 2001. « Disruption of KCC2 Reveals an Essential Role of K-Cl Cotransport Already in Early Synaptic Inhibition ». Neuron 30(2):515‑24. doi: 10.1016/S0896-6273(01)00297-5.

Huerta, Patriclo T., et John E. Lisman. 1993. « Heightened Synaptic Plasticity of Hippocampal CA1 Neurons during a Cholinergically Induced Rhythmic State ». Nature 364(6439):723‑25. doi: 10.1038/364723a0.

Huxter, John R., Timothy J. Senior, Kevin Allen, et Jozsef Csicsvari. 2008. « Theta Phase–Specific Codes for Two-Dimensional Position, Trajectory and Heading in the Hippocampus ». Nature Neuroscience 11(5):587‑94. doi: 10.1038/nn.2106.

Inoue, Hana, Shin-ichiro Mori, Shigeru Morishima, et Yasunobu Okada. 2005. « Volume-Sensitive Chloride Channels in Mouse Cortical Neurons: Characterization and Role in Volume Regulation ». European Journal of Neuroscience 21(6):1648‑58. doi: 10.1111/j.1460-9568.2005.04006.x.

Ishizuka, Norio, W. Maxwell Cowan, et David G. Amaral. 1995. « A Quantitative Analysis of the Dendritic Organization of Pyramidal Cells in the Rat Hippocampus ». Journal of Comparative Neurology 362(1):17‑45. doi: 10.1002/cne.903620103.

Iwai, Youichi, Michela Fagiolini, Kunihiko Obata, et Takao K. Hensch. 2003. « Rapid Critical Period Induction by Tonic Inhibition in Visual Cortex ». Journal of Neuroscience 23(17):6695‑6702. doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-17-06695.2003.

Jacob, Tija C., Stephen J. Moss, et Rachel Jurd. 2008. « GABAA Receptor Trafficking and Its Role in the Dynamic Modulation of Neuronal Inhibition ». Nature Reviews Neuroscience 9(5):331‑43. doi: 10.1038/nrn2370.

Jefferys, John G. R. 2010. « Advances in Understanding Basic Mechanisms of Epilepsy and Seizures ». Seizure 19(10):638‑46. doi: 10.1016/j.seizure.2010.10.026.

Jensen, Ole, et Laura L. Colgin. 2007. « Cross-Frequency Coupling between Neuronal Oscillations ». Trends in Cognitive Sciences 11(7):267‑69. doi: 10.1016/j.tics.2007.05.003.

Jhuang, Hueihan, Estibaliz Garrote, Xinlin Yu, Vinita Khilnani, Tomaso Poggio, Andrew D. Steele, et Thomas Serre. 2010. « Automated Home-Cage Behavioural Phenotyping of Mice ». Nature Communications 1(1):68. doi: 10.1038/ncomms1064.

Jones, Mathew V., et Gary L. Westbrook. 1995. « Desensitized States Prolong GABAA Channel Responses to Brief Agonist Pulses ». Neuron 15(1):181‑91. doi: 10.1016/0896-6273(95)90075-6.

Kabra, Mayank, Alice A. Robie, Marta Rivera-Alba, Steven Branson, et Kristin Branson. 2013. « JAABA: Interactive Machine Learning for Automatic Annotation of Animal Behavior ». Nature Methods 10(1):64‑67. doi: 10.1038/nmeth.2281.

Kahle, Kristopher T., Jesse Rinehart, et Richard P. Lifton. 2010. « Phosphoregulation of the Na–K–2Cl and K–Cl Cotransporters by the WNK Kinases ». Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease 1802(12):1150‑58. doi: 10.1016/j.bbadis.2010.07.009.

Kahle, Kristopher T., Kevin J. Staley, Brian V. Nahed, Gerardo Gamba, Steven C. Hebert, Richard P. Lifton, et David B. Mount. 2008. « Roles of the Cation-Chloride Cotransporters in Neurological Disease ». Nature Clinical Practice. Neurology 4(9):490‑503. doi: 10.1038/ncpneuro0883.

Kelsch, Wolfgang, Sheriar Hormuzdi, Emine Straube, Andrea Lewen, Hannah Monyer, et Ulrich Misgeld. 2001. « Insulin-Like Growth Factor 1 and a Cytosolic Tyrosine Kinase Activate Chloride Outward Transport during Maturation of Hippocampal Neurons ». Journal of Neuroscience 21(21):8339‑47. doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-21-08339.2001.

Khalilov, Ilgam, Volodymyr Dzhala, Igor Medina, Xavier Leinekugel, Zara Melyan, Karri Lamsa, Roustem Khazipov, et Yehezkel Ben-Ari. 1999. « Maturation of Kainate-Induced Epileptiform Activities in Interconnected Intact Neonatal Limbic Structures in Vitro ». European Journal of Neuroscience 11(10):3468‑80. doi: 10.1046/j.1460-9568.1999.00768.x.

Kharod, Shivani C., Seok Kyu Kang, et Shilpa D. Kadam. 2019. « Off-Label Use of Bumetanide for Brain Disorders: An Overview ». Frontiers in Neuroscience 0. doi: 10.3389/fnins.2019.00310.

Khazipov, R., X. Leinekugel, I. Khalilov, J. L. Gaiarsa, et Y. Ben-Ari. 1997. « Synchronization of GABAergic Interneuronal Network in CA3 Subfield of Neonatal Rat Hippocampal

Slices. » The Journal of Physiology 498(3):763‑72. doi: 10.1113/jphysiol.1997.sp021900.

Khazipov, Rustem, Anton Sirota, Xavier Leinekugel, Gregory L. Holmes, Yehezkel Ben-Ari, et György Buzsáki. 2004. « Early Motor Activity Drives Spindle Bursts in the Developing Somatosensory Cortex ». Nature 432(7018):758‑61. doi: 10.1038/nature03132.

Khirug, Stanislav, Junko Yamada, Ramil Afzalov, Juha Voipio, Leonard Khiroug, et Kai Kaila. 2008. « GABAergic Depolarization of the Axon Initial Segment in Cortical Principal Neurons Is Caused by the Na–K–2Cl Cotransporter NKCC1 ». Journal of Neuroscience 28(18):4635‑39. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0908-08.2008.

Kirmse, Knut, Michael Kummer, Yury Kovalchuk, Otto W. Witte, Olga Garaschuk, et Knut Holthoff. 2015. « GABA Depolarizes Immature Neurons and Inhibits Network Activity in the Neonatal Neocortex in Vivo ». Nature Communications 6(1):7750. doi: 10.1038/ncomms8750.

Klausberger, Thomas, Peter J. Magill, László F. Márton, J. David B. Roberts, Philip M. Cobden, György Buzsáki, et Peter Somogyi. 2003. « Brain-State- and Cell-Type-Specific Firing of Hippocampal Interneurons in Vivo ». Nature 421(6925):844‑48. doi: 10.1038/nature01374.

Klausberger, Thomas, László F. Márton, Agnes Baude, J. David B. Roberts, Peter J. Magill, et Peter Somogyi. 2004. « Spike Timing of Dendrite-Targeting Bistratified Cells during Hippocampal Network Oscillations in Vivo ». Nature Neuroscience 7(1):41‑47. doi: 10.1038/nn1159.

Klausberger, Thomas, et Peter Somogyi. 2008. « Neuronal Diversity and Temporal Dynamics: The Unity of Hippocampal Circuit Operations ». Science (New York, N.Y.) 321(5885):53‑57. doi: 10.1126/science.1149381.

