amU
Aix Marseille Université

NNT : 0000AIXM0000

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue à Aix-Marseille Université
le 20 mars 2025 par

Salomé MORTET

Caractérisation de l'activité des neurones GABAergiques immatures de CA1 et de leur effet sur le réseau néonatal in-vivo

Discipline
Sciences du vivant

Spécialité
Neurosciences

École doctorale
ED658 – Sciences du vivant

Laboratoire/Partenaires de recherche
Institut de Neurobiologie de la Méditerranée (INMED)

Composition du jury

Sabine LEVI Directrice de recherche – ESPCI	Rapporteuse
Desdemona FRICKER Directrice de recherche – INCC	Rapporteuse
Alessandra PIERANI Directrice de recherche – Institut Imagine	Examinatrice
Roustem KHAZIPOV Directeur de recherche – INMED	Examinateur
Christophe PORCHER Professeur des Universités – INMED	Président du jury
Pierre-Pascal LENCK-SANTINI Chargé de recherche – INMED	Directeur de thèse
Rosa COSSART Directrice de recherche – INMED	Invitée

Inmed
Institut de neurobiologie de la méditerranée

Inserm
La science pour la santé
From science to health

Affidavit

Je soussignée, Salomé MORTET, déclare par la présente que le travail présenté dans ce manuscrit est mon propre travail, réalisé sous la direction scientifique de Pierre-Pascal LENCK-SANTINI, 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 15 janvier 2025



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.

Inmed
Institut de neurobiologie de la méditerranée

Inserm
La science pour la santé
From science to health

Liste de publications et participation aux conférences

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

    1. Mortet, S. *et al.* (en préparation) “GABAergic neurons are major contributors of network inhibition in the neonatal hippocampus”

    2. Leprince, E. *et al.* (2023) “Extrinsic control of the early postnatal CA1 hippocampal circuits,” *Neuron*, 111(6), pp. 888-902.e8. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.12.013.

2) Participation aux conférences[2] et écoles d’été au cours de la période de thèse :
    1. Neurodays-2021 (présentation de poster)
    2. Neurobinars-2021 (présentation orale)
    3. FENS-2022 (présentation de poster)
    4. GDR-2022 et 2023 (présentation de poster)
    5. Fresh look on brain inhibition-2022 (présentation de poster)
    6. SfN-2023 (présentation de poster)

[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.

''Il ne faut pas penser à l'objectif à atteindre, il faut seulement penser à avancer. C'est ainsi, à force d'avancer, qu'on atteint ou qu'on double ses objectifs sans même s'en apercevoir.''

Bernard Werber

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'Institut de Neurobiologie de la Méditerranée dirigé par le Dr. Rosa Cossart. Je souhaite remercier l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Aux Dr. Sabine Levi et Desdemona Fricker, merci d'avoir accepté le rôle de rapporteur et de consacrer de votre temps pour l'évaluation de ce manuscrit. Aux Dr. Alessandra Pierani et Roustem Khazipov, merci de participer à l'examen de ce travail. Enfin, je souhaite remercier le Dr. Christophe Porcher d'avoir accepté de présider ce jury.

Tout d'abord, je tiens à remercier mon superviseur, Pierre-Pascal. Tout a commencé il y a 6 ans, quand tu as accepté que je fasse mon stage de master 2 avec toi, et me voilà aujourd'hui en train d'écrire les dernières lignes de ma thèse. Tu as été là à chaque étape, m'accompagnant et me guidant dans cette aventure, autant sur le plan scientifique qu'humain. Merci pour tout ce que tu m'as appris pendant toutes ces années, pour ton écoute, ton soutien, pour m'avoir aidée à grandir, et surtout, merci d'avoir cru en moi depuis le début. Je suis fière d'avoir accompli ce travail avec toi. Merci pour tout, Chef !

Je voudrais également remercier tous les membres de l'équipe qui ont été présents tout au long de ma thèse. Merci Rosa pour toutes les discussions qui ont grandement enrichi ce projet et pour ton aide dans la rédaction de l'article. Merci Agnès d'avoir accepté d'être ma directrice de thèse provisoire pendant les premières années. Merci Michel pour ta bonne humeur et tes conseils. Merci à tous ceux de l'équipe qui ont aidé à un moment ou à un autre. Merci à tous pour les discussions enrichissantes, les encouragements et les moments de complicité, que ce soit un vendredi matin autour de croissants et de pains au chocolat, dans une salle de manip ou encore sur un télésiège à Vars. C'était un plaisir de travailler et de partager ces moments avec vous. Je tiens également à remercier l'équipe de Jérôme (mon équipe « d'adoption ») pour m'avoir accueillie dans vos bureaux et pour les discussions scientifiques que nous avons partagées.

Je voudrais également remercier l'ensemble de l'institut : PIs, techniciens, doctorants, ingénieurs, post-doctorants et membres administratifs, pour votre aide précieuse et les échanges/conseils scientifiques que j'ai pu avoir avec certains. Un merci particulier à la plateforme PBMC pour les génotypages d'urgence, à François pour nous avoir prêté le laser, à Sophie pour nous avoir aidés à monter le setup, à Laurent pour m'avoir laissé une petite place à côté de ton poste d'électrophysiologie le temps des travaux, et à Robert pour ton aide lors des trois déménagements de mon poste de manip.

Bien entendu, je tiens à remercier mes amis du labo, qui ont été d'un grand soutien tout au long de ces années. Merci d'avoir été présents dans les bons moments comme dans les plus difficiles. Merci pour votre écoute, vos encouragements et tous ces moments passés ensemble lors d'une pause-café, d'un covoiturage le midi, de soirées pétanque, de pauses gâteaux au Nutella à 18 h ou encore lors de sessions running. Merci pour toute cette bonne humeur et ce regain d'énergie que vous m'avez apporté.

Je voudrais aussi remercier mes amis de longue date, qui ont toujours été là tout au long de cette aventure et m'ont soutenue depuis le début. Vous avez toujours été présents pour moi, que ce soit dans les meilleurs moments ou les plus difficiles.

Enfin, je voudrais remercier ma famille, à qui je dédie cette thèse. Merci de m'avoir soutenue dans cette aventure un peu folle et d'avoir toujours cru en moi. Vous m'avez toujours poussée à donner le meilleur de moi-même et vous m'avez portée (et supportée !) quand j'en avais le plus besoin. Merci pour votre amour, vos encouragements et, tout simplement, votre présence à mes côtés. Je vous aime.

Cette thèse est autant le fruit de mes efforts que le reflet des personnes extraordinaires qui m'ont entourée tout au long de ce chemin. À vous tous, je vous adresse mes remerciements les plus sincères.

RESUME

La mise en place appropriée des réseaux neuronaux pendant le développement est essentielle au bon fonctionnement du système nerveux à l'âge adulte. Durant les deux premières semaines de vie postnatales, les réseaux neuronaux immatures sont caractérisés par des activités spontanées néonatales (ASN) qui synchronisent une large population de neurones. Il est postulé que les ASN jouent un rôle important dans la mise en place des réseaux neuronaux et leurs fonctions ultérieures, mais les mécanismes sous-jacents sont encore mal connus.

In vitro, les ASNs sont générées au sein même des réseaux hippocampiques. Il est démontré que certains types d'interneurones GABAergiques jouent un rôle important dans la synchronisation du réseau lors de ces ASNs. In vivo, les ASNs (appelées "early sharp waves" (eSPWs)) ont une origine extra-hippocampique. Elles sont générées suite à des contractions myocloniques spontanées du nouveau-né qui induisent une activation du néocortex et se propagent jusqu'à l'hippocampe via le cortex entorhinal (Valeeva et al., 2019). Cependant, le rôle fonctionnel de l'activité GABAergique lors des ASNs in-vivo est encore mal connu. Notre objectif a donc été de caractériser l'implication des neurones GABAergiques lors des eSPWs in-vivo et de déterminer dans quelle mesure leur activité influence les réseaux hippocampiques immatures. Pour cela, nous avons mis en place un protocole d'enregistrement combinant électrophysiologie extracellulaire et optogénétique chez des souris néonatales transgéniques. Ceci nous a permis d'identifier (opto-tagging) et de manipuler l'activité des neurones GABAergiques tout en enregistrant la réponse de la population de CA1 aux eSPWs.

Nos résultats montrent que, durant la première semaine de vie postnatale, la majorité des neurones décharge fortement durant les eSPWs et reste silencieuse le reste du temps. De plus, il existe une hétérogénéité de réponses durant les différentes phases de eSPWs. Parmi les différents patrons d'activité nous avons observé la présence de neurones inhibés, et ce dès les premiers jours de vie (jour postnatal *P*3). La technique d'opto-tagging nous a permis de déterminer que les neurones GABAergiques déchargent à plus haute fréquence, participent à plus d'eSPWs et déchargent plus tôt par rapport aux eSPWs que le reste de la population. Enfin, pendant la première semaine postnatale, la stimulation lumineuse des neurones GABAergiques induit l'inhibition d'environ 20% de la population. Cette proportion augmente drastiquement au début de la deuxième semaine de vie, période pendant laquelle l'effet excitateur des eSPW diminue.

Ces résultats mettent en évidence un effet global inhibiteur de l'activité GABAergique dans l'hippocampe néonatal in-vivo, ce qui était controversé jusqu'ici. Ils confirment aussi la présence de connexions synaptiques GABAergiques fonctionnelles dès les premiers jours de vie. L'augmentation rapide de cette inhibition au début de la deuxième semaine postnatale refléterait l'état de maturation de la connectivité du réseau ainsi que celle des propriétés intrinsèques des neurones qui le composent. Elle permettrait au réseau hippocampique de passer d'une activité discontinue imposée par la périphérie à un fonctionnement asynchrone propice à l'émergence d'activités auto-générées nécessaires aux fonctions cognitives supérieures.

Mots clés : Hippocampe, néonatale, neurones GABAergiques, réseaux neuronaux

ABSTRACT

The appropriate setting up of neural networks during development is essential for the proper functioning of the nervous system in adulthood. During the first two weeks of postnatal life, immature neural networks are characterized by neonatal spontaneous activities (NSAs) that synchronize a large population of neurons. It is postulated that NSAs play an important role in the establishment of neural networks and their subsequent functions, but the underlying mechanisms are still poorly understood.

In vitro, NSAs are generated within hippocampal networks. It has been demonstrated that specific sub-types of GABAergic interneurons play an important role in network synchronization during NSAs. In vivo, NSAs (called "early sharp waves" -eSPWs) have an extra-hippocampal origin. They are generated following spontaneous myoclonic contractions of the newborn, which induce neocortical activations. These subsequently propagate to the hippocampus via the entorhinal cortex (Valeeva et al., 2019). However, the functional role of GABAergic activity during eSPWs in vivo is still poorly understood. Our objective was to characterize the involvement of GABAergic neurons during eSPWs in vivo and to determine the extent to which their activity influences immature hippocampal networks. To achieve this, we established a recording protocol combining extracellular electrophysiology and optogenetics in neonatal transgenic mice. This allowed us to identify (by opto-tagging) and manipulate the activity of GABAergic neurons while recording the response of the CA1 population to eSPWs.

Our results show that, during the first postnatal week, the majority of neurons fire strongly during eSPWs and remain virtually silent the rest of the time. Moreover, cellular responses during the different phases of eSPWs are heterogeneous. Among the different activity patterns observed during the first postnatal week, we noticed that some neurons were inhibited by eSPWs. (starting from postnatal day P3). GABAergic neurons, identified with opto-tagging, fired at higher frequency and participated in more eSPWs than the rest of the population. They also fired earlier relative to eSPW onset. Finally, during the first postnatal week, light stimulation of GABAergic neurons induced the inhibition of about 20% of the population. This proportion drastically increased at the beginning of the second week of life, a period during which the excitatory effect of eSPWs decreased.

These results highlight a global inhibitory effect of GABAergic activity in the neonatal hippocampus in vivo, which has been controversial until now. They also confirm the presence of functional GABAergic synaptic connections as early as the first days of life. The rapid increase in this inhibition at the beginning of the second postnatal week may reflect the maturation of CA1 network connectivity as well as of the intrinsic properties of its neurons. This increase may allow the hippocampal network to transition from a discontinuous activity mode imposed by the periphery to an asynchronous functioning that allows the emergence of self-generated activities necessary for higher cognitive functions.