Kourdougli, Nazim, Christophe Pellegrino, Juho-Matti Renko, Stanislav Khirug, Geneviève Chazal, Tiina-Kaisa Kukko-Lukjanov, Sari E. Lauri, Jean-Luc Gaiarsa, Liang Zhou, Angélique Peret, Eero Castrén, Raimo K. Tuominen, Valérie Crépel, et Claudio Rivera. 2017. « Depolarizing γ-Aminobutyric Acid Contributes to Glutamatergic Network Rewiring in Epilepsy ». Annals of Neurology 81(2):251‑65. doi: 10.1002/ana.24870.

Krook-Magnuson, Esther, Caren Armstrong, Mikko Oijala, et Ivan Soltesz. 2013. « On-Demand Optogenetic Control of Spontaneous Seizures in Temporal Lobe Epilepsy ». Nature Communications 4(1):1376. doi: 10.1038/ncomms2376.

Kulik, Ákos, Imre Vida, Yugo Fukazawa, Nicole Guetg, Yu Kasugai, Cheryl L. Marker, Franck Rigato, Bernhard Bettler, Kevin Wickman, Michael Frotscher, et Ryuichi Shigemoto. 2006. « Compartment-Dependent Colocalization of Kir3.2-Containing K+ Channels and GABAB Receptors in Hippocampal Pyramidal Cells ». Journal of Neuroscience 26(16):4289‑97. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4178-05.2006.

Kullmann, Dimitri M. 2011. « Interneuron Networks in the Hippocampus ». Current Opinion in Neurobiology 8.

Lansner, Anders. 2009. « Associative Memory Models: From the Cell-Assembly Theory to

Biophysically Detailed Cortex Simulations ». Trends in Neurosciences 32(3):178‑86. doi: 10.1016/j.tins.2008.12.002.

Lee, Henry H. C., Joshua A. Walker, Jeffery R. Williams, Richard J. Goodier, John A. Payne, et Stephen J. Moss. 2007. « Direct Protein Kinase C-Dependent Phosphorylation Regulates the Cell Surface Stability and Activity of the Potassium Chloride Cotransporter KCC2 ». Journal of Biological Chemistry 282(41):29777‑84. doi: 10.1074/jbc.M705053200.*

Lee, Sang-Hun, Ivan Marchionni, Marianne Bezaire, Csaba Varga, Nathan Danielson, Matthew Lovett-Barron, Attila Losonczy, et Ivan Soltesz. 2014. « Parvalbumin-Positive Basket Cells Differentiate among Hippocampal Pyramidal Cells ». Neuron 82(5):1129‑44. doi: 10.1016/j.neuron.2014.03.034.

Leinekugel, X., V. Tseeb, Y. Ben-Ari, et P. Bregestovski. 1995. « Synaptic GABAA Activation Induces Ca2+ Rise in Pyramidal Cells and Interneurons from Rat Neonatal Hippocampal Slices. » The Journal of Physiology 487(2):319‑29. doi: 10.1113/jphysiol.1995.sp020882.

Leinekugel, Xavier, Rustem Khazipov, Robert Cannon, Hajime Hirase, Yehezkel Ben-Ari, et György Buzsáki. 2002. « Correlated Bursts of Activity in the Neonatal Hippocampus in Vivo ». Science. doi: 10.1126/science.1071111.

Leinekugel, Xavier, Igor Medina, Ilgam Khalilov, Yehezkel Ben-Ari, et Roustem Khazipov. 1997. « Ca2+ Oscillations Mediated by the Synergistic Excitatory Actions of GABAA and NMDA Receptors in the Neonatal Hippocampus ». Neuron 18(2):243‑55. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80265-2.

Lemonnier, E., C. Degrez, M. Phelep, R. Tyzio, F. Josse, M. Grandgeorge, N. Hadjikhani, et Y. Ben-Ari. 2012. « A Randomised Controlled Trial of Bumetanide in the Treatment of Autism in Children ». Translational Psychiatry 2(12):e202‑e202. doi: 10.1038/tp.2012.124.

Lemonnier, E., N. Villeneuve, S. Sonie, S. Serret, A. Rosier, M. Roue, P. Brosset, M. Viellard, D. Bernoux, S. Rondeau, S. Thummler, D. Ravel, et Y. Ben-Ari. 2017. « Effects of Bumetanide on Neurobehavioral Function in Children and Adolescents with Autism Spectrum Disorders ». Translational Psychiatry 7(3):e1056‑e1056. doi: 10.1038/tp.2017.10.

Lemonnier, Eric, et Yehezkel Ben-Ari. 2010. « The Diuretic Bumetanide Decreases Autistic Behaviour in Five Infants Treated during 3 Months with No Side Effects ». Acta Paediatrica 99(12):1885‑88. doi: 10.1111/j.1651-2227.2010.01933.x.

Li, Hong, Stanislav Khirug, Chunlin Cai, Anastasia Ludwig, Peter Blaesse, Julia Kolikova, Ramil Afzalov, Sarah K. Coleman, Sari Lauri, Matti S. Airaksinen, Kari Keinänen, Leonard Khiroug, Mart Saarma, Kai Kaila, et Claudio Rivera. 2007. « KCC2 Interacts with the Dendritic Cytoskeleton to Promote Spine Development ». Neuron 56(6):1019‑33. doi: 10.1016/j.neuron.2007.10.039.

Li, X. G., P. Somogyi, A. Ylinen, et G. Buzsáki. 1994. « The Hippocampal CA3 Network: An in Vivo Intracellular Labeling Study ». Journal of Comparative Neurology

339(2):181‑208. doi: 10.1002/cne.903390204.

Li, Xiubin, Jueqian Zhou, Ziyi Chen, Shuda Chen, Feiqi Zhu, et Liemin Zhou. 2008. « Long-Term Expressional Changes of Na+–K+–Cl− Co-Transporter 1 (NKCC1) and K+–Cl− Co-Transporter 2 (KCC2) in CA1 Region of Hippocampus Following Lithium-Pilocarpine Induced Status Epilepticus (PISE) ». Brain Research 1221:141‑46. doi: 10.1016/j.brainres.2008.04.047.

Li, Yixin, Yang Zhou, Li Peng, et Yong Zhao. 2017. « Reduced Protein Expressions of Cytomembrane GABAARβ3 at Different Postnatal Developmental Stages of Rats Exposed Prenatally to Valproic Acid ». Brain Research 1671:33‑42. doi: 10.1016/j.brainres.2017.06.018.

Lippincott Williams & Wilkins. 2007. « Wolters Kluwer Health | Neuroscience: Exploring the Brain, 3e Chapter 5: Synaptic Transmission. - ppt download ». Consulté 14 septembre 2022 (https://slideplayer.com/slide/7726477/).

Lisman, John, Howard Schulman, et Hollis Cline. 2002. « The Molecular Basis of CaMKII Function in Synaptic and Behavioural Memory ». Nature Reviews Neuroscience 3(3):175‑90. doi: 10.1038/nrn753.

Lomeli, Hilda, Johannes Mosbacher, Thorsten Melcher, Thomas Höger, Jörg R. P. Geiger, Thomas Kuner, Hannah Monyer, Miyoko Higuchi, Alfred Bach, et Peter H. Seeburg. 1994. « Control of Kinetic Properties of AMPA Receptor Channels by Nuclear RNA Editing ». Science 266(5191):1709‑13. doi: 10.1126/science.7992055.

Luhmann, H. J., et D. A. Prince. 1991. « Postnatal maturation of the GABAergic system in rat neocortex ». Journal of Neurophysiology 65(2):247‑63. doi: 10.1152/jn.1991.65.2.247.

Lynch, Gary, John Larson, Stephen Kelso, German Barrionuevo, et Frank Schottler. 1983. « Intracellular Injections of EGTA Block Induction of Hippocampal Long-Term Potentiation ». Nature 305(5936):719‑21. doi: 10.1038/305719a0.

Maccaferri, Gianmaria, J. David, B. Roberts, Peter Szucs, Carol A. Cottingham, et Peter Somogyi. 2000. « Cell Surface Domain Specific Postsynaptic Currents Evoked by Identified GABAergic Neurones in Rat Hippocampus in Vitro ». The Journal of Physiology 524(1):91‑116. doi: 10.1111/j.1469-7793.2000.t01-3-00091.x.

Magee, Jeffrey C., et Daniel Johnston. 1997. « A Synaptically Controlled, Associative Signal for Hebbian Plasticity in Hippocampal Neurons ». Science. doi: 10.1126/science.275.5297.209.

Magloire, Vincent, Jonathan Cornford, Andreas Lieb, Dimitri M. Kullmann, et Ivan Pavlov. 2019. « KCC2 Overexpression Prevents the Paradoxical Seizure-Promoting Action of Somatic Inhibition ». Nature Communications 10(1):1225. doi: 10.1038/s41467-019-08933-4.

Malenka, Robert C. 1994. « Synaptic Plasticity in the Hippocampus: LTP and LTD ». Cell 78(4):535‑38. doi: 10.1016/0092-8674(94)90517-7.

Malenka, Robert C., Julie A. Kauer, Robert S. Zucker, et Roger A. Nicoll. 1988.

« Postsynaptic Calcium Is Sufficient for Potentiation of Hippocampal Synaptic Transmission ». Science. doi: 10.1126/science.2845577.

von der Malsburg, Christoph. 1999. « The What and Why of Binding: The Modeler's Perspective ». Neuron 24(1):95‑104. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80825-9.

Markkanen, Marika, Tuula Karhunen, Olaya Llano, Anastasia Ludwig, Claudio Rivera, Pavel Uvarov, et Matti S. Airaksinen. 2014. « Distribution of Neuronal KCC2a and KCC2b Isoforms in Mouse CNS ». Journal of Comparative Neurology 522(8):1897‑1914. doi: 10.1002/cne.23510.

Markowitz, Jeffrey E., Winthrop F. Gillis, Celia C. Beron, Shay Q. Neufeld, Keiramarie Robertson, Neha D. Bhagat, Ralph E. Peterson, Emalee Peterson, Minsuk Hyun, Scott W. Linderman, Bernardo L. Sabatini, et Sandeep Robert Datta. 2018. « The Striatum Organizes 3D Behavior via Moment-to-Moment Action Selection ». Cell 174(1):44-58.e17. doi: 10.1016/j.cell.2018.04.019.

Markram, Henry, Joachim Lübke, Michael Frotscher, et Bert Sakmann. 1997. « Regulation of Synaptic Efficacy by Coincidence of Postsynaptic APs and EPSPs ». Science. doi: 10.1126/science.275.5297.213.

Marr, D. 1971. « Simple Memory: A Theory for Archicortex ». Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences 262(841):23‑81. doi: 10.1098/rstb.1971.0078.

Mathis, Alexander, Pranav Mamidanna, Kevin M. Cury, Taiga Abe, Venkatesh N. Murthy, Mackenzie Weygandt Mathis, et Matthias Bethge. 2018. « DeepLabCut: Markerless Pose Estimation of User-Defined Body Parts with Deep Learning ». Nature Neuroscience 21(9):1281‑89. doi: 10.1038/s41593-018-0209-y.

Matsumoto, H., et C. A. Marsan. 1964. « CORTICAL CELLULAR PHENOMENA IN EXPERIMENTAL EPILEPSY: ICTAL MANIFESTATIONS ». Experimental Neurology 9:305‑26. doi: 10.1016/0014-4886(64)90026-3.

McBain, C. J., T. J. DiChiara, et J. A. Kauer. 1994. « Activation of Metabotropic Glutamate Receptors Differentially Affects Two Classes of Hippocampal Interneurons and Potentiates Excitatory Synaptic Transmission ». Journal of Neuroscience 14(7):4433‑45. doi: 10.1523/JNEUROSCI.14-07-04433.1994.

McNaughton, B. L., et R. G. M. Morris. 1987. « Hippocampal Synaptic Enhancement and Information Storage within a Distributed Memory System ». Trends in Neurosciences 10(10):408‑15. doi: 10.1016/0166-2236(87)90011-7.

Mendez, Maria Andreina, Jamie Horder, Jim Myers, Suzanne Coghlan, Paul Stokes, David Erritzoe, Oliver Howes, Anne Lingford-Hughes, Declan Murphy, et David Nutt. 2013. « The Brain GABA-Benzodiazepine Receptor Alpha-5 Subtype in Autism Spectrum Disorder: A Pilot [11C]Ro15-4513 Positron Emission Tomography Study ». Neuropharmacology 68:195‑201. doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.04.008.

Menendez de la Prida, Liset, Gilles Huberfeld, Ivan Cohen, et Richard Miles. 2006. « Threshold Behavior in the Initiation of Hippocampal Population Bursts ». Neuron 49(1):131‑42. doi: 10.1016/j.neuron.2005.10.034.

Miles, R., et R. K. Wong. 1986. « Excitatory Synaptic Interactions between CA3 Neurones in the Guinea-Pig Hippocampus. » The Journal of Physiology 373(1):397‑418. doi: 10.1113/jphysiol.1986.sp016055.

Miles, Richard, Katalin Tóth, Attila I. Gulyás, Norbert Hájos, et Tamas F. Freund. 1996. « Differences between Somatic and Dendritic Inhibition in the Hippocampus ». Neuron 16(4):815‑23. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80101-4.

Miles, Richard, et Robert K. S. Wong. 1983. « Single Neurones Can Initiate Synchronized Population Discharge in the Hippocampus ». Nature 306(5941):371‑73. doi: 10.1038/306371a0.

Miller, Paul S., et A. Radu Aricescu. 2014. « Crystal Structure of a Human GABAA Receptor ». Nature 512(7514):270‑75. doi: 10.1038/nature13293.

Milner, P. M. 1993. « The Mind and Donald O. Hebb ». Scientific American 268(1):124‑29. doi: 10.1038/scientificamerican0193-124.

Mody, I., Y. De Koninck, T. S. Otis, et I. Soltesz. 1994. « Bridging the Cleft at GABA Synapses in the Brain ». Trends in Neurosciences 17(12):517‑25. doi: 10.1016/0166-2236(94)90155-4.

Mody, Istvan, et Robert A. Pearce. 2004. « Diversity of Inhibitory Neurotransmission through GABAA Receptors ». Trends in Neurosciences 27(9):569‑75. doi: 10.1016/j.tins.2004.07.002.

Montcouquiol, Mireille, E. Bryan Crenshaw, et Matthew W. Kelley. 2006. « Noncanonical wnt signaling and neural polarity ». Annual Review of Neuroscience 29(1):363‑86. doi: 10.1146/annurev.neuro.29.051605.112933.

Moore, Yvonne E., Leslie C. Conway, Heike J. Wobst, Nicholas J. Brandon, Tarek Z. Deeb, et Stephen J. Moss. 2019. « Developmental Regulation of KCC2 Phosphorylation Has Long-Term Impacts on Cognitive Function ». Frontiers in Molecular Neuroscience 0. doi: 10.3389/fnmol.2019.00173.

Moore, Yvonne E., Matt R. Kelley, Nicholas J. Brandon, Tarek Z. Deeb, et Stephen J. Moss. 2017. « Seizing Control of KCC2: A New Therapeutic Target for Epilepsy ». Trends in Neurosciences 40(9):555‑71. doi: 10.1016/j.tins.2017.06.008.

Moore-Hoon, Marilyn L., et R. James Turner. 2000. « The Structural Unit of the Secretory Na+−K+−2Cl- Cotransporter (NKCC1) Is a Homodimer ». Biochemistry 39(13):3718‑24. doi: 10.1021/bi992301v.