Keywords : Hippocampus, neonatal, GABAergic neurons, neuronal networks

TABLE DES MATIERES

AFFIDAVIT **0**

LISTE DE PUBLICATIONS ET PARTICIPATION AUX CONFERENCES **1**

REMERCIEMENTS **3**

RESUME **4**

ABSTRACT **5**

LISTE DES FIGURES **9**

LISTE DES ABREVIATIONS **11**

AVANT-PROPOS **14**

PARTIE I - INTRODUCTION **16**

I ORGANISATION MORPHO-FONCTIONNELLE DES CIRCUITS NEURONAUX DANS LA REGION DE CA1 DE L'HIPPOCAMPE 17

A- Organisation générale de l'hippocampe de la région de CA1 ..... *18*

1) Description anatomique de l'hippocampe 18
2) Organisation laminaire de la région CA1 20
3) Les différents types de neurones de CA1 20
   a. Les neurones glutamatergiques 20
      i) Les neurones pyramidaux 20
      ii) Les Cajal-Retzius 22
   b. Les neurones GABAergiques 24
      i) Les neurones GABAergiques à innervation péri-somatique 24
      ii) Les neurones GABAergiques à innervation péri-axonique 26
      iii) Les neurones GABAergiques à innervation péri-dendrititque 26
      iv) Les neurones GABAergiques qui connectent d'autres neurones GABAergiques 27
      v) Les neurones GABAergiques à projection à longue distance 28

B- Organisation anatomique de la connectivité de la région de CA1 ..... *29*

1) Connexions entre les structures externes et la région de CA1 30
   a. Connexions directes : structures externes vers CA1 30
      i) Connexions septo-hippocampiques 30
      ii) Connexion THALAMO-HIPPOCAMPIQUES 32
      iii) Connexion cortex préfrontal médian -hippocampus 33
      iv) Voie commissurale : connexion inter-hippocampique 33
      v) Autres : Amygdale et hypothalamus 34
      vi) Autres : connexions monoaminergiques 34
   b. Connexions indirectes : structures externes vers le EC 35
      i) Anatomie du EC 36
      ii) Connectivité afférente et efférente du EC 36
2) Connexions entre les régions intra-hippocampiques 38
   a. Acheminement de l'information du EC vers la région de CA1 38
      i) La boucle tri-synaptique 38
      ii) La voie temporo-ammonique 40
      iii) La voie alvéaire 40
      iv) Autres connexions intra-formation hippocampique : connexion entre les régions de CA1, CA2 et CA3 41
   b. Restitution de l'information vers les structures externes 41
      i) Via les connexions : CA1 – Subiculum – EC 42
      ii) Autre voie de sortie : Cellules pyramidale CA1 vers fornix. 42
3) Les microcircuits de CA1 43
   a. Connectivité entre les neurones glutamatergiques et GABAergiques 43
   b. Connectivité des différents sous-types de neurones GABAergiques 43
   c. Les différents circuits 44

C- Organisation fonctionnelle de la région de CA1 ..... *29*

1) Les rythmes dans CA1 47
a. Rythme Thêta (θ) 47
b. Rythme Gamma (γ) 49
c. SharpWave Ripple 50
d. Rôle des neurones GABAergiques dans la modulation de l'activité neuronale lors des rythmes de CA1 50
2) Les patrons d'activité sous-jacent aux fonctions de l'hippocampe 52
a. Encodage de la représentation de l'espace 52
i) Les cellules de lieu 52
ii) Les rythmes hippocampiques et leur rôle dans le codage de l'espace 54
iii) Rôle des neurones GABAergiques dans les rythmes et la navigation spatiale 54
b. Processus de consolidation de l'information 55
3) Dysfonctionnement de l'hippocampe et pathologies associées 56
II DEVELOPPEMENT DES CIRCUITS NEURONAUX DE CA1 58
A- Développement anatomique de la région de CA1 59
1) Développement embryonnaire de la structure hippocampique 59
2) Genèse des neurones hippocampique 61
a. Neurogénèse et migration des neurones pyramidaux 61
b. Neurogénèse et migration des Cajal-Retzuis 63
c. Genèse des neurones GABAergiques 63
i) Neurogenèse des neurones GABAergiques 63
ii) Migration des neurones GABAergiques 66
3) Processus de mort cellulaire programmée 67
4) Développement de la transmission synaptique glutamatergique et GABAergique 68
a. Les récepteurs glutamatergiques et le glutamate 68
b. Les récepteurs GABAergiques et le GABA 70
i) Les récepteurs métabotropiques $GABA_B$ 70
ii) Les récepteurs ionotropiques $GABA_A$ 71
iii) Transition de l'effet dépolarisation à hyperpolarisant du GABA 71
B- Développement de la connectivité de CA1 73
1) Mise en place de la connectivité extra-hippocampique 73
a. Connexions entorhino-hippocampiques 74
b. Connexions thalamo-hippocampiques 75
c. Autres connexions extra-hippocampiques (septum, etc…) 75
2) Mise en place de la connectivité local de la région de CA1 76
C- Emergence de l'activité dans la région de CA1 78
1) Activités des réseaux immatures in-vitro 78
a. Activité spontanée non-corrélée 78
b. SPA - « Synchronous Plateau Assemblies » 80
c. ENOs – « Oscillations précoces du réseau » 81
d. GDP - « Giant Depolarizing Potentials » 81
2) Activités des réseaux immature in-vivo 84
a. eSPWs - « early Sharp Waves » 84
i) Origine extra-hippocampique des eSPWs 85
ii) Activité des neurones GABAergiques durant les eSPWs 87
b. Emergence des rythmes oscillatoires 89
i) Emergence des ''tails'' : précurseurs des oscillations Gamma 89
ii) Emergence des oscillations Thêta 90
iii) Emergence des SWP-R 90
D- Rôle de l'activité neuronale dans le développement des réseaux 91
1) Implication de l'activité neuronale dans la régulation des processus développementaux 92
2) L'importance de l'effet excitateur du GABA sur les processus développementaux 94
PROBLEMATIQUE 96

PARTIE II – MISE AU POINT DE METHODOLOGIES EXPERIMENTALES AUX STADES NEONATAUX 97

I PROCEDURES EXPERIMENTALES 101
A- Expression de l'opsine dans les neurones GABAergiques 101
1) Différentes méthodes d'expression de l'opsine via le système Cre-Lox 101
a. Croisements de lignées 103

b. Injection de vecteurs viraux chez des souris exprimant la Cre 103
i) Dans le ventricule de souriceau nouveau-né (P0) 104
ii) Dans le ventricule In-utéro à E15 104
2) Les différents types d'opsines et vecteurs viraux 105
B- Enregistrement de l'activité neuronale et photostimulation aux stades néonataux 108
1) Système d'enregistrement électrophysiologique extracellulaire in-vivo 108
a. Chirurgie à des stades postnataux 108
b. Composition du système d'électrophysiologie extracellulaire 109
c. Les différents types d'électrodes 109
i) Buzsaki32 (Neuronexus) 111
ii) Assy-77 P1 (Cambridge Neurotech) 111
iii) Les électrodes linéaires : Ai32 ou Edge (Neuronexus) 111
2) Système de photostimulation in-vivo 113
a. Les différentes sources lumineuses 113
b. Paramètres de stimulation lumineuse 114
3) Système d'induction de la photostimulation par détection des eSPWs 116
4) Acquisition d'image en post-enregistrement 117
II – PRE-TRAITEMENT DES DONNEES BRUTES 118
A- Analyse de l'activité unitaire des neurones de CA1 (SUA) 118
1) Principe du processus de ''Spike sorting'' 118
2) Programme de spike sorting : SpyKING CIRCUS 120
3) Déterminer si les neurones ont bougé durant l'enregistrement 123
B- Identification des neurones opto-taggués 123
C- Détection des eSPWs 127
D- Estimation de la localisation des neurones dans CA1 129
1) Localisation dans l'axe radial 129
a. Identification du site d'inversion à partir du signal 129
b. Estimation de la localisation du site d'inversion dans l'axe radial de CA1 129
c. Normalisation de la localisation dans l'axe radial 131
2) Localisation dans l'axe proximo-distal 131
III – ANALYSE DES DONNEES 133
A- Déterminer si les eSPWs ont un impact sur l'activité neuronale 133
1) Etude de la variation de la fréquence de décharge des neurones 133
2) Déterminer si les neurones augmentent leur fréquence de décharge de façon significative 134
3) Déterminer le pattern de décharge des neurones dans la composante Sharp et Tail des eSPWs 136
B- Déterminer si les stimulations lumineuses ont un impact sur l'activité neuronale 138

PARTIE III – RÉSULTATS 141

PARTIE IV - CONCLUSION ET DISCUSSION 174

I – LIMITATIONS TECHNIQUES 175
II – DISCUSSION ET PERSPECTIVES FUTURES 177
A- Activité inhibitrice lors des eSPWs dès les premiers jours postnataux 178
B- Inhibition GABAergique (et non inhibition) dans l'hippocampe immature 180
C- Activité GABAergique à l'origine d'une hétérogéinité d'activité lors des eSPW 182
D- Perspectives : conséquence de l'altération de l'activité neuronale aux stades néonataux 187
1) Altération de l'activité des neurones GABAergiques de CA1 durant les premières semaines postnatales 187
2) Dans le cas de troubles neurodéveloppementaux 188
3) L'activité des cellules de Cajal-Retzuis lors des eSPWs : un rôle majeur dans la maturation des réseaux ? 189
III – CONCLUSION 189

FIGURES ANNEXES 191

RÉFÉRENCES 196

LISTE DES FIGURES

PARTIE I – INTRODUCTION

FIGURE I.1 : Formation hippocampique et anatomie de l'hippocampe chez le rongeur.

FIGURE I.2 : Diversité des cellules pyramidales de CA1.

FIGURE I.3 : Les cajal-retzius de CA1.

FIGURE I.4 : Diversité des neurones GABAergiques de CA1.

FIGURE I.5 : Acheminement de l'information sensorielle d'origine extra-hippocampique vers la région de CA1.

FIGURE I.6 : Représentation schématique des afférences et efferences directes entre différentes structures corticales et sous-corticales avec la région de CA1.

FIGURE I.7 : Connectivité extra- et intra- hippocampique de la région de CA1

FIGURE I.8 : La connectivité afférente (directe) et efférente du cortex entorhinal avec la région de CA1 et le subiculum.

FIGURE I.9 : La connectivité générale de la formation hippocampique

FIGURE I.10 : Le microcircuit de la région de CA1

FIGURE I.11 : Computation des circuits GABAergiques

FIGURE I.12 : Les différents rythmes dans CA1

FIGURE I.13 : Modulation des neurones GABAergiques par les oscillations hippocampiques

FIGURE I.14 : Modes de traitement de l'information par les cellules de lieu.

FIGURE I.15 : Anatomie de la formation hippocampique en développement

FIGURE I.16 : Représentation schématique de la neurogenèse et de la migration des cellules pyramidales de CA1

FIGURE I.17 : Neurogenèse des neurones GABAergiques de CA1

FIGURE I.18 : Migration des neurones GABAergiques vers l'hippocampe et le cortex

FIGURE I.19 : Les récepteurs glutamatergiques et GABAergiques

FIGURE I.20 : Transition de l'effet du GABA dépolarisant à hyperpolarisant

FIGURE I.21 : Chronologie du développement de la connectivité anatomique dans la région de CA1.

FIGURE I.22 : La connectivité des Cajal-Retzius dans l'hippocampe en développement.

FIGURE I.23 : Développement de l'activité neuronale néonatale dans la région de CA1 in vitro

FIGURE I.24 : Contribution des neurones GABAergiques « hub » dans la modulation de l'activité neuronale in vitro.

FIGURE I.25 : Les activités spontanées néonatales in vivo - eSPWs.

FIGURE I.26 : L'activité neuronale durant les eSPWs et les Twitchs

FIGURE I.27 : Chronologie de l'émergence des rythmes oscillatoires dans la région de CA1.

FIGURE I.28 : Les principales étapes du développement des dynamiques internes de la région de CA1.

FIGURE I.29 : eprésentation schématique des mécanismes sous-jacents aux processus développementaux induits suite à la dépolarisation du neurone.

PARTIE II – MATERIELS ET METHODES

FIGURE II.1 : Identification physiologique des différents types cellulaires chez le rongeur adulte et néonatal

FIGURE II.2 : Principe de la technique de l'optogénétique et de l'opto-tagging

FIGURE II.3 : Principe du système de recombinaison Cre/Lox et méthode d'induction de l'opsine utilisée

FIGURE II.4 : Les différences entre l'opsine ChR2 et ChroME

FIGURE II.5 : Le set up d'enregistrement électrophysiologique extracellulaire couplé au système d'opto-stimulation

FIGURE II.6 : Les différents types d'électrodes utilisées

FIGURE II.7 : Comparaison entre des stimulations de type onde sinusoïdale et impulsion courte de type ''on/off''

FIGURE II.8 : Principe du système d'induction de la photostimulation par détection des eSPWs

FIGURE II.9 : Principe des enregistrements extracellulaires in-vivo

FIGURE II.10 : Principe du programme de spike sorting ''SpyKING CIRCUS''

FIGURE II.11 : Identification des neurones opto-taggués

FIGURE II.12 : Estimation du délai entre TTL et la libération la lumière par la fibre optique

FIGURE II.13 : Détection des eSPWs et des Twitchs

FIGURE II.14 : Identification du site d'inversion et sa localisation dans les couches de CA1.

FIGURE II.15 : Méthode d'estimation de la localisation des neurones en proximo-distal.

FIGURE II.16 : Augmentation de la fréquence de décharge des neurones durant les différentes composantes des eSPWs

FIGURE II.17 : Effet de la stimulation lumineuse sur l'activité neuronale de CA1

PARTIE IV – DISCUSSION ET CONCLUSION

FIGURE IV.1 : Données préliminaires de l'activation des neurones GABAergiques lors des eSPWs

FIGURE IV.2 : Evolution de la proportion de neurones excités ou inhibés pendant les différentes composantes des eSPWs

FIGURE IV.3 : Estimation de la localisation des neurones enregistrés dans la région de CA1

FIGURE IV.4 : Evolution des patrons d'activité lors des eSPWs et de l'émergence de l'inhibition GABAergique dans l'hippocampe immature.