Moser, May-Britt, David C. Rowland, et Edvard I. Moser. 2015. « Place Cells, Grid Cells, and Memory ». Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 7(2):a021808. doi: 10.1101/cshperspect.a021808.

Murata, Yasunobu, et Matthew T. Colonnese. 2020. « GABAergic interneurons excite neonatal hippocampus in vivo ». Science Advances 6(24). doi: 10.1126/sciadv.aba1430.

Nakazawa, Kazu, Michael C. Quirk, Raymond A. Chitwood, Masahiko Watanabe, Mark F.

Yeckel, Linus D. Sun, Akira Kato, Candice A. Carr, Daniel Johnston, Matthew A. Wilson, et Susumu Tonegawa. 2002. « Requirement for Hippocampal CA3 NMDA Receptors in Associative Memory Recall ». Science (New York, N.Y.) 297(5579):211‑18. doi: 10.1126/science.1071795.

Nardou, Romain, Yehezkel Ben-Ari, et Ilgam Khalilov. 2009. « Bumetanide, an NKCC1 Antagonist, Does Not Prevent Formation of Epileptogenic Focus but Blocks Epileptic Focus Seizures in Immature Rat Hippocampus ». Journal of Neurophysiology 101(6):2878‑88. doi: 10.1152/jn.90761.2008.

Nardou, Romain, Sumii Yamamoto, Geneviève Chazal, Asma Bhar, Nadine Ferrand, Olivier Dulac, Yehezkel Ben-Ari, et Ilgam Khalilov. 2011. « Neuronal Chloride Accumulation and Excitatory GABA Underlie Aggravation of Neonatal Epileptiform Activities by Phenobarbital ». Brain 134(4):987‑1002. doi: 10.1093/brain/awr041.

Nestler, Eric J., et Steven E. Hyman. 2010. « Animal Models of Neuropsychiatric Disorders ». Nature Neuroscience 13(10):1161‑69. doi: 10.1038/nn.2647.

Nurse, Suzanne, et Jean-Claude Lacaille. 1999. « Late Maturation of GABAB Synaptic Transmission in Area CA1 of the Rat Hippocampus ». Neuropharmacology 38(11):1733‑42. doi: 10.1016/S0028-3908(99)00122-7.

Nusser, Zoltan, Stuart Cull-Candy, et Mark Farrant. 1997. « Differences in Synaptic GABAA Receptor Number Underlie Variation in GABA Mini Amplitude ». Neuron 19(3):697‑709. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80382-7.

Oblak, A., T. t. Gibbs, et G. j. Blatt. 2009. « Decreased GABAA Receptors and Benzodiazepine Binding Sites in the Anterior Cingulate Cortex in Autism ». Autism Research 2(4):205‑19. doi: 10.1002/aur.88.

Ogiwara, Ikuo, Hiroyuki Miyamoto, Noriyuki Morita, Nafiseh Atapour, Emi Mazaki, Ikuyo Inoue, Tamaki Takeuchi, Shigeyoshi Itohara, Yuchio Yanagawa, Kunihiko Obata, Teiichi Furuichi, Takao K. Hensch, et Kazuhiro Yamakawa. 2007. « Nav1.1 Localizes to Axons of Parvalbumin-Positive Inhibitory Interneurons: A Circuit Basis for Epileptic Seizures in Mice Carrying an Scn1a Gene Mutation ». Journal of Neuroscience 27(22):5903‑14. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5270-06.2007.

O'Keefe, J., et D. H. Conway. 1978. « Hippocampal Place Units in the Freely Moving Rat: Why They Fire Where They Fire ». Experimental Brain Research 31(4):573‑90. doi: 10.1007/BF00239813.

O'Keefe, J., et J. Dostrovsky. 1971. « The Hippocampus as a Spatial Map. Preliminary Evidence from Unit Activity in the Freely-Moving Rat ». Brain Research 34(1):171‑75. doi: 10.1016/0006-8993(71)90358-1.

O'Keefe, John, et Michael L. Recce. 1993. « Phase Relationship between Hippocampal Place Units and the EEG Theta Rhythm ». Hippocampus 3(3):317‑30. doi: 10.1002/hipo.450030307.

Olsen, Richard W., et Werner Sieghart. 2009. « GABAA Receptors: Subtypes Provide Diversity of Function and Pharmacology ». Neuropharmacology 56(1):141‑48. doi:

10.1016/j.neuropharm.2008.07.045.

O'Neill, Nathanael, et Sergiy Sylantyev. 2018. « Spontaneously Opening GABAA Receptors Play a Significant Role in Neuronal Signal Filtering and Integration ». Cell Death & Disease 9(8):1‑15. doi: 10.1038/s41419-018-0856-7.

Owens, David F., Xiaolin Liu, et Arnold R. Kriegstein. 1999. « Changing Properties of GABAA Receptor–Mediated Signaling During Early Neocortical Development ». Journal of Neurophysiology 82(2):570‑83. doi: 10.1152/jn.1999.82.2.570.

Ozawa, Seiji, Haruyuki Kamiya, et Keisuke Tsuzuki. 1998. « Glutamate Receptors in the Mammalian Central Nervous System ». Progress in Neurobiology 54(5):581‑618. doi: 10.1016/S0301-0082(97)00085-3.

Pallud, Johan, Michel Le Van Quyen, Franck Bielle, Christophe Pellegrino, Pascale Varlet, Marianne Labussiere, Noémie Cresto, Marie-Joseph Dieme, Michel Baulac, Charles Duyckaerts, Nazim Kourdougli, Geneviève Chazal, Bertrand Devaux, Claudio Rivera, Richard Miles, Laurent Capelle, et Gilles Huberfeld. 2014. « Cortical GABAergic Excitation Contributes to Epileptic Activities around Human Glioma ». Science Translational Medicine. doi: 10.1126/scitranslmed.3008065.

Park, Sung-Ho, et Franz Weber. 2020. « Neural and Homeostatic Regulation of REM Sleep ». Frontiers in Psychology 11.

Parra, Paula, Attila I. Gulyás, et Richard Miles. 1998. « How Many Subtypes of Inhibitory Cells in the Hippocampus? » Neuron 20(5):983‑93. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80479-1.

Pathak, H. R., F. Weissinger, M. Terunuma, G. C. Carlson, F. C. Hsu, S. J. Moss, et D. A. Coulter. 2007. « Disrupted Dentate Granule Cell Chloride Regulation Enhances Synaptic Excitability during Development of Temporal Lobe Epilepsy ». Journal of Neuroscience 27(51):14012‑22. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4390-07.2007.

Paulsen, Ole, et Edvard Moser. 1998. « A Model of Hippocampal Memory Encoding and Retrieval: GABAergic Control of Synaptic Plasticity ». Trends in Neurosciences 21(7):273‑78. doi: 10.1016/S0166-2236(97)01205-8.

Pawelzik, Hannelore, A. Peter Bannister, Jim Deuchars, Maria Ilia, et Alex M. Thomson. 1999. « Modulation of Bistratified Cell IPSPs and Basket Cell IPSPs by Pentobarbitone Sodium, Diazepam and Zn2+: Dual Recordings in Slices of Adult Rat Hippocampus ». European Journal of Neuroscience 11(10):3552‑64. doi: 10.1046/j.1460-9568.1999.00772.x.

Payne, John A. 1997. « Functional characterization of the neuronal-specific K-Cl cotransporter: implications for [K+]oregulation ». American Journal of Physiology-Cell Physiology 273(5):C1516‑25. doi: 10.1152/ajpcell.1997.273.5.C1516.

Payne, John A., et Bliss Forbush. 1995. « Molecular Characterization of the Epithelial Na□K□Cl Cotransporter Isoforms ». Current Opinion in Cell Biology 7(4):493‑503. doi: 10.1016/0955-0674(95)80005-0.