FIGURES ANNEXES

FIGURE ANNEXE 1 : Activité des neurones GABAergiques durant eSPWs

FIGURE ANNEXE 2 : Activité des neurones durant les eSPWs en fonction de leur localisation dans l'axe radial de CA1

FIGURE ANNEXE 3 : Activité des neurones se trouvant dans le radiatum/SLM durant les eSPWs en fonction de leur localisation dans en proximo-distale

FIGURE ANNEXE 4 : Evolution de l'activité des neurones durant les eSPWs en fonction de leur localisation dans l'axe radial et en proximo-distale

FIGURE ANNEXE 5 : Activité des neurones inhibés par le GABA durant les eSPWs

LISTE DES ABREVIATIONS

alv	alveus
AMPA	α-amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazol-4-propionate
AAV	Adeno Associated Virus
BiCs	neurones bistratifiés (« Bistratified cells »)
BLA	Noyau basolatéral de l'amygdale (« basolateral nuclei of the amygdala »)
CA	Corne d'Ammon
CB	Calbindine
CCK	Cholecystokinine
CCKBCs	neurones en panier qui expriment la CCK (« CCK basket cells »)
CGE	Eminence ganglionnaire caudale (« caudal ganglionic eminence »)
ChR2	Channelrhodopsine
CNO	Clozapine N-oxide
CR	Calretinine
CRs	Cellules de Cajal-Retzius (« Cajal-Retzius cells »)
DREADD	Récepteurs de synthèse activés exclusivement par des drogues de synthèse (« Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs »)
EC	Cortex Entorhinal (« Entorhinal Cortex »)
ENO	oscillations neuronales précoces
eSPW	Ondes aiguës précoces (« early Sharp Waves »)
GABA	Acide γ-aminobutyrique (« γ-aminobutyric acid »)
GD	Gyrus Denté
GDPs	Potentiels Dépolarisants Géants (« Giant Depolarizing Potentials »)
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
IvCs	Neurones en forme de lierre (« Ivy cells »)
KCC2	Co-transporteur potassium-chlorure (« K-Cl transporter »)
LC	Locus coeruleus

LEC	Cortex Entorhinal Latéral (« Lateral Entorhinal Cortex »)
LGE	Eminence ganglionnaire latérale (« Lateral Ganglionic Eminence »)
LHA	Aire latérale de l'hypothalamus («lateral hypothalamic area »)
MEC	Cortex Entorhinal Médian (« Medial Entorhinal Cortex »)
MGE	Eminence Ganglionnaire Médiane (« medial ganglionic eminence »)
mGluR	Récepteur métabotropique au glutamate («metabotropic glutamate receptor »)
mPFC	Cortex préfrontal médian (« median prefrontal cortex »)
NGFs	Neurones en forme de glie (« Neurogliaform », NGFs)
NKCC1	Co-transporteur sodium-potassium-chlorure (« Na-K-Cl co-transporter »)
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
nNOS	Oxyde Nitrique Synthase neuronal (« neuronal Nitric Oxide Synthase »)
NPY	Neuropeptide Y
O-LM	Neurones Oriens-Lacunosum Moleculare
P	Postnatal
PAs	Potentiel d'action
PPAs	neurones associés à la voie perforante (« Perforant path-associated »)
pPyr	Couche profonde du sp
PV	Parvalbumine
PVBCs	neurones en panier qui expriment la PV (« PV basket cells »)
Re	Nucleus reuniens
RGC	Cellule de la glie radiaire (« radial glial cells »)
Rh	Nucleus rhomboïd
SPAs	Assemblées de plateaux synchrones (« Synchronous Plateau Assemblies »)
SCAs	Neurones associés aux collatérales de Schaffer (« Schaffer collateral-associated »)
sl	stratum lucidum
SLM	stratum lacunosum moleculare
sp	stratum pyramidale
sPyr	Couche superficielle du sp
so	stratum oriens
sr	stratum radiatum
SCE	événement calciques synchrones (« Synchronious Calcium events »)

SST	Somatostatine
ST	cible le soma (« somato-targetted »)
Sub	Subiculum
SWRs	Sharp Wave Ripples
VGluT	Transporteur vésiculaire du glutamate (« vesicular glutamate transporter »)
VIP	Polypeptide intestinal vasoactif (« vasoactive intestinal peptide »)
VMT	ligne ventro-médiane du Thalamus (« Ventro-Midline Thalamus »)
VTA	Aire tegmentale ventrale (« Ventral Tegmental Area »)
VZ	Zone ventriculaire (« ventricular zone »)
5HT3AR	Récepteurs à la sérotonine (5-hydroxytryptamine 3A)

AVANT-PROPOS

« La mémoire est l'armoire aux trésors de l'esprit. »

George Sand

La mémoire est un processus jouant un rôle essentiel dans notre quotidien. Tous les jours, au cours de notre vie, elle nous permet d'accomplir des tâches simples mais essentielles, comme trouver notre chemin jusqu'à notre domicile, reconnaître nos proches ou encore apprendre de nouvelles compétences. Sans elle, il nous serait impossible d'évoluer et d'interagir avec le monde qui nous entoure.

Cette capacité que nous avons de stocker des informations tout au long de notre vie repose sur une structure particulière de notre système nerveux : l'hippocampe. Cette structure corticale est connue pour être impliquée dans de nombreux processus cognitifs tels que la mémoire, l'apprentissage et la navigation spatiale. L'exemple le plus célèbre illustrant le lien entre structure et fonction est celui du patient H.M. (Henry Gustav Molaison), qui présentait une sévère amnésie antérograde à la suite d'une ablation chirurgicale bilatérale de la formation hippocampique afin de supprimer un foyer épileptogène (Scoville et Milner, 1957). À la suite de cette opération, le patient était dans l'incapacité de créer de nouveaux souvenirs.

Ces fonctions cognitives sont rendues possibles grâce à l'organisation morpho-fonctionnelle complexe de l'hippocampe, et notamment de la région CA1. En effet, ces processus dépendent essentiellement de la synchronisation de l'activité neuronale au sein des réseaux de cette région, sous-tendue par la connectivité complexe qui existe entre les neurones locaux, mais aussi avec les structures extra- et intra-hippocampiques.

Les réseaux neuronaux de CA1 commencent à se former dès les premiers stades du développement embryonnaire et continuent de maturer jusqu'à l'âge adulte. Pendant cette période, les réseaux se mettent en place à la fois sur le plan anatomique, c'est-à-dire du point de vue de la localisation des neurones et de l'organisation de leurs connexions, et fonctionnel, c'est-à-dire du point de vue du traitement de l'information réalisé par les neurones, les microcircuits ou les structures. Or, ces deux dimensions, anatomiques et fonctionnelles, sont étroitement liées et interdépendantes. D'une part, les activités neuronales néonatales jouent un rôle essentiel dans les processus développementaux responsables de la construction des structures cérébrales. D'autre part, la maturation anatomique des réseaux sous-tend la fonctionnalité de ces structures, que ce soit lors du développement mais aussi plus tard chez l'adulte. Cependant, les mécanismes sous-jacents sont encore mal connus.

Chez le rongeur, les deux premières semaines de vie correspondent au dernier trimestre de gestation chez l'homme. Durant cette période, l'activité immature corticale observée chez le rongeur est très similaire à l'activité électrophysiologique en LFP ou EEG enregistrée chez les enfants prématurés (Dreyfus-Brisac et Larroche, 1971). Durant la période postnatale, les réseaux neuronaux immatures sont caractérisés par des activités spontanées néonatales qui synchronisent une large population de neurones. Dans l'hippocampe in-vitro, celles-ci prennent la forme de potentiels géants dépolarisants ''Giant Depolarizing Potentials'' (GDPs). Ces GDPs émergent au sein de l'hippocampe et il est établi que les neurones GABAergiques jouent un rôle primordial dans la synchronisation, l'initiation et l'arrêt des GDPs. In vivo, les activités immatures spontanées qui sont observées ont une origine extra-hippocampique. Elles prennent la forme de pointes dans le LFP de CA1 et sont appelées ''*early sharp waves*'' (eSPWs). Les eSPWs sont générées à la suite de contractions myocloniques spontanées du nouveau-né qui induisent une activation du néocortex qui se propagent jusqu'à l'hippocampe via le cortex entorhinal (Valeeva et al., 2019). Cependant, si le rôle des neurones GABAergiques

est clairement établi dans la synchronisation des neurones hippocampiques lors des activités spontanées in vitro, la contribution de ces neurones dans la régulation de l'activité au sein des circuits en développement in vivo reste encore inconnue.

En parallèle, de nombreuses études suggèrent que l'effet dépolarisant de l'activité GABAergique à ces stades immatures jouerait un rôle essentiel dans la construction et la maturation des réseaux. Compte tenu de ce rôle fondamental, il n'est pas surprenant qu'une transmission GABAergique défectueuse soit impliquée dans un large éventail de troubles neuronaux tels que l'épilepsie ou les troubles du spectre autistique. Comprendre comment les neurones GABAergiques contribuent aux activités néonatales est donc essentiel pour comprendre davantage leur influence sur les processus de maturation. Cependant, l'effet dépolarisant du GABA à ces stades immatures est un sujet très controversé, notamment dans des conditions in vivo. Par conséquent, l'impact de ces neurones sur l'activité des réseaux durant les deux premières semaines de vie est encore mal compris.

Les travaux que j'ai effectués dans le cadre de ma thèse ont donc pour but de caractériser l'implication des neurones GABAergiques lors des eSPWs in vivo et de déterminer dans quelle mesure leur activité influence les réseaux hippocampiques immatures. Cependant, il m'a fallu, au préalable, mettre en place un protocole permettant de combiner des enregistrements électrophysiologiques extracellulaires in vivo avec la technique d'optogénétique sur des souris néonatales, ce qui n'avait encore jamais été réalisé. Le développement de cette procédure combinant ces deux techniques a occupé une grande partie de ma thèse. En effet, adapter et réaliser ces techniques à des stades précoces du développement représente un défi considérable qui est rendu encore plus complexe par leur couplage.

Ce manuscrit sera divisé en quatre parties principales. Dans la première partie, dédiée à l'introduction, je décrirai l'organisation morpho-fonctionnelle de la région CA1 chez le rongeur adulte ainsi que les étapes développementales nécessaires à la mise en place de réseaux fonctionnels. L'état des connaissances sur les activités néonatales in vivo de CA1 ainsi que la contribution de l'activité GABAergique dans la dynamique des réseaux immatures et les processus développementaux seront présentés de sorte à contextualiser la problématique de ma thèse. La deuxième partie de ce manuscrit sera consacrée au développement des méthodologies expérimentales. J'y détaillerai les différentes techniques et approches que nous avons mises au point. La troisième section portera sur une partie des résultats obtenus durant ma thèse. Ceux-ci sont présentés sous la forme d'un article en anglais qui sera prochainement soumis à publication et dont je suis première auteure. Enfin, la dernière partie consistera en une discussion générale dans laquelle la méthode que j'ai mise au point ainsi que les résultats obtenus seront évalués au regard du contexte scientifique actuel.

PARTIE I

INTRODUCTION

‘‘Si j’ai vu plus loin, c’est en montant sur les épaules de géants."

Isaac Newton

I Organisation morpho-fonctionnelle des circuits neuronaux dans la région de CA1 de l'hippocampe

L'hippocampe est une structure impliquée dans les processus de mémorisation, d'apprentissage et de navigation spatiale. Ces fonctions sont rendues possibles grâce à l'organisation morpho-fonctionnelle complexe de cette structure. C'est d'autant plus vrai pour la région de CA1 de l'hippocampe qui reçoit et intègre des informations en provenance de plusieurs régions. Ce rôle central dans l'intégration et le traitement de l'information fait de CA1 une région importante pour les processus de mémoire et d'apprentissage, notamment en ce qui concerne la mémoire épisodique, pour laquelle les informations spatiales sont primordiales. L'existence d'un lien très étroit entre l'organisation fonctionnelle de cette structure et l'organisation anatomique de ses circuits fait de CA1 un objet d'étude privilégié pour comprendre l'émergence de fonctions cognitives complexes telles que l'intégration d'informations en mémoire épisodique.

Dans ce premier chapitre, nous allons voir comment et pourquoi l'organisation anatomique des circuits de CA1 permet de soutenir ces fonctions cognitives. Tout d'abord, nous verrons comment l'hippocampe, et plus précisément la région de CA1, s'organise sur le plan anatomique ainsi que les différents types cellulaires qui la composent. Nous étudierons ensuite l'organisation locale des microcircuits de CA1 ainsi que les afférences synaptiques qu'il reçoit en provenance d'autres régions intra- et extra- hippocampiques. Enfin, nous verrons pourquoi cette connectivité est cruciale pour l'organisation temporelle de l'activité neuronale et comment cela sous-tend les multiples fonctions cognitives associées à l'hippocampe.

« La structure d'un circuit sous-tend sa fonction. »

A- ORGANISATION GENERALE DE L'HIPPOCAMPE DE LA REGION DE CA1

Du point de vue phylogénétique, l'hippocampe est la partie la plus ancienne du télencéphale, après le système olfactif. Constituant originellement le pallium médian chez les premiers vertébrés, il s'est ensuite invaginé et retourné sur lui-même pour se trouver sous le néocortex. Il s'agit donc d'une structure préservée au cours de l'évolution, ce qui suggère qu'elle joue un rôle important pour la survie des individus. Nous le verrons, l'hippocampe est une structure cérébrale complexe dans bien des domaines, notamment concernant son organisation anatomique.

Dans cette partie, nous allons voir que l'hippocampe fait partie d'un complexe composé de plusieurs structures fortement interconnectées, appelé la formation hippocampique. Parmi ces structures se trouve la Corne d'Ammon, qui est subdivisée en différentes régions (CA1, CA2 et CA3) qui, nous le verrons, adoptent une organisation laminaire dans laquelle sont répartis différents types et sous-types cellulaires.