Payne, John A., Tamara J. Stevenson, et Lucy F. Donaldson. 1996. « Molecular

Characterization of a Putative K-Cl Cotransporter in Rat Brain: A NEURONAL-SPECIFIC ISOFORM ». Journal of Biological Chemistry 271(27):16245‑52. doi: 10.1074/jbc.271.27.16245.*

Pelkey, Kenneth A., Ramesh Chittajallu, Michael T. Craig, Ludovic Tricoire, Jason C. Wester, et Chris J. McBain. 2017. « Hippocampal GABAergic Inhibitory Interneurons ». Physiological Reviews 97(4):1619‑1747. doi: 10.1152/physrev.00007.2017.

Pereira, Talmo D., Diego E. Aldarondo, Lindsay Willmore, Mikhail Kislin, Samuel S. H. Wang, Mala Murthy, et Joshua W. Shaevitz. 2019. « Fast Animal Pose Estimation Using Deep Neural Networks ». Nature Methods 16(1):117‑25. doi: 10.1038/s41592-018-0234-5.

Pereira, Talmo D., Joshua W. Shaevitz, et Mala Murthy. 2020. « Quantifying Behavior to Understand the Brain ». Nature Neuroscience 23(12):1537‑49. doi: 10.1038/s41593-020-00734-z.

Pin, J. P., et R. Duvoisin. 1995. « The Metabotropic Glutamate Receptors: Structure and Functions ». Neuropharmacology 34(1):1‑26. doi: 10.1016/0028-3908(94)00129-G.

Pinard, Audrée, Riad Seddik, et Bernhard Bettler. 2010. « GABAB Receptors: Physiological Functions and Mechanisms of Diversity ». P. 231‑55 in Advances in Pharmacology. Vol. 58, GABAReceptor Pharmacology, édité par T. P. Blackburn. Academic Press.

Pisella, Lucie I., Jean-Luc Gaiarsa, Diabé Diabira, Jinwei Zhang, Ilgam Khalilov, JingJing Duan, Kristopher T. Kahle, et Igor Medina. 2019. « Impaired Regulation of KCC2 Phosphorylation Leads to Neuronal Network Dysfunction and Neurodevelopmental Pathology ». Science Signaling. doi: 10.1126/scisignal.aay0300.

Pol, Anthony N. van den, Karl Obrietan, et Gong Chen. 1996. « Excitatory Actions of GABA after Neuronal Trauma ». Journal of Neuroscience 16(13):4283‑92. doi: 10.1523/JNEUROSCI.16-13-04283.1996.

Poncer, Jean-Christophe, R. Anne McKinney, Beat H. Gähwiler, et Scott M. Thompson. 1997. « Either N- or P-Type Calcium Channels Mediate GABA Release at Distinct Hippocampal Inhibitory Synapses ». Neuron 18(3):463‑72. doi: 10.1016/S0896-6273(00)81246-5.

Pouille, Frédéric, et Massimo Scanziani. 2001. « Enforcement of Temporal Fidelity in Pyramidal Cells by Somatic Feed-Forward Inhibition ». Science. doi: 10.1126/science.1060342.

Pouille, Frédéric, et Massimo Scanziani. 2004. « Routing of Spike Series by Dynamic Circuits in the Hippocampus ». Nature 429(6993):717‑23. doi: 10.1038/nature02615.

Povysheva, Nadezhda V., Aleksey V. Zaitsev, Guillermo Gonzalez-Burgos, et David A. Lewis. 2013. « Electrophysiological Heterogeneity of Fast-Spiking Interneurons: Chandelier versus Basket Cells » édité par G. Maccaferri. PLoS ONE 8(8):e70553. doi: 10.1371/journal.pone.0070553.

Raimondo, Joseph V., Louise Kay, Tommas J. Ellender, et Colin J. Akerman. 2012.

« Optogenetic Silencing Strategies Differ in Their Effects on Inhibitory Synaptic Transmission ». Nature Neuroscience 15(8):1102‑4. doi: 10.1038/nn.3143.

Ramón y Cajal, Santiago (1852-1934) Auteur du texte. 1909. Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés. Cervelet, cerveau moyen, rétine, couche optique, corps strié, écorce cérébrale générale et régionale, grand sympathique / par S. Ramon Cajal,...

Ravizza, Teresa, Barbara Gagliardi, Francesco Noé, Karin Boer, Eleonora Aronica, et Annamaria Vezzani. 2008. « Innate and Adaptive Immunity during Epileptogenesis and Spontaneous Seizures: Evidence from Experimental Models and Human Temporal Lobe Epilepsy ». Neurobiology of Disease 29(1):142‑60. doi: 10.1016/j.nbd.2007.08.012.

Rheims, Sylvain, Carl D. Holmgren, Genevieve Chazal, Jan Mulder, Tibor Harkany, Tanya Zilberter, et Yuri Zilberter. 2009. « GABA Action in Immature Neocortical Neurons Directly Depends on the Availability of Ketone Bodies ». Journal of Neurochemistry 110(4):1330‑38. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06230.x.

Riekki, Ruusu, Ivan Pavlov, Janne Tornberg, Sari E. Lauri, Matti S. Airaksinen, et Tomi Taira. 2008. « Altered Synaptic Dynamics and Hippocampal Excitability but Normal Long-Term Plasticity in Mice Lacking Hyperpolarizing GABA $_A$ Receptor-Mediated Inhibition in CA1 Pyramidal Neurons ». Journal of Neurophysiology 99(6):3075‑89. doi: 10.1152/jn.00606.2007.

Rigau, Valérie, Mélanie Morin, Marie-Claude Rousset, Frédéric de Bock, Aurore Lebrun, Philippe Coubes, Marie-Christine Picot, Michel Baldy-Moulinier, Joël Bockaert, Arielle Crespel, et Mireille Lerner-Natoli. 2007. « Angiogenesis Is Associated with Blood–Brain Barrier Permeability in Temporal Lobe Epilepsy ». Brain 130(7):1942‑56. doi: 10.1093/brain/awm118.

Rinehart, Jesse, Yelena D. Maksimova, Jessica E. Tanis, Kathryn L. Stone, Caleb A. Hodson, Junhui Zhang, Mary Risinger, Weijun Pan, Dianqing Wu, Christopher M. Colangelo, Biff Forbush, Clinton H. Joiner, Erol E. Gulcicek, Patrick G. Gallagher, et Richard P. Lifton. 2009. « Sites of Regulated Phosphorylation That Control K-Cl Cotransporter Activity ». Cell 138(3):525‑36. doi: 10.1016/j.cell.2009.05.031.

Rivera, Claudio, Juha Voipio, et Kai Kaila. 2005. « Two Developmental Switches in GABAergic Signalling: The K+–Cl− Cotransporter KCC2 and Carbonic Anhydrase CAVII ». The Journal of Physiology 562(1):27‑36. doi: 10.1113/jphysiol.2004.077495.

Rivera, Claudio, Juha Voipio, John A. Payne, Eva Ruusuvuori, Hannele Lahtinen, Karri Lamsa, Ulla Pirvola, Mart Saarma, et Kai Kaila. 1999. « The K+/Cl− Co-Transporter KCC2 Renders GABA Hyperpolarizing during Neuronal Maturation ». Nature 397(6716):251‑55. doi: 10.1038/16697.

Rost, Benjamin R., Patrick Nicholson, Gudrun Ahnert-Hilger, Andreas Rummel, Christian Rosenmund, Joerg Breustedt, et Dietmar Schmitz. 2011. « Activation of Metabotropic GABA Receptors Increases the Energy Barrier for Vesicle Fusion ». Journal of Cell Science 124(18):3066‑73. doi: 10.1242/jcs.074963.