1) Description anatomique de l'hippocampe

La formation hippocampique appartient au système limbique présent chez tous les mammifères. Chez les primates, dont l'humain, cette structure bilatérale se situe au niveau du lobe temporal médian sous le cortex cérébral à la base de la corne inférieure du ventricule latéral de chaque hémisphère. Les deux hippocampes sont reliés par des fibres commissurales localisées dans le fornix, sous le corps calleux (Andersen et al., 2006). La formation hippocampique est composée du Gyrus Denté (GD), de la Corne d'Ammon (CA), du subiculum, présubiculum, parasubiculum et du Cortex Entorhinal (« Entorhinal Cortex », EC ; Witter, 2012, Andersen et al., 2006) (**Figure I.1A et B**). Ces différentes régions sont reliées les unes aux autres par des voies neuronales fonctionnelles et unidirectionnelles. Cependant le terme « hippocampe » fait plus souvent référence à la Corne d'Ammon et au Gyrus Denté.

Décrit pour la première fois en 1587 par l'anatomiste et chirurgien Giulio Cesare Aranzio, cette structure prend le nom d'« hippocampe » (du grec hippokampos [hippos : cheval ; kampus : monstre de mer]) en raison de sa ressemblance avec l'animal marin portant le même nom (d'après Aranzio, 1587, repris et adapté dans Bir et al., 2015 et Engelhardt, 2016). Chez les rongeurs, l'hippocampe s'étend le long de l'axe septo-temporal (Amaral and Witter, 1989). La partie septale correspond à la portion dorso-rostrale de l'hippocampe (appelée hippocampe dorsal) tandis que la partie temporale désigne la portion ventro-caudale (hippocampe ventral) (**Figure I.1C**). Ces deux parties de l'hippocampe possèdent des différences sur le plan génétique, anatomique et comportemental (Fanselow and Dong, 2010).

Dès le début du XXème siècle, le neuroanatomiste espagnol et Prix Nobel, Santiago Ramón y Cajal, observe deux régions distinctes basées sur une différence de taille des cellules au sein de la Corne d'Ammon. Son ancien étudiant Lorente de Nó, en 1934, fut le premier à diviser la Corne d'Ammon en trois régions : CA1, CA2 et CA3. En s'appuyant sur les travaux de son prédécesseur, il établit que la région de CA1 est l'équivalent de la *regio superior* (composée de petites cellules) décrite par Ramón y Cajal quelques années auparavant et que les régions CA2 et CA3 correspondent à la *regio inferior* (composée de larges cellules) (Ramón y Cajal, 1911 ; Lorente de Nó, 1934). Ces régions suivent une organisation cytoarchitectonique3 laminaire.

[3] *Désigne la composition cellulaire d'un tissu biologique. C'est l'étude de la répartition, le nombre et la distribution spatiale des différents types cellulaires qui composent un tissu ou un organe donné.*

Dans la prochaine partie de ce manuscrit, nous allons décrire cette organisation laminaire en nous focalisant principalement sur la région de CA1 à cause de son rôle central dans l'intégration et le traitement de l'information au sein de la formation hippocampique nous incitant à étudier le développement de cette région dans le cadre de ma thèse.

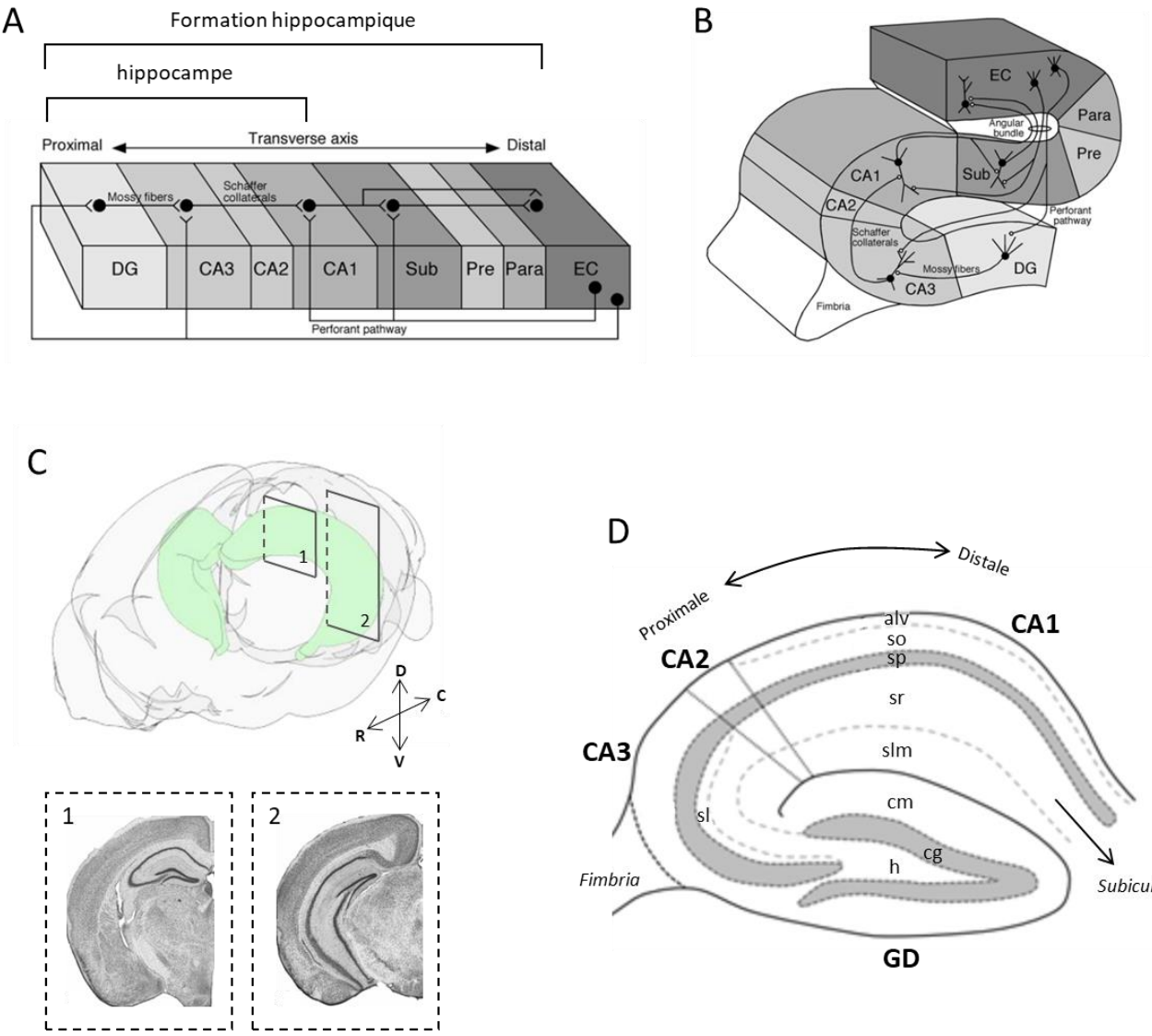


Figure I.1 : Formation hippocampique et anatomie de l'hippocampe chez le rongeur.

A. Représentation schématique de la formation hippocampique et (**B**) des connexions entre les différentes structures intra-hippocampique. **C.** Représentation schématique de l'hippocampe (en vert) dans le cerveau de rongeur (Claudi et al., 2020). (1) Marquage au crésyl violet sur une coupe coronales d'hippocampe dorsale et ventrale (2) de rongeur. **D.** Schéma représentant les différentes couches des régions CA1, CA2, CA3 et du Gyrus Dente (GD). *R : rostrale (partie antérieure) ; C : caudale (partie postérieure) ; D : dorsal ; V : ventral ; EC : cortex enthorinal ; Para : parasubiculum ; Pre : presubiculum ; Sub : subiculum ; alv : alveus ; so : stratum oriens ; sp : stratum pyramidale ; sr : stratum radiatum ; slm : stratum lacunosum moleculare ; sl : stratum lucidum; cm : couche moléculaire; cg : couche granulaire ; h : Hile.*

2) Organisation laminaire de la région CA1

Comme pour le cortex cérébral, les trois régions de la Corne d'Ammon adoptent une organisation laminaire. Du fait de leur évolution, elles ont une orientation inversée par rapport au néocortex. Les couches profondes se trouvent proches du corps calleux, tandis que les couches superficielles sont placées loin de la surface du crâne. La région CA1 est organisée en 5 couches (ou stratum) présentant des différences quant à leur composition en types et sous-types cellulaires ainsi qu'au niveau des afférences qui s'y projettent.

La couche la plus profonde de CA1 est l'alveus (alv) qui contient les axones des cellules pyramidales dirigées vers la fimbria ou le subiculum. Sous l'alveus, se trouve le stratum oriens (so) qui contient les axones et les dendrites basales des cellules pyramidales. Ensuite, on trouve la principale couche cellulaire de l'hippocampe, appelée la couche pyramidale ou stratum pyramidale (sp), contenant la majorité des corps cellulaires de CA1, principalement composés de neurones pyramidaux. Le stratum radiatum (sr), se trouvant sous le stratum pyramidale, contient la partie proximale des dendrites apicales des neurones pyramidaux tandis que la couche la plus superficielle de l'hippocampe, appelée stratum lacunosum moleculare (SLM), contient la partie distale des dendrites apicales (**Figure I.1D**). La région CA3, quant à elle, possède une couche supplémentaire, la stratum lucidum (sl), qui se situe entre le sp et le sr. Pour ce qui est du Gyrus Denté, ce dernier possède trois couches distinctes : la couche moléculaire (relativement pauvre en corps cellulaires), la couche granulaire (contenant les somas des cellules en grains) et le hile (Andersen et al., 2006). L'organisation laminaire des différentes régions de l'hippocampe reste la même tout le long de l'axe dorso-ventral (ou rostro-codal).

Les différents types et sous-types cellulaires qui composent la région de CA1 sont répartis de façon hétérogène dans ces différentes couches comme nous allons le voir dans la partie suivante.

3) Les différents types de neurones de CA1

L'hippocampe est composé principalement de deux types de neurones : les neurones excitateurs glutamatergiques, qui représentent la grande majorité des cellules neuronales, et des neurones inhibiteurs GABAergiques, qui correspondent à entre 10 et 15 % de la population neuronale hippocampique (Pelkey et al., 2017).

a. Les neurones glutamatergiques

Les neurones glutamatergiques correspondent aux neurones excitateurs qui utilisent principalement le glutamate comme neurotransmetteur. Dans la région de CA1, on retrouve deux types de neurones glutamatergiques : (i) les neurones pyramidaux et (ii) les Cajal-retzius.

i) Les neurones pyramidaux

Les neurones pyramidaux sont les principaux neurones glutamatergiques de l'hippocampe et du cortex puisqu'ils représentent entre 80 et 90% de la population neuronale.

Ces neurones ont été considérés jusqu'à très récemment comme une population assez homogène (Ishizuka et al., 1995; Pyapali et al., 1998; Andersen et al., 2006), bien qu'en 1934 Lorente de No mentionnait déjà l'existence d'une diversité des neurones pyramidaux au sein d'une même couche en se basant sur leur

distribution spatiale et leur connectivité avec les neurones en panier (Slomianka et al., 2011). Au cours de ces dernières décennies, de nombreuses études ont fait renaître ces observations en mettant en évidence l'existence de plusieurs sous-groupes de neurones pyramidaux aux propriétés moléculaires, morphologiques et fonctionnelles différentes (Deguchi et al., 2011; Mizuseki et al., 2011 ; Fanselow and Dong, 2010 ; Slomianka et al., 2011; Soltesz and Losonczy, 2018; Valero and de la Prida, 2018; Cembrowski and Spruston, 2019).

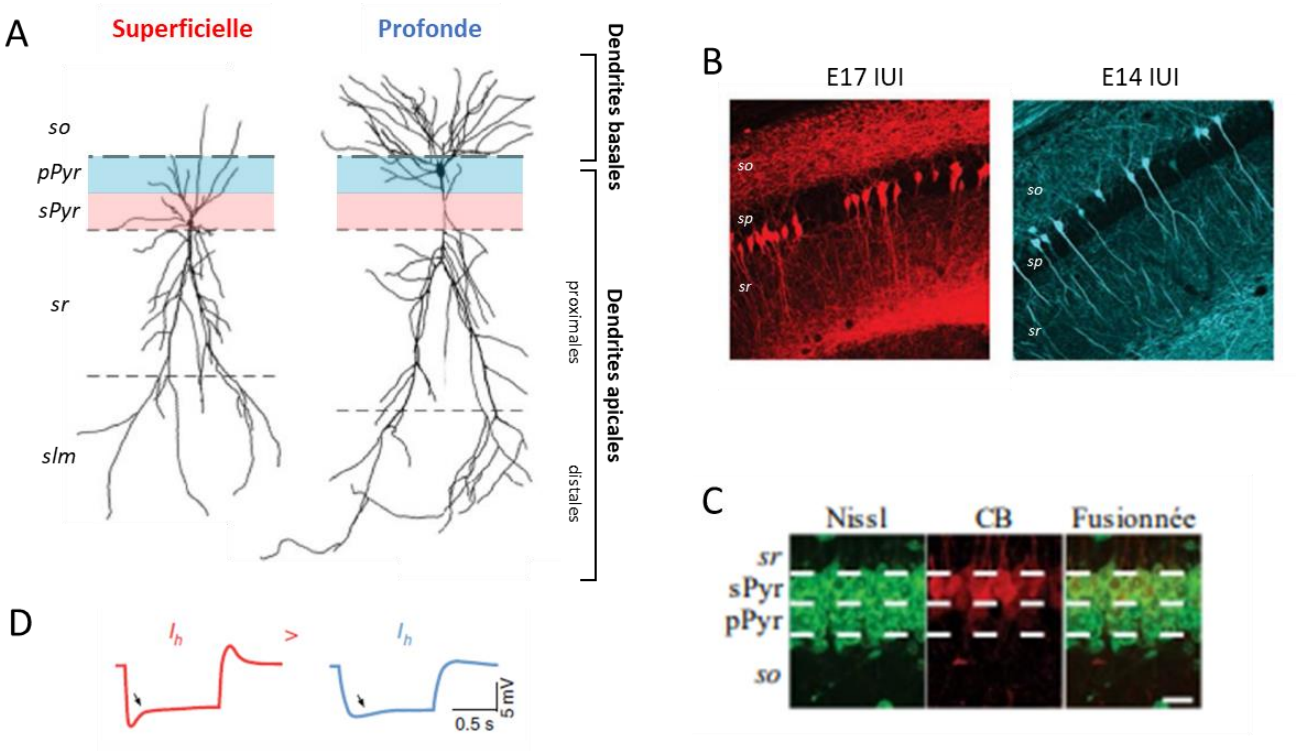


Figure I.2 : Diversité des cellules pyramidales de CA1.

A. Reconstruction de l'arborisation dendritique de neurones pyramidaux superficiels et profonds de CA1. Les neurones de la couche superficielle présentent principalement des dendrites apicales ramifiées (morphologie "complexe") alors que ceux des couches profondes ont une arborisation dite "simple". **B.** Les cellules pyramidales superficielles et profondes de la région CA1 sont générées à des moments différents au cours de la neurogenèse embryonnaire. Des injections intraventriculaires in utero (IUI) d'un adénovirus exprimant la protéine tdTomato, réalisées au 14e jour embryonnaire (E14, en cyan) et au 17e jour embryonnaire (E17, en rouge), marquent respectivement les cellules pyramidales profondes et superficielles. Les cellules pyramidales de la couche superficielle densément peuplée de la région CA1 émergent en moyenne 2 à 3 jours après celles de la couche profonde. **C.** Différences moléculaires en fonction de la localisation radiale des cellules pyramidales. Les neurones de la couche superficielle expriment plus fortement la calbindine (CB) que les neurones de la couche profonde de CA1. La coloration de Nissl marque ici les cellules de la couche pyramidale. **D.** Différence électrophysiologique entre les cellules superficielles et profondes. Lors de l'injection d'un courant hyperpolarisant, les cellules superficielles présentent un « sag », médié par Ih, plus prononcé (flèches). *so : stratum oriens ; sp : stratum pyramidale ; sPyr : superficielle ; pPyr : profonde ; sr : stratum radiatum ; slm : stratum lacunosum moleculare. Adapté de Valero et al., 2015 et de Soltesz et Losonczy, 2018.*

Dans la région de CA1, ces sous-groupes s'organisent dans l'hippocampe selon l'axe radial. Le soma des cellules pyramidales dites « profondes » est situé dans le stratum pyramidale dans la partie à proximité du stratum oriens, et celui des cellules « superficielles » est situé dans la partie proche du stratum radiatum (**Figure I.2A et B**). Ces deux sous-groupes projettent leur axone vers le subiculum et les couches profondes du EC faisant de ces cellules la principale sortie de l'hippocampe. En ce qui concerne les dendrites de ces neurones, les cellules pyramidales profondes et superficielles adoptent une arborisation s'étendant tout le long de l'axe radial allant vers le stratum oriens, pour les dendrites basales, et vers le stratum radiatum et la lacunosum moleculare pour

les dendrites apicales. Cependant, les neurones pyramidaux profonds ont des dendrites basales plus développées dans le stratum oriens (Lee et al., 2014), tandis que les neurones superficiels présentent une arborisation dendritique apicale plus développée dans le stratum radiatum (Bannister et Larkman, 1995 ; Li et al., 2017) (**Figure I.2A**). Ainsi les dendrites de ces cellules recouvrent l'ensemble des couches de CA1 leur permettant ainsi de recevoir diverses entrées synaptiques d'origine locale ou venant d'autres structures. Cette connectivité sera détaillée plus loin dans le manuscrit.

De plus, des études transcriptomiques des cellules pyramidales de CA1 ont montré que les différents sous-groupes de cellules pyramidales possèdent un profil d'expression génique différent (Cembrowski et al., 2016; Deguchi et al., 2011). En effet, les neurones situés dans la couche superficielle du stratum pyramidale expriment la calbindine (CB, protéine liant le calcium) et l'ion zinc (Baimbridge et al., 1991 ; Slomianka, 1992) contrairement aux neurones de la couche profonde qui ne les expriment pas (**Figure I.2C**). Concernant les propriétés électrophysiologiques de ces sous-groupes, ceux de la couche profonde ont un potentiel de repos et un courant h (Ih) plus négatif que les neurones pyramidaux de la couche superficielle qui, quant à eux, sont plus excitables (**Figure I.2D**) (Jarsky et al., 2008; Lee et al., 2014 ; Soltesz and Losonczy, 2018). Nous verrons plus loin dans ce manuscrit que les cellules pyramidales superficielles et profondes sont générées à des moments différents au cours de la neurogenèse embryonnaire et qu'il existe des différences fonctionnelles entre ces deux sous-groupes de par les diverses connexions établies avec les neurones locaux et avec les autres structures faisant qu'ils sont impliqués dans différents processus cognitifs.

ii) Les Cajal-Retzius

Dans l'hippocampe et le néocortex, il existe de rares cellules glutamatergiques non-pyramidales appelées Cajal-Retzius (CRs). Ces cellules sont très peu présentes chez les animaux à l'âge adulte puisqu'elles disparaissent presque complètement pendant les premières semaines postnatales une fois la migration neuronale terminée. En effet, on estime que, dans le néocortex, plus de 95 % des cellules CRs meurent à la suite de mécanismes de mort cellulaire pendant le développement (**Figure I.3A**) (del Rio et al., 1996; Super et al., 1998 ; Chowdhury et al., 2010). Cependant, si les CRs ont presque totalement disparu dans le néocortex adulte ce n'est pas le cas dans l'hippocampe où une plus grande proportion de ces cellules persiste à l'âge adulte (del Río et al., 1996 ; Anstötz et al., 2018). Dans l'hippocampe, les CRs se trouvent dans la partie superficielle du stratum lacunosum-moleculare (SLM) et dans la partie externe de la couche moléculaire dentée (OML) du gyrus dente proche de la fissure hippocampique (**Figure I.3B**) (Del Rio 1996). Morphologiquement, les CRs se distinguent par leur soma de petite taille et allongé, ainsi que par l'organisation bipolaire de leurs neurites, avec une dendrite principale et un axone qui se trouvent de part et d'autre du soma et qui s'étendent dans des directions opposées (**Figure I.3C**) (Anstotz et maccafféri 2018).

Dans l'hippocampe immature, des données électrophysiologiques montrent que les CRs sont intégrées dans les réseaux locaux. La connectivité de ces cellules sera détaillé plus loin dans le manuscrit mais brièvement elles reçoivent principalement des afférences synaptiques GABAergiques provenant d'interneurones de CA1 (Marchionni et al., 2010; Quattrocolo and Maccaferri, 2013; Anstötz and Maccaferri, 2020). En fonction du potentiel membranaire des CRs et de la cinétique de l'entrée GABAergique reçue, les entrées synaptiques GABAergiques évoquées sur les CRs peuvent avoir des effets différents puisqu'ils peuvent soit augmenter leur excitabilité et déclencher des potentiels d'action, soit inhiber leur décharge spontanée par bloc de dépolarisation (Quattrocolo and Maccaferri, 2013). Cependant il est important de noter que ces observations ont été faites in-vitro, par conséquent, il est difficile de prédire un effet simple et unique de l'entrée synaptique GABAergique sur les CRs in vivo d'autant plus que des études récentes suggèrent que l'excitation GABAergique observée dans les préparations réduites in vitro pourrait ne pas se traduire par une excitation similaire in vivo

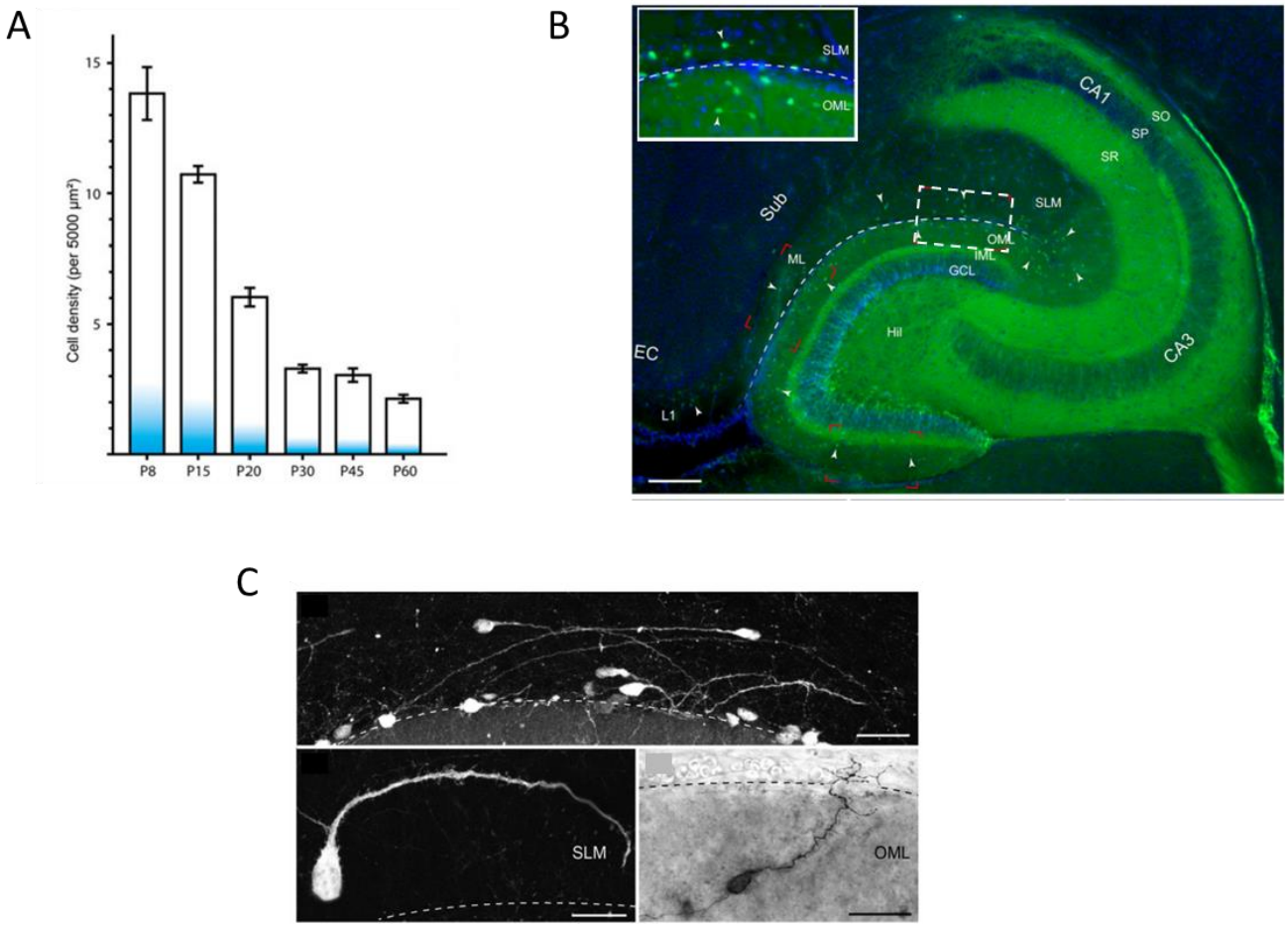


Figure I.3 : Les cajal-retzius de CA1.

A. Histogrammes montrant l'évolution temporelle de la diminution de la densité des cellules CR le long de la fissure hippocampique. **B.** Distribution des cellules CR dans la formation hippocampique. Image faite au microscope à fluorescence montrant la distribution des cellules CR exprimant EGFP dans une tranche horizontale de cerveau d'un hippocampe de souris P18 (en bleu : coloration au DAPI). Les cellules CR EGFP-positives sont réparties sur l'ensemble de l'OML et du SLM, comme l'indiquent les flèches blanches. La fissure hippocampique est marquée par la ligne pointillée. La zone délimitée par le rectangle blanc est montrée à un grossissement plus élevé dans l'encadré en haut à gauche. Échelle : 200 µm et 100 µm. **C.** Morphologie dendritique des cellules CR hippocampiques. (en haut) image en microscopie à fluorescence montrant la densité et le motif de distribution des cellules CR-EGFP à proximité de la fissure hippocampique (HF), comme indiqué par la ligne pointillée. Les dendrites principales des cellules CR sont principalement orientées vers la fissure hippocampique, quelle que soit l'orientation somatique. Échelle : 50 µm. (En bas) Hétérogénéité de l'arborisation dendritique des cellules CR, malgré leur morphologie bipolaire caractéristique, avec une dendrite principale émergeant d'un pôle du soma et des axones de l'autre pôle. Échelle : 25 µm. *so : stratum oriens ; sp : stratum pyramidale ; sr : stratum radiatum ; slm : stratum lacunosum moleculare ; oml : couche moléculaire externe ; IML : couche moléculaire interne ; GCL : couche des cellules granulaires ; Hil : hile ; Sub : complexe subiculaire ; EC : cortex entorhinal ; L1 : couche 1. Adapté de Anstotz et al. 2016 ; Maccaferri et al. 2013.*

(Anstotz 2018 ; Kirmse et all., 2015 ; Valeeva et al., 2016). La connectivité efférente des CRs reste aussi très locale puisqu'elles forment des connexions excitatrices sur les neurones GABAergiques et les dendrites des cellules pyramidales de CA1 présente dans la SLM en activant les récepteurs postsynaptiques du glutamate de type AMPA et NMDA (Quattrocolo and Maccaferri, 2013, 2014).