Roux, Lisa, Bo Hu, Ronny Eichler, Eran Stark, et György Buzsáki. 2017. « Sharp Wave Ripples during Learning Stabilize the Hippocampal Spatial Map ». Nature Neuroscience 20(6):845‑53. doi: 10.1038/nn.4543.

Rovira, C., E. Cherubini, et Y. Ben-Ari. 1983. « Opposite Actions of Muscarinic and Nicotinic Agents on Hippocampal Dendritic Negative Fields Recorded in Rats ». Neuropharmacology 22(2):239‑43. doi: 10.1016/0028-3908(83)90015-1.

Royer, Sébastien, Boris V. Zemelman, Attila Losonczy, Jinhyun Kim, Frances Chance, Jeffrey C. Magee, et György Buzsáki. 2012. « Control of Timing, Rate and Bursts of Hippocampal Place Cells by Dendritic and Somatic Inhibition ». Nature Neuroscience 15(5):769‑75. doi: 10.1038/nn.3077.

Rudolph, Uwe, et Frédéric Knoflach. 2011. « Beyond Classical Benzodiazepines: Novel Therapeutic Potential of GABAA Receptor Subtypes ». Nature Reviews Drug Discovery 10(9):685‑97. doi: 10.1038/nrd3502.

Russell, John M. 2000. « Sodium-Potassium-Chloride Cotransport ». Physiological Reviews 80(1):211‑76. doi: 10.1152/physrev.2000.80.1.211.

Scanziani, Massimo. 2000. « GABA Spillover Activates Postsynaptic GABAB Receptors to Control Rhythmic Hippocampal Activity ». Neuron 25(3):673‑81. doi: 10.1016/S0896-6273(00)81069-7.

Scott, R. h., S. m. McGuirk, et A. c. Dolphin. 1988. « Modulation of Divalent Cation-Activated Chloride Ion Currents ». British Journal of Pharmacology 94(3):653‑62. doi: 10.1111/j.1476-5381.1988.tb11572.x.

Scoville, William Beecher, et Brenda Milner. 1957. « Loss of Recent Memory After Bilateral Hippocampal Lesions ». Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry 20(1):11‑21. doi: 10.1136/jnnp.20.1.11.

Seifert, Jessica R. K., et Marek Mlodzik. 2007. « Frizzled/PCP Signalling: A Conserved Mechanism Regulating Cell Polarity and Directed Motility ». Nature Reviews Genetics 8(2):126‑38. doi: 10.1038/nrg2042.

Semyanov, Alexey, Matthew C. Walker, Dimitri M. Kullmann, et R. Angus Silver. 2004. « Tonically Active GABAA Receptors: Modulating Gain and Maintaining the Tone ». Trends in Neurosciences 27(5):262‑69. doi: 10.1016/j.tins.2004.03.005.

Sen, Arjune, Lillian Martinian, Margareta Nikolic, Matthew C. Walker, Maria Thom, et Sanjay M. Sisodiya. 2007. « Increased NKCC1 Expression in Refractory Human Epilepsy ». Epilepsy Research 74(2):220‑27. doi: 10.1016/j.eplepsyres.2007.01.004.

Senior, Timothy J., John R. Huxter, Kevin Allen, Joseph O'Neill, et Jozsef Csicsvari. 2008. « Gamma Oscillatory Firing Reveals Distinct Populations of Pyramidal Cells in the CA1 Region of the Hippocampus ». Journal of Neuroscience 28(9):2274‑86. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4669-07.2008.

Shepherd, Gordon M. G., et Kristen M. Harris. 1998. « Three-Dimensional Structure and Composition of CA3→CA1 Axons in Rat Hippocampal Slices: Implications for Presynaptic Connectivity and Compartmentalization ». The Journal of Neuroscience

18(20):8300‑8310. doi: 10.1523/JNEUROSCI.18-20-08300.1998.

Shimada, S., G. Cutting, et G. R. Uhl. 1992. « Gamma-Aminobutyric Acid A or C Receptor? Gamma-Aminobutyric Acid Rho 1 Receptor RNA Induces Bicuculline-, Barbiturate-, and Benzodiazepine-Insensitive Gamma-Aminobutyric Acid Responses in Xenopus Oocytes. » Molecular Pharmacology 41(4):683‑87.

Sik, A., N. Tamamaki, et T. F. Freund. 1993. « Complete Axon Arborization of a Single CA3 Pyramidal Cell in the Rat Hippocampus, and Its Relationship With Postsynaptic Parvalbumin-Containing Interneurons ». European Journal of Neuroscience 5(12):1719‑28. doi: 10.1111/j.1460-9568.1993.tb00239.x.

Singer, W., et C. M. Gray. 1995. « Visual Feature Integration and the Temporal Correlation Hypothesis ». Annual Review of Neuroscience 18(1):555‑86. doi: 10.1146/annurev.ne.18.030195.003011.

Sivakumaran, Sudhir, Ross A. Cardarelli, Jamie Maguire, Matt R. Kelley, Liliya Silayeva, Danielle H. Morrow, Jayanta Mukherjee, Yvonne E. Moore, Robert J. Mather, Mark E. Duggan, Nicholas J. Brandon, John Dunlop, Stephen Zicha, Stephen J. Moss, et Tarek Z. Deeb. 2015. « Selective Inhibition of KCC2 Leads to Hyperexcitability and Epileptiform Discharges in Hippocampal Slices and In Vivo ». Journal of Neuroscience 35(21):8291‑96. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5205-14.2015.

Skaggs, William E., Bruce L. McNaughton, Matthew A. Wilson, et Carol A. Barnes. 1996. « Theta Phase Precession in Hippocampal Neuronal Populations and the Compression of Temporal Sequences ». Hippocampus 6(2):149‑72. doi: 10.1002/(SICI)1098-1063(1996)6:2<149::AID-HIPO6>3.0.CO;2-K.

Solstad, Trygve, Charlotte N. Boccara, Emilio Kropff, May-Britt Moser, et Edvard I. Moser. 2008. « Representation of Geometric Borders in the Entorhinal Cortex ». Science. doi: 10.1126/science.1166466.

Somogyi, Peter, et Thomas Klausberger. 2005. « Defined Types of Cortical Interneurone Structure Space and Spike Timing in the Hippocampus ». The Journal of Physiology 562(1):9‑26. doi: 10.1113/jphysiol.2004.078915.

Somogyi, Péter, M. G. Nunzi, A. Gorio, et A. D. Smith. 1983. « A New Type of Specific Interneuron in the Monkey Hippocampus Forming Synapses Exclusively with the Axon Initial Segments of Pyramidal Cells ». Brain Research 259(1):137‑42. doi: 10.1016/0006-8993(83)91076-4.

Stark, Eran, Lisa Roux, Ronny Eichler, Yuta Senzai, Sebastien Royer, et György Buzsáki. 2014. « Pyramidal Cell-Interneuron Interactions Underlie Hippocampal Ripple Oscillations ». Neuron 83(2):467‑80. doi: 10.1016/j.neuron.2014.06.023.

Stell, Brandon M., et Istvan Mody. 2002. « Receptors with Different Affinities Mediate Phasic and Tonic GABAA Conductances in Hippocampal Neurons ». Journal of Neuroscience 22(10):RC223‑RC223. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-10-j0003.2002.

Stödberg, Tommy, Amy McTague, Arnaud J. Ruiz, Hiromi Hirata, Juan Zhen, Philip Long, Irene Farabella, Esther Meyer, Atsuo Kawahara, Grace Vassallo, Stavros M.