Sur le plan moléculaire, les CRs expriment de nombreuses molécules, telles que la calrétinine la protéine tumorale p73, plusieurs facteurs de transcription tels que COUP-TFII ou Tbr1 mais aussi la Reelin. Cette dernière est une glycoprotéine connue pour être essentielle pour la maturation et la formation correcte des circuits néocorticaux et hippocampiques (Meyer et al., 2002; Hevner et al., 2003; Anstötz and Maccaferri, 2020 ;

Arcangelo et al., 2016 ; Soriano et Del Río, 2005). En sécrétant la reelin, les CRs orchestrent le développement des circuits corticaux. Ainsi, dans l'hippocampe immature, les cajal-retzuis sont intégrées dans les circuits neuronaux locaux et jouent un rôle majeur dans la plasticité synaptique et le développement dendritique dans la couche lacunosum-moléculaire, impactant ainsi les propriétés intégratives de l'hippocampe en développement.

b. Les neurones GABAergiques

Les neurones GABAergiques ne constituent que 10 à 15% des neurones de CA1 (Pelkey et al. 2017). Cependant, ils se caractérisent par une grande diversité basée sur leurs caractéristiques anatomiques, leurs propriétés électrophysiologiques, l'expression de marqueurs moléculaires, leur origine embryonnaire et des facteurs de transcription qu'ils expriment (Ascoli et al., 2008; Harris et al., 2018 ; Aika et al., 1994; Woodson et al., 1989 ; Freund and Buzsáki, 1996; Klausberger and Somogyi, 2008).

A ce jour, vingt et un sous-types de neurones GABAergiques ont été identifiés dans l'hippocampe et peuvent être répartis en cinq grands groupes selon la façon dont ils innervent les neurones pyramidaux (Buzsáki et al., 2004). Il existe des neurones GABAergiques qui projettent leur axone (i) sur la région péri-somatique, (ii) sur le segment initial de l'axone, (iii) ou sur la région péri-dendritique des cellules pyramidales. Il existe également (iv) un groupe de neurones GABAergiques qui contactent uniquement d'autres neurones GABAergiques et enfin (v) un autre groupe de neurones GABAergiques à projection à longue distance.

i) Les neurones GABAergiques à innervation péri-somatique

Dans cette catégorie, on retrouve les neurones GABAergiques qui connectent les neurones pyramidaux au niveau du soma et des dendrites proximales, exerçant ainsi un contrôle important sur leur capacité à initier des potentiels d'action (Pelkey et al., 2017). Ils forment la famille des cellules dites « en panier » (de l'anglais « Basket Cell »), nom dû à leur arborisation axonale caractéristique, entourant les corps cellulaires des cellules pyramidales. Les neurones en panier expriment la Parvalbumine (PV ; protéine qui se fixe au calcium) ou la Cholécystokinine (CCK ; un neuropeptide qui agit en médiateur de la satiété en se fixant aux récepteurs CCK). Cependant il existe des différences entre ces deux types de neurones (**Figure I.4A**).

Les neurones GABAergiques en panier qui expriment la PV (« PV basket cells », **PVBCs**) représentent environ 14% des neurones GABAergique de CA1 (Bezaire and Soltesz, 2013). Leur soma se situe principalement dans la couche pyramidale (principalement dans la partie proche du stratum oriens) et leurs dendrites s'étendent de l'alveus au stratum lacunosum moleculare (Freund and Buzsáki, 1998; Parra et al., 1998 ; Freund and Buzsáki, 1996). Sur le plan électrophysiologique, une fois leur seuil de décharge atteint, les PVBCs se caractérisent par une décharge soutenue et à haute fréquence de potentiels d'action (« fast-spiking » ; Kawaguchi et al., 1987; Tricoire et al., 2011; Gouwens et al., 2020 ;Parra et al., 1998).

Les neurones GABAergiques en panier qui expriment la CCK (« CCK basket cells », **CCKBCs**) représentent, quant à eux, environ 9 % des neurones GABAergiques de CA1 (Bezaire and Soltesz, 2013). Contrairement au PVBCs, la localisation des CCKBCs dans CA1 est plus éparse. Les somas des CCKBCs sont localisés sur l'ensemble de l'axe radial (allant du so à la bordure sr/SLM) avec une majorité des corps cellulaires dans le stratum radiatum (Freund and Buzsáki, 1996; Vida et al., 1998; Klausberger et al., 2005). La plupart des CCKBCs ont leurs dendrites qui s'entendent de l'alveus au SLM mais certaines ont une arborisation dendritique tangentielle. Lorsque les CCKBCs sont dépolarisés, ces neurones adaptent leur fréquence de décharge en augmentant l'intervalle entre

les potentiels d'action (Vida et al., 1998; Gouwens et al., 2020). En plus de la CCK, les CCKBCs co-expriment soit le peptide intestinal vasoactif (VIP) soit le transporteur vésiculaire du glutamate VGluT3 (Bezaire and Soltesz,

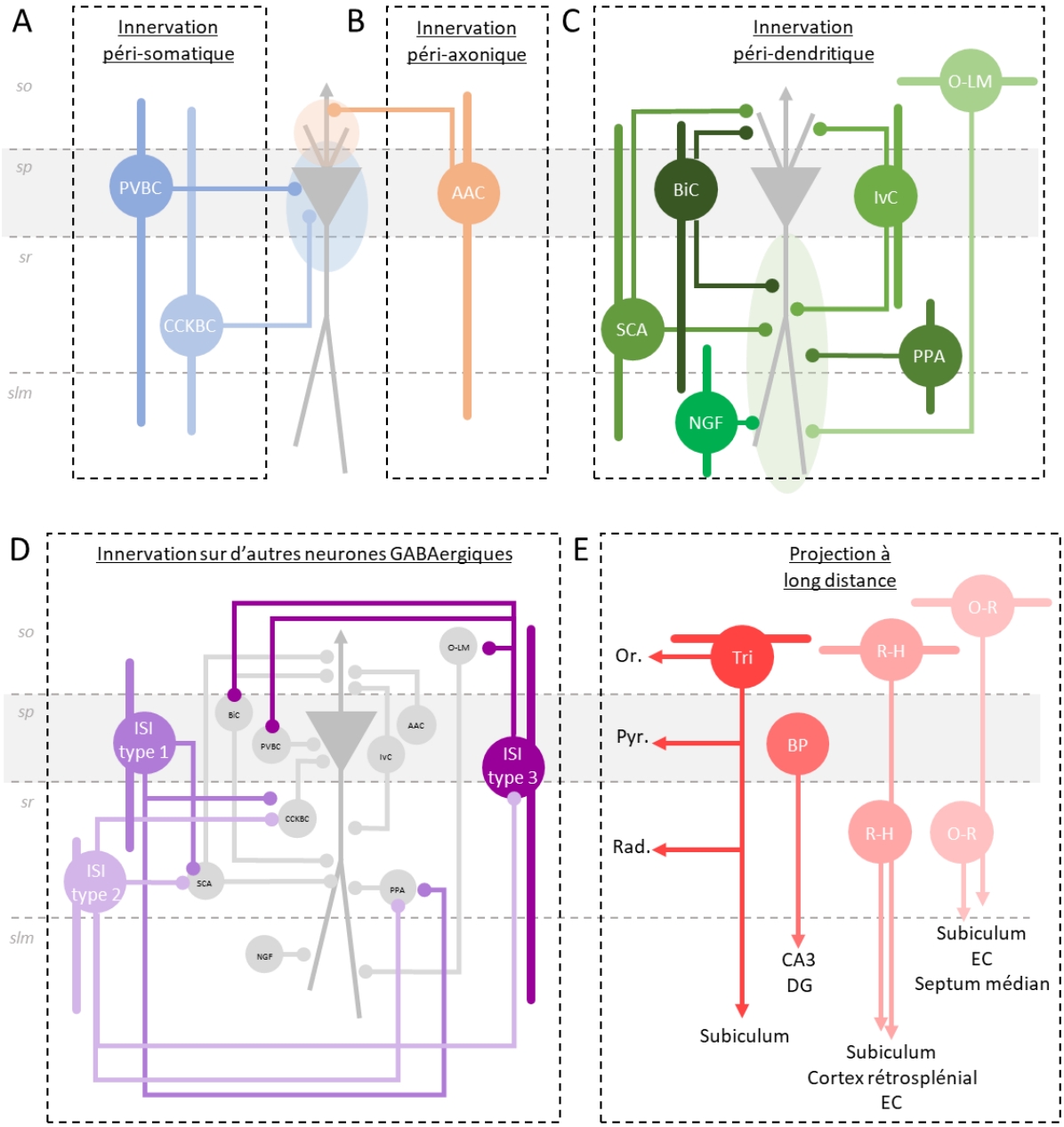


Figure I.4 : Diversité des neurones GABAergiques de CA1.

A. Représentation schématique des connexions établies sur les cellules pyramidales (en gris) par les neurones GABAergiques à innervation péri-somatiques, (**B**) à innervation péri-axonique et (**C**) à innervation péri-dendritique. **D.** Représentation des connexions établies par les neurones GABAergiques qui connectent d'autres neurones GABAergiques et (**E**) par ceux à projection longue distance et qui connectent d'autres régions ou structures. *PVBC : neurone en panier qui exprime la Parvalbumine (« PV basket cells ») ; CCKBC : neurone en panier qui exprime la Cholécystokinine (« CCK basket cells ») ; BiC : neurone bistratifié (« Bistratified cells ») ; IvC : neurone en forme de lierre (« Ivy cells ») ; O-LM : neurone Oriens-Lacunosum Moleculare ; SCA : neurone associé aux collatérales de Schaffer (« Schaffer collateral associated ») ; PPA : neurone associé à la voie perforante (« Perforant path-associated ») ; NGF : neurone en forme de glie (« Neurogliaform », NGFs) ; ISI type I : Interneurone sélectif des Interneurones (« Interneuron Selective Interneuron ») de type I ; ISI type II : Interneurone sélectif des Interneurones de type II ; ISI type III : Interneurone sélectif des Interneurones de type III ; Tri : neurone trilaminaire ; BP : neurone à rétroprojection (« backprojection cells ») ; R-H : neurone à projection rétro-hippocampique ; O-R : neurone oriens-rétrohippocampique ; DG : gyrus denté ; EC : cortex entorhinal ; so : stratum oriens ; sp : stratum pyramidale ; sr : stratum radiatum ; slm : stratum lacunosum moleculare*

2013; Somogyi et al., 2004) faisant que cette population de neurones en panier est elle-même constituée de deux sous-groupes. Enfin les terminaisons de ces neurones possèdent de nombreux récepteurs aux endocannabinoïdes (CB1Rs) (Pelkey et al., 2017, Katona et al., 1999; Valero et al., 2015).

En plus de ces différences sur le plan moléculaire, électrophysiologique et de localisation dans CA1, les neurones GABAergiques PVBCs et CCKBCs ont un impact différent sur l'activité de réseau de CA1 de par les différentes afférences qu'ils reçoivent provenant des cellules locales et des autres structures. L'intégration des neurones GABAergiques PVBCs et CCKBCs dans les circuits locaux de CA1 sera décrite plus en détail plus loin dans ce manuscrit.

ii) Les neurones GABAergiques à innervation péri-axonique

Cette catégorie de neurones GABAergiques est composée uniquement d'un seul type cellulaire : les neurones *axo-axoniques* (« Axo-Axonic cells », AACs) ou neurones *en chandelier* et représentent 4% des neurones GABAergiques de CA1 (Bezaire and Soltesz, 2013 ; Freund and Buzsáki, 1998; Buhl et al., 1994a; Somogyi et al., 1983, 1985, 2014). Leur soma se situe principalement dans le stratum pyramidale et leurs dendrites s'étendent de l'alveus au stratum lacunosum moleculare (**Figure I.4B**).

Leur axone s'étend selon l'axe proximo-distal de CA1 principalement dans le stratum oriens mais aussi dans le stratum pyramidale (couche profonde), et contacte principalement le segment initial de l'axone des neurones pyramidaux (1 AAC contacte ~1200 cellules pyramidales). Ces neurones déchargent à haute fréquence (« fast spiking ») et, en innervant le segment initial, ils exercent un contrôle très important sur la capacité des cellules pyramidales à émettre des potentiels d'action et à empêcher leur propagation rétrograde (Parra et al., 1998 ; Buhl et al., 1994b ; Pelkey et al., 2017; Povysheva et al., 2013). Sur le plan moléculaire, les AACs expriment la PV (Baude et al., 2007).

iii) Les neurones GABAergiques à innervation péri-dendrititque

Les neurones GABAergiques à innervation péri-dendritique connectent les neurones pyramidaux au niveau de différents compartiments dendritiques et ont une influence particulière sur le traitement de l'information au niveau de la cellule pyramidale. Il existe 6 types de neurones GABAergiques à innervation péri-dendritique : les neurones Oriens-Lacunosum Moleculare (O-LM), les neurones GABAergiques associés aux collatérales de Schaffer (« Schaffer collateral-associated », SCAs) ou ceux associés à la voie perforante (« Perforant-path associated », PPAs), les neurones en forme de glie (« Neurogliaform », NGFs) et ceux en forme de lierre (« Ivy cells », IvCs) et enfin les neurones GABAergiques bistratifiés (« Bistratified cells », BiCs) (**Figure I.4C**).