Stivaros, Magnus K. Bjursell, Henrik Stranneheim, Stephanie Tigerschiöld, Bengt Persson, Iftikhar Bangash, Krishna Das, Deborah Hughes, Nicole Lesko, Joakim Lundeberg, Rod C. Scott, Annapurna Poduri, Ingrid E. Scheffer, Holly Smith, Paul Gissen, Stephanie Schorge, Maarten E. A. Reith, Maya Topf, Dimitri M. Kullmann, Robert J. Harvey, Anna Wedell, et Manju A. Kurian. 2015. « Mutations in SLC12A5 in Epilepsy of Infancy with Migrating Focal Seizures ». Nature Communications 6(1):8038. doi: 10.1038/ncomms9038.

van Strien, N. M., N. L. M. Cappaert, et M. P. Witter. 2009. « The Anatomy of Memory: An Interactive Overview of the Parahippocampal–Hippocampal Network ». Nature Reviews Neuroscience 10(4):272‑82. doi: 10.1038/nrn2614.

Sturman, Oliver, Lukas von Ziegler, Christa Schläppi, Furkan Akyol, Mattia Privitera, Daria Slominski, Christina Grimm, Laetitia Thieren, Valerio Zerbi, Benjamin Grewe, et Johannes Bohacek. 2020. « Deep Learning-Based Behavioral Analysis Reaches Human Accuracy and Is Capable of Outperforming Commercial Solutions ». Neuropsychopharmacology 45(11):1942‑52. doi: 10.1038/s41386-020-0776-y.

Supèr, Hans, et Eduardo Soriano. 1994. « The Organization of the Embronic and Early Postnatal Murine Hippocampus. II. Development of Entorhinal, Commissural, and Septal Connections Studied with the Lipophilic Tracer DiI ». Journal of Comparative Neurology 344(1):101‑20. doi: 10.1002/cne.903440108.

Szabadics, János, Gábor Tamás, et Ivan Soltesz. 2007. « Different Transmitter Transients Underlie Presynaptic Cell Type Specificity of $GABA_{A,slow}$ and $GABA_{A,fast}$ ». Proceedings of the National Academy of Sciences 104(37):14831‑36. doi: 10.1073/pnas.0707204104.

Tecott, Laurence H., et Eric J. Nestler. 2004. « Neurobehavioral Assessment in the Information Age ». Nature Neuroscience 7(5):462‑66. doi: 10.1038/nn1225.

Thakar, Sonal, Liqing Wang, Ting Yu, Mao Ye, Keisuke Onishi, John Scott, Jiaxuan Qi, Catarina Fernandes, Xuemei Han, John R. Yates, Darwin K. Berg, et Yimin Zou. 2017. « Evidence for Opposing Roles of Celsr3 and Vangl2 in Glutamatergic Synapse Formation ». Proceedings of the National Academy of Sciences 114(4):E610‑18. doi: 10.1073/pnas.1612062114.

Theodore, W. H., S. Bhatia, J. Hatta, S. Fazilat, C. DeCarli, S. Y. Bookheimer, et W. D. Gaillard. 1999. « Hippocampal Atrophy, Epilepsy Duration, and Febrile Seizures in Patients with Partial Seizures ». Neurology 52(1):132‑132. doi: 10.1212/WNL.52.1.132.

Thomson, Alex M., A. Peter Bannister, David I. Hughes, et Hannelore Pawelzik. 2000. « Differential Sensitivity to Zolpidem of IPSPs Activated by Morphologically Identified CA1 Interneurons in Slices of Rat Hippocampus ». European Journal of Neuroscience 12(2):425‑36. doi: 10.1046/j.1460-9568.2000.00915.x.

Töllner, Kathrin, Claudia Brandt, Thomas Erker, et Wolfgang Löscher. 2015. « Bumetanide Is Not Capable of Terminating Status Epilepticus but Enhances Phenobarbital Efficacy in Different Rat Models ». European Journal of Pharmacology 746:78‑88. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.10.056.

Töllner, Kathrin, Claudia Brandt, Kerstin Römermann, et Wolfgang Löscher. 2015. « The Organic Anion Transport Inhibitor Probenecid Increases Brain Concentrations of the NKCC1 Inhibitor Bumetanide ». European Journal of Pharmacology 746:167‑73. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.11.019.

Töllner, Kathrin, Claudia Brandt, Manuel Töpfer, Gerda Brunhofer, Thomas Erker, Mario Gabriel, Peter W. Feit, Jenna Lindfors, Kai Kaila, et Wolfgang Löscher. 2014. « A Novel Prodrug-Based Strategy to Increase Effects of Bumetanide in Epilepsy ». Annals of Neurology 75(4):550‑62. doi: 10.1002/ana.24124.

Tóth, Katalin, et Chris J. McBain. 1998. « Afferent-Specific Innervation of Two Distinct AMPA Receptor Subtypes on Single Hippocampal Interneurons ». Nature Neuroscience 1(7):572‑78. doi: 10.1038/2807.

Trantham-Davidson, Heather, Sven Kröner, et Jeremy K. Seamans. 2008. « Dopamine Modulation of Prefrontal Cortex Interneurons Occurs Independently of DARPP-32 ». Cerebral Cortex 18(4):951‑58. doi: 10.1093/cercor/bhm133.

Traub, Roger D., et Robert K. S. Wong. 1982. « Cellular Mechanism of Neuronal Synchronization in Epilepsy ». Science. doi: 10.1126/science.7079735.

Tricoire, Ludovic, Kenneth A. Pelkey, Michael I. Daw, Vitor H. Sousa, Goichi Miyoshi, Brian Jeffries, Bruno Cauli, Gord Fishell, et Chris J. McBain. 2010. « Common Origins of Hippocampal Ivy and Nitric Oxide Synthase Expressing Neurogliaform Cells ». Journal of Neuroscience 30(6):2165‑76. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5123-09.2010.

Tsubokawa, H., et W. N. Ross. 1996. « IPSPs modulate spike backpropagation and associated [Ca2+]i changes in the dendrites of hippocampal CA1 pyramidal neurons ». Journal of Neurophysiology 76(5):2896‑2906. doi: 10.1152/jn.1996.76.5.2896.

Tukker, John J., Pablo Fuentealba, Katja Hartwich, Peter Somogyi, et Thomas Klausberger. 2007. « Cell Type-Specific Tuning of Hippocampal Interneuron Firing during Gamma Oscillations In Vivo ». Journal of Neuroscience 27(31):8184‑89. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1685-07.2007.

Tyzio, Roman, Rosa Cossart, Ilgam Khalilov, Marat Minlebaev, Christian A. Hübner, Alfonso Represa, Yehezkel Ben-Ari, et Rustem Khazipov. 2006. « Maternal Oxytocin Triggers a Transient Inhibitory Switch in GABA Signaling in the Fetal Brain During Delivery ». Science. doi: 10.1126/science.1133212.

Tyzio, Roman, Marat Minlebaev, Sylvain Rheims, Anton Ivanov, Isabelle Jorquera, Gregory L. Holmes, Yuri Zilberter, Yehezkiel Ben-Ari, et Rustem Khazipov. 2008. « Postnatal Changes in Somatic γ-Aminobutyric Acid Signalling in the Rat Hippocampus ». European Journal of Neuroscience 27(10):2515‑28. doi: 10.1111/j.1460-9568.2008.06234.x.

Tyzio, Roman, Romain Nardou, Diana C. Ferrari, Timur Tsintsadze, Amene Shahrokhi, Sanaz Eftekhari, Ilgam Khalilov, Vera Tsintsadze, Corinne Brouchoud, Genevieve Chazal, Eric Lemonnier, Natalia Lozovaya, Nail Burnashev, et Yehezkel Ben-Ari. 2014. « Oxytocin-Mediated GABA Inhibition During Delivery Attenuates Autism Pathogenesis in Rodent Offspring ». Science 343(6171):675‑79. doi:

10.1126/science.1247190.