Les neurones O-LM représentent environ 4 % des neurones GABAergiques de CA1 (Bezaire and Soltesz, 2013). Leur corps cellulaire est situé dans le stratum oriens et ont une arborisation axonale dans le stratum lacunosum moleculare où ils connectent les cellules pyramidales au niveau de la partie distale des dendrites apicales (Pelkey et al., 2017). De par les afférences qu'ils reçoivent, les neurones O-LM exercent un rétrocontrôle inhibiteur sur ces cellules comme nous le verrons plus loin dans ce manuscrit. Ces neurones forment également des connexions inhibitrices avec des neurones GABAergiques locaux leur permettant ainsi de faciliter la transmission des informations intra-hippocampiques tout en réduisant l'influence des entrées extra-hippocampiques rendant ces cellules importantes pour l'intégration et la transmission de l'information dans le réseau de CA1 adulte (Leão et al., 2012). Au niveau électrophysiologique, les O-LM déchargent de manière soutenue avec un léger retard (Tricoire et al., 2011). Sur le plan moléculaire, ces neurones expriment fortement la somatostatine (SST ; neuropeptide ayant une action inhibitrice sur de nombreux mécanismes), légèrement la

PV ainsi que les récepteurs métabotropiques au glutamate de type 1α et 7 (mGluR1 α et mGluR7) (Baude et al., 1993; Katona et al., 2014 ; Freund and Buzsáki, 1998).

Les neurones GABAergiques bistratifiés (BiCs) et en forme de lierre (IvCs) représentent, respectivement, 6 et 23 % de la population des neurones GABAergiques de CA1 (Bezaire and Soltesz, 2013). Leur corps cellulaire est localisé dans le stratum pyramidale et leurs dendrites s'étendent du so au sr (Pelkey et al., 2017 ; Buhl et al., 1995). Ces neurones projettent leur axone principalement sur les dendrites des cellules pyramidales présentes dans le stratum radiatum et oriens. Sur le plan électrophysiologique, une fois leur seuil de décharge atteint, les IvCs ont un profil de décharge dit en retard (« late spiking ») avec la présence d'un délai entre le début de la dépolarisation et le premier potentiel d'action (Tricoire et al., 2010). Les BiCs présentent, quant à elles, un profil de décharge rapide et soutenue (« fast spiking » ; Kawaguchi et al., 1987; Tricoire et al., 2011). Ces deux types de neurones différents sur le plan moléculaire puisque les IvCs expriment nNOS (« neuronal Nitric Oxide Synthase ») et le Neuropeptide Y (NPY ; Tricoire et al., 2010 ; Somogyi et al., 2012) tandis que les BiCs expriment principalement la PV mais aussi la SST et NPY (Klausberger et al., 2004; Katona et al., 2014 ; Baude et al., 2007; Klausberger, 2009).

Les neurones GABAergiques associés aux collatérales de Schaffer (SCAs) représentent environ 5% des neurones GABAergiques de CA1 (Bezaire and Soltesz, 2013). Leur soma est principalement situé dans le stratum radiatum et leurs dendrites s'étendent dans toutes les couches de CA1. Ces neurones expriment principalement la CCK mais peuvent également exprimer la calbindine (CB ; Pelkey et al., 2017) et expriment les récepteurs aux endocannabinoïdes (CB1R). Sur le plan électrophysiologique, les SCAs présentent un profil de décharge adaptatif (Vida et al., 1998).

Les neurones GABAergiques associés à la voie perforante (PPAs), quant à eux, représentent 1,3% des neurones GABAergiques de CA1. Leur corps cellulaire est situé à la frontière sr/SLM (Vida et al., 1998; Bezaire and Soltesz, 2013) et leurs dendrites restent principalement localisées dans le stratum lacunosum-moleculare tout comme leur axone qui contacte la région apicale des dendrites des cellules pyramidales de CA1. Cependant, ces neurones projettent aussi leur axone sur les dendrites des cellules granulaires du gyrus denté (Klausberger et al., 2005, Freund and Buzsáki, 1998). Ils expriment la CCK et la CB (Pawelzik et al., 2002). Sur le plan électrophysiologique, les PPAs présentent un profil de décharge adaptatif comme les SCAs (Vida et al., 1998).

Les neurones GABAergiques en forme de glie (« neurogliaform cells » en anglais ; NGFs) représentent 9,3 % des neurones GABAergiques de CA1 mais près de 50 % des neurones de la SLM de CA1 (Bezaire and Soltesz, 2013). Leur soma se situe dans le stratum lacunosum moleculare ainsi que la majorité de leurs dendrites (Bezaire and Soltesz, 2013; Freund and Buzsáki, 1998 ; Vida et al., 1998). L'axone des NGFs s'étend dans le SLM et la partie superficielle du sr de CA1. On retrouve également des prolongements des arborisations dendritiques et axonales dans la couche moléculaire du gyrus denté (Price et al., 2005). Les NGFs sont fortement intégrées dans les circuits neuronaux de CA1 puisqu'elles reçoivent des afférences venant de nombreux neurones locaux mais aussi provenant de structure extra-hippocampiques (Price et al., 2005 ; Quattrocolo and Maccaferri, 2014 ; Chittajallu et al., 2017). Ainsi, les NGFs jouent un rôle très important dans l'intégration des informations par le réseau de CA1. Sur le plan électrophysiologique, ces neurones ont un profil de décharge dit en retard (« late spiking ») (Tricoire et al., 2010). Les NGFs expriment le Neuropeptide Y (NPY) et nNOS (« neuronal Nitric Oxide Synthase »), cette dernière étant conditionnée par l'origine embryonnaire des NGFs (Tricoire et al., 2010).

iv) Les neurones GABAergiques qui connectent d'autres neurones GABAergiques

Bien que les neurones GABAergiques vus précédemment soient capables de connecter d'autres neurones GABAergiques, ces connexions sont minoritaires par rapport aux connexions faites avec les neurones

pyramidaux. Il existe toutefois une population de neurones GABAergiques qui contacte majoritairement d'autres neurones GABAergiques : les Interneurones sélectifs des Interneurones (« Interneuron Selective Interneuron » en anglais, ISIs). Les ISIs représentent environ 20% des neurones GABAergiques de CA1 et sont divisés en 3 groupes : ceux qui expriment la Calrétinine (CR; ISIs de type 1), ceux qui expriment le Peptide Intestinal Vasoactif (VIP, ISIs de type II) et ceux qui expriment les deux (ISIs de type III) (**Figure I.4D**) (Bezaire and Soltesz, 2013 ; Ascady et al. 1996 ; Gulyas et al. 1996).

Les ISIs de type I ont leur soma localisé dans le stratum pyramidale et leurs dendrites traversent radialement l'ensemble des couches de CA1 (Gulyás et al., 1996; Pelkey et al., 2017). Leur axone s'étende dans le sr et le sp et forme préférentiellement des contacts avec les neurones GABAergiques exprimant la CB, comme les SCAs, les PPAs, les autres neurones ISIs de type I et les neurones exprimant la CCK dont les CCKBCs (Gulyás et al., 1996).

Les ISIs de type II, quant à eux, ont leur soma situé dans le stratum radiatum au niveau de la bordure avec la SLM. Leurs dendrites s'étendent dans le SLM. Leur axone s'étend dans le sr et forme des synapses sur les dendrites de neurones GABAergiques exprimant la CB, comme les neurones PPAs et SCAs, ou le VIP, mais aussi avec les neurones ISIs de type II et III ainsi que les CCKBCs.

Les ISIs de type III ont leur soma localisé dans le stratum pyramidale et dans le stratum radiatum profond. Ces neurones ont une arborisation dendritique bipolaire qui s'étend dans toutes les couches de la région de CA1 (Acsády et al., 1996). Les ISIs de type III innervent les neurones se trouvant dans le so et l'alveus et plus particulièrement les neurones GABAergiques O-LM mais aussi ils contactent, dans des proportions plus faibles, des neurones bistratifiés et des cellules en panier qui expriment la PV (Chamberland et al., 2010). Leurs connectivités, entrante et sortante, confèrent aux ISIs de type III un rôle important dans la gestion du passage de l'information dans le réseau de CA1 adulte.

En ciblant d'autres neurones GABAergiques de CA1 et en ne formant pas de connexion avec les cellules pyramidales, les ISIs sont responsables d'une levée d'inhibition des cellules pyramidales lors de leur activation par les entrée extra-hippocampique et permettent ainsi de contrôler la coordination du réseau de CA1 adulte (Gulyás et al., 1996; Pelkey et al., 2017).

v) Les neurones GABAergiques à projection à longue distance

Les neurones GABAergiques à projection longue distance de CA1 constituent les liens directs entre les différentes régions de la formation hippocampique et les structures externes (Melzer and Monyer, 2020). Ces neurones ont la particularité de faire des contacts synaptiques localement mais aussi de projeter leur axone hors de l'hippocampe vers d'autres structures, comme le septum, le subiculum ou encore le cortex entorhinal. Ils peuvent être divisés en plusieurs sous-groupes plus ou moins bien définis en fonction de leur projection vers différentes régions/structures (**Figure I.4E**).

Le premier groupe de neurones GABAergiques à projection longue distance sont les neurones à rétroprojection (« backprojection cells »). Ces neurones ont leur corps cellulaire situé dans le stratum pyramidale de CA1 et leurs axones projettent vers CA3 et le gyrus denté (Sik et al., 1994; Katona et al., 2017) et contactent principalement les dendrites basales des cellules pyramidales de ces régions. Ces neurones expriment la SST et le récepteur métabotropique au glutamate de type 1α (mGluR1α) (Klausberger, 2009 ; Katona et al., 2017).

Le deuxième groupe de neurones GABAergiques à projection longue distance sont les neurones à projection rétro-hippocampique. Leur soma se situe dans le stratum radiatum ou le stratum oriens et leur axone projette localement, respectivement, sur les dendrites apicales distales et basales des neurones glutamatergiques de

CA1. Ils projettent également dans d'autres structures telles que le subiculum, le cortex entorhinal et le cortex rétrosplénial (Jinno et al., 2007; Melzer et al., 2012).

Le troisième groupe de neurones GABAergiques à projection longue distance sont les neurones trilaminaires. Ces neurones ont leur soma dans le stratum oriens et ont une arborisation dendritique qui s'étend tout le long de l'axe proximo-distal de CA1. Comme le laisse entendre leur nom, ces neurones projettent leur axone dans trois couches de CA1 : le stratum oriens, pyramidale, radiatum et parfois même le subiculum (Ferraguti et al., 2005).

Le quatrième groupe de neurones GABAergiques à projection longue distance sont les neurones à double projection, appelés aussi neurones oriens-rétrohippocampiques ou neurones radiatum-rétro-hippocampiques. Leur corps cellulaire est situé dans le stratum oriens ou dans le stratum radiatum. Leur particularité est qu'ils envoient leur axone à la fois dans des structures rétro-hippocampiques (le subiculum et le cortex entorhinal) et aussi dans une structure plus éloignée, le septum médian (Jinno et al., 2007). Ces neurones GABAergiques à double projection expriment principalement la SST et la CB. Une minorité d'entre eux expriment NPY.

Enfin, un dernier groupe de neurones GABAergiques projette ses axones vers le septum médian et contacte préférentiellement des neurones GABAergiques du septum exprimant la PV. Leur corps cellulaire est localisé dans le stratum oriens, là où la majorité des terminaisons septo-hippocampiques arrivent. Les neurones GABAergiques septaux projettent sur les neurones GABAergiques hippocampiques desquels ils reçoivent une connexion. Il existerait donc une connectivité réciproque au sein du réseau hippocampo-septal. Ces neurones sont principalement des neurones qui expriment la SST (Jinno et al., 2007) et il est important de noter qu'une sous-population de ces neurones sont des neurones GABAergiques pionniers (c'est-à-dire générés très tôt au cours de l'embryogenèse, à E7) (Picardo et al., 2011; Villette et al., 2016; Bocchio et al., 2020).

On trouve aussi dans l'hippocampe, des neurones GABAergiques qui projettent leur axone sur les neurones du cortex entorhinal. Ils sont localisés dans la région CA1 et dans le Hile du Gyrus Denté. Ils expriment la SST et contactent préférentiellement d'autres neurones GABAergiques situés dans le cortex entorhinal médian (Melzer et al., 2012). Ces neurones ressemblent fortement aux neurones hippocampo-septaux, de par leur localisation et leur contenu neurochimique.

Comme nous venons de le voir, la région de CA1 est composée d'une population de neurones très diversifiés sur le plan morphologique, neurochimique, électrophysiologique et fonctionnel. Ces neurones établissent des connexions localement dans CA1 mais reçoivent également des afférences en provenance des structures intra- et extra- hippocampiques. Dans la partie suivante, nous verrons comment s'organise la connectivité au sein de la région de CA1 pour pouvoir acheminer les informations en provenance de structures externes jusqu'à CA1 pour y être traitées.