Uvarov, Pavel, Anastasia Ludwig, Marika Markkanen, Priit Pruunsild, Kai Kaila, Eric Delpire, Tônis Timmusk, Claudio Rivera, et Matti S. Airaksinen. 2007. « A Novel N-Terminal Isoform of the Neuron-Specific K-Cl Cotransporter KCC2 ». Journal of Biological Chemistry 282(42):30570‑76. doi: 10.1074/jbc.M705095200.*

Valeeva, Guzel, Thomas Tressard, Marat Mukhtarov, Agnes Baude, et Rustem Khazipov. 2016. « An Optogenetic Approach for Investigation of Excitatory and Inhibitory Network GABA Actions in Mice Expressing Channelrhodopsin-2 in GABAergic Neurons ». Journal of Neuroscience 36(22):5961‑73. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3482-15.2016.

Valeyev, A. Y., R. A. Cruciani, G. D. Lange, V. S. Smallwood, et J. L. Barker. 1993. « Cl− Channels Are Randomly Activated by Continuous GABA Secretion in Cultured Embryonic Rat Hippocampal Neurons ». Neuroscience Letters 155(2):199‑203. doi: 10.1016/0304-3940(93)90707-R.

Vibat, Cecile Rose T., Michael J. Holland, John J. Kang, Luanna K. Putney, et Martha E. O'Donnell. 2001. « Quantitation of Na+-K+-2Cl− Cotransport Splice Variants in Human Tissues Using Kinetic Polymerase Chain Reaction ». Analytical Biochemistry 298(2):218‑30. doi: 10.1006/abio.2001.5398.

Wang, Cong, Chigusa Shimizu-Okabe, Kazuo Watanabe, Akihito Okabe, Hideo Matsuzaki, Tsuguhiro Ogawa, Norio Mori, Atsuo Fukuda, et Kohji Sato. 2002. « Developmental Changes in KCC1, KCC2, and NKCC1 MRNA Expressions in the Rat Brain ». Developmental Brain Research 8.

Watanabe, Miho, Hiroaki Wake, Andrew J. Moorhouse, et Junichi Nabekura. 2009. « Clustering of Neuronal K+-Cl− Cotransporters in Lipid Rafts by Tyrosine Phosphorylation ». Journal of Biological Chemistry 284(41):27980‑88. doi: 10.1074/jbc.M109.043620.*

Wilson, Matthew A., et Bruce L. McNaughton. 1993. « Dynamics of the Hippocampal Ensemble Code for Space ». Science. doi: 10.1126/science.8351520.

Wiltschko, Alexander B., Matthew J. Johnson, Giuliano Iurilli, Ralph E. Peterson, Jesse M. Katon, Stan L. Pashkovski, Victoria E. Abraira, Ryan P. Adams, et Sandeep Robert Datta. 2015. « Mapping Sub-Second Structure in Mouse Behavior ». Neuron 88(6):1121‑35. doi: 10.1016/j.neuron.2015.11.031.

Witter, M. P. 1993. « Organization of the Entorhinal-Hippocampal System: A Review of Current Anatomical Data ». Hippocampus 3 Spec No:33‑44.

Witter, Menno P., Heidi Kleven, et Asgeir Kobro Flatmoen. 2017. « Comparative Contemplations on the Hippocampus ». Brain, Behavior and Evolution 90(1):15‑24. doi: 10.1159/000475703.

Witter, Menno P., Floris G. Wouterlood, Pieterke A. Naber, et Theo Van Haeften. 2000. « Anatomical Organization of the Parahippocampal-Hippocampal Network ». Annals of the New York Academy of Sciences 911(1):1‑24. doi: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb06716.x.

Wohlfarth, Kai M., Matt T. Bianchi, et Robert L. Macdonald. 2002. « Enhanced Neurosteroid Potentiation of Ternary GABAAReceptors Containing the δ Subunit ». Journal of Neuroscience 22(5):1541‑49. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-05-01541.2002.

Woo, Nam-Sik, Jianming Lu, Roger England, Robert McClellan, Samuel Dufour, David B. Mount, Ariel Y. Deutch, David M. Lovinger, et Eric Delpire. 2002. « Hyperexcitability and Epilepsy Associated with Disruption of the Mouse Neuronal-Specific K–Cl Cotransporter Gene ». Hippocampus 12(2):258‑68. doi: 10.1002/hipo.10014.

Yamada, Junko, Akihito Okabe, Hiroki Toyoda, Werner Kilb, Heiko J. Luhmann, et Atsuo Fukuda. 2004. « Cl− Uptake Promoting Depolarizing GABA Actions in Immature Rat Neocortical Neurones Is Mediated by NKCC1 ». The Journal of Physiology 557(3):829‑41. doi: 10.1113/jphysiol.2004.062471.

Yamasaki, Miwako, Minoru Matsui, et Masahiko Watanabe. 2010. « Preferential Localization of Muscarinic M1 Receptor on Dendritic Shaft and Spine of Cortical Pyramidal Cells and Its Anatomical Evidence for Volume Transmission ». Journal of Neuroscience 30(12):4408‑18. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5719-09.2010.

Ylinen, A., A. Bragin, Z. Nadasdy, G. Jando, I. Szabo, A. Sik, et G. Buzsaki. 1995. « Sharp Wave-Associated High-Frequency Oscillation (200 Hz) in the Intact Hippocampus: Network and Intracellular Mechanisms ». Journal of Neuroscience 15(1):30‑46. doi: 10.1523/JNEUROSCI.15-01-00030.1995.

Yuen, Natalie, Tina I. Lam, Breanna K. Wallace, Nicholas R. Klug, Steven E. Anderson, et Martha E. O'Donnell. 2014. « Ischemic factor-induced increases in cerebral microvascular endothelial cell Na/H exchange activity and abundance: evidence for involvement of ERK1/2 MAP kinase ». American Journal of Physiology-Cell Physiology 306(10):C931‑42. doi: 10.1152/ajpcell.00021.2013.

Yuste, Rafael, et Tobias Bonhoeffer. 2001. « Morphological Changes in Dendritic Spines Associated with Long-Term Synaptic Plasticity ». Annual Review of Neuroscience 24(1):1071‑89. doi: 10.1146/annurev.neuro.24.1.1071.

Yuste, Rafael, et Tobias Bonhoeffer. 2004. « Genesis of Dendritic Spines: Insights from Ultrastructural and Imaging Studies ». Nature Reviews Neuroscience 5(1):24‑34. doi: 10.1038/nrn1300.

Zallen, Jennifer A. 2007. « Planar Polarity and Tissue Morphogenesis ». Cell 129(6):1051‑63. doi: 10.1016/j.cell.2007.05.050.

Zhang, Huaqiu, H. James Cao, Harold K. Kimelberg, et Min Zhou. 2011. « Volume Regulated Anion Channel Currents of Rat Hippocampal Neurons and Their Contribution to Oxygen-and-Glucose Deprivation Induced Neuronal Death ». PLOS ONE 6(2):e16803. doi: 10.1371/journal.pone.0016803.

Zhang, Sheng-Jia, Jing Ye, Jonathan J. Couey, Menno Witter, Edvard I. Moser, et May-Britt Moser. 2014. « Functional connectivity of the entorhinal–hippocampal space circuit ». Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 369(1635):20120516. doi: 10.1098/rstb.2012.0516.

von Ziegler, Lukas, Oliver Sturman, et Johannes Bohacek. 2021. « Big Behavior: Challenges

and Opportunities in a New Era of Deep Behavior Profiling ». Neuropsychopharmacology 46(1):33‑44. doi: 10.1038/s41386-020-0751-7.

Zifarelli, G., et M. Pusch. 2007. « CLC Chloride Channels and Transporters: A Biophysical and Physiological Perspective ». P. 23‑76 in Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology, édité par S. G. Amara. Berlin, Heidelberg: Springer.