B- ORGANISATION ANATOMIQUE DE LA CONNECTIVITE DE LA REGION DE CA1

La connectivité établie entre la région de CA1 et les structures externes est essentielle pour sous-tendre les multiples fonctions cognitives associées à l'hippocampe. Les informations en provenance de nombreuses régions du système nerveux intégrant des modalités sensorielles, comme le cortex associatif visuel, auditif ou somatique, sont acheminées vers la région de CA1 où elles seront traitées et consolidées avant d'être restituées.

Dans cette partie, nous verrons les différentes connexions directes et indirectes établies entre les structures externes et la région de CA1 permettant le transfert des informations extra-hippocampique vers cette région.

Nous verrons que, dans le cas de connexions indirectes vers CA1, l'information passe par différentes régions de la formation hippocampique, impliquant diverses voies synaptiques établies entre ces régions (**Figure I.5**). Enfin, nous verrons également que, en plus de recevoir les afférences en provenance de structures extra- et intra-hippocampiques, les neurones de CA1 forment des connexions locales entre eux, constituant un microcircuit essentiel au traitement des informations reçues.

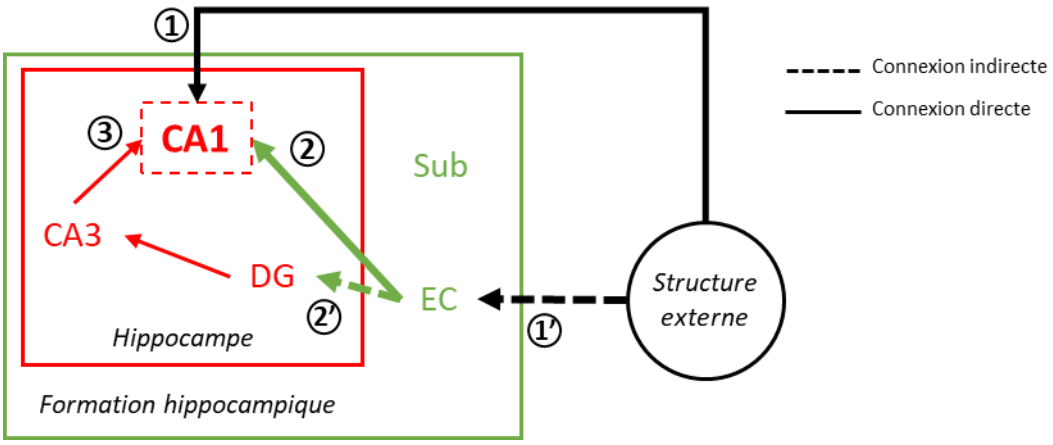


Figure I.5 : Acheminement de l'information sensorielle d'origine extra-hippocampique vers la région de CA1.

Représentation schématique des connexions directes et indirectes en provenance de structures externes qui acheminent l'information jusqu'à la région de CA1. Les informations conduites par voies indirectes passent par différentes structures de la formation hippocampique et de l'hippocampe pour arriver jusqu'au microcircuit de CA1 (rectangle en pointillés rouges). *Sub : subiculum ; DG : gyrus denté ; EC : cortex entorhinal*

1) Connexions entre les structures externes et la région de CA1

Les informations en provenance de diverses structures corticales et sous-corticales peuvent être acheminées jusqu'à la région de CA1 via des connexions bidirectionnelles directes établies avec les neurones de CA1. Elles peuvent être également indirectes en projetant dans un premier temps vers une région considérée comme étant la principale porte d'entrée de la formation hippocampique : le cortex entorhinal.

a. Connexions directes : structures externes vers CA1

La région de CA1 reçoit les afférences en provenance directes de plusieurs structures corticales et sous-corticales (**Figure I.6 et 7**).

i) Connexions septo-hippocampiques

Le septum est une structure sous-corticale située dans la partie antérieure du cerveau, sous le corps calleux et entre les ventricules latéraux. Cette structure peut être divisée en 3 parties : médiane, latérale et postérieure (Swanson and Cowan, 1979) mais seule la partie médiane du septum se projette sur la région CA1 de

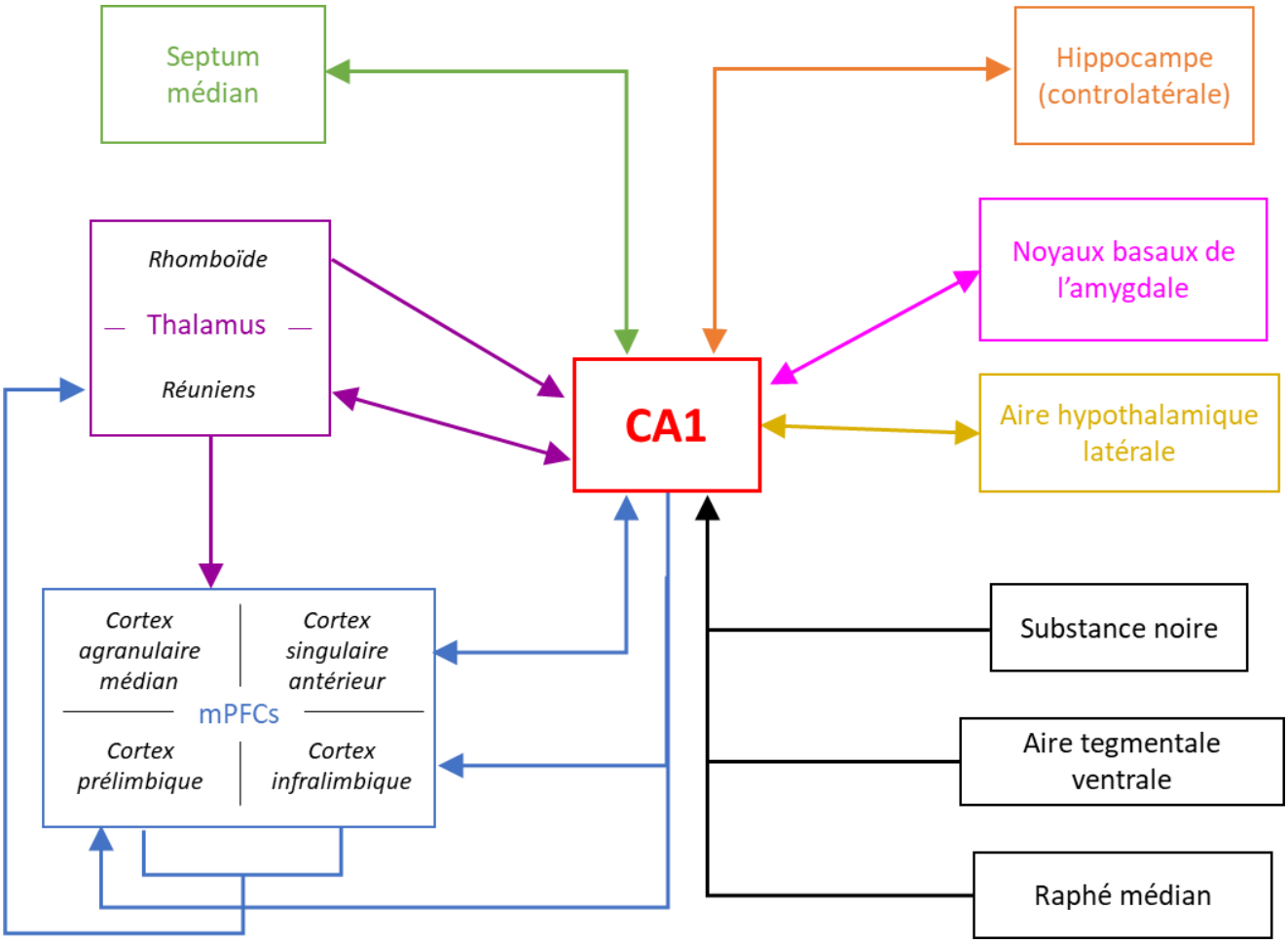


Figure I.6 : Représentation schématique des afférences et efferences directes entre différentes structures corticales et sous-corticales avec la région de CA1.

Connexions directes entre la région de CA1 et les noyaux du thalamus médian (en violet) ; le cortex préfrontal médian (en bleu) ; le septum médian (en vert) ; différentes structures sous-corticales (en noir). *(Ceci est une liste non-exhaustive)*

l'hippocampe en passant par la fimbria et le fornix (Swanson and Cowan, 1979; Risold and Swanson, 1997; Freund and Antal, 1988). Le septum médian est lui-même constitué d'une partie dorsale correspondant au noyau médian du septum et une partie ventrale aussi appelée bande diagonale de Broca (« diagonal band of Broca » ; Risold, 2004). Le septum médian est composé de neurones cholinergiques, GABAergiques et glutamatergiques qui forment un réseau local densément interconnecté et qui se projettent également vers CA1 (Kiss et al., 1990; Leão et al., 2015 ; Sun et al., 2014).

La majorité des connexions septo-hippocampiques sur les cellules pyramidales de CA1 sont cholinergiques (~65%). Elles ciblent principalement les dendrites proximales et le soma des neurones pyramidaux de CA1 (Sun et al., 2014). Il existe également des projections cholinergiques sur certains neurones GABAergiques de CA1 (12% des inputs septaux sur les interneurones), principalement des neurones GABAergiques « O-LM » (Oriens – Lacunosum Moleculare) (Leão et al., 2012). Les neurones glutamatergiques du septum médian, quant à eux, contactent principalement des neurones GABAergiques de la str. oriens et l'alveus de CA1 et plus rarement les cellules pyramidales (Sun et al., 2014 ; Freund and Antal, 1998). Enfin, les afférences GABAergiques provenant du septum médian ciblent principalement les neurones GABAergiques qui expriment la Parvalbumine (PV) de CA1 (Freund and Antal, 1988; Sun et al., 2014; Villette et al., 2016). Via ces connexions inhibitrices, le septum médian induit une désinhibition rythmique de cette structure. Plus de 67% des connexions septales sur les

interneurones sont GABAergiques. Réciproquement, certains neurones GABAergiques de CA1 à projection longue distance qui expriment la somatostatine (SST), projettent en retour dans le septum médian (Jinno and Kosaka, 2002; Villette et al., 2016).

Sur le plan fonctionnel, les entrées du septum médian dans CA1, notamment celles des neurones GABAergiques, sont principalement impliquées dans la genèse des oscillations Thêta dans CA1, qui sont associées au déplacement de l'animal dans son environnement (Buzsáki, 2002; King et al., 1998; Yoder and Pang, 2005) comme nous le verrons plus loin dans ce manuscrit.

ii) Connexion THALAMO-HIPPOCAMPIQUES

La partie ventro-médiane du thalamus (« Ventro-Midline Thalamus », VMT) est composée de deux noyaux, appelés Réuniens (Re) et Rhomboïd (Rh). Il est globalement admis que les neurones qui composent cette structure sont des cellules excitatrices, utilisant le glutamate comme neurotransmetteur principal (Bokor et al., 2002; Hur and Zaborszky, 2005).

Le VMT correspond à ce que l'on peut appeler un « hub » anatomique, puisqu'il reçoit les afférences provenant d'une trentaine de structures corticales et sous-corticales (Cassel et al., 2021; McKenna and Vertes, 2004) et projette de nombreuses afférences notamment vers des structures des systèmes limbique ou sensorimoteur (Vertes et al., 2006; Hoover and Vertes, 2012). En effet, les cortex-pré et infra limbiques sont connectés au Réuniens du thalamus médian, qui lui-même innerve les dendrites distales de CA1, formant ainsi une boucle excitatrice entre le réuniens, l'hippocampe et le cortex préfrontal (Vertes, 2006).

Dans la région de CA1 de l'hippocampe, les neurones du VMT se projettent tout le long de l'axe dorso-ventral, même si la densité d'afférences est beaucoup plus faible au niveau du CA1 dorsal que du CA1 ventral (Hoover and Vertes, 2012). Les neurones du VMT envoient également des fibres dans la couche superficielle du subiculum et dans le EC (Herkenham, 1978). De plus, ces projections sont absentes des autres parties de l'hippocampe (CA2, CA3 et GD) (Vertes et al., 2006).

Au niveau de CA1, les neurones glutamatergiques du VMT contactent les dendrites apicales distales des neurones pyramidaux au niveau du stratum lacunosum moleculare de CA1 ainsi que les neurones GABAergiques de CA1 situés dans le so, le sr et le SLM (Dolleman-van der Weel et al., 1997 ; Dolleman-van der Weel et al., 2017 ; Vertes et al., 2006) suggérant que cette structure exerce non seulement une influence excitatrice directe sur les neurones de CA1 mais aussi qu'elle peut les inhiber indirectement via l'excitation de neurones inhibiteurs. En effet, des études électrophysiologiques réalisées in vivo ont montré que la stimulation du VMT évoque une déflexion négative dans le SLM de CA1 (Bertram and Zhang, 1999; Dolleman-van der Weel et al., 1997). Ce courant négatif indique que les projections venant du VMT sont excitatrices et qu'elles excitent les neurones GABAergiques présents localement sans pour autant entrainer la décharge des neurones pyramidaux de CA1 (Dolleman-van der Weel et al., 1997, 2017; Morales et al., 2007). Ainsi, le VMT module l'activité du réseau de CA1 via le recrutement des neurones GABAergiques. En retour, le VMT reçoit des connexions directes et indirectes (via le subiculum) venant de CA1 (McKenna and Vertes, 2004 ; Dolleman-van der Weel et al., 1997, 2019).

Les connexions du VMT vers la région de CA1 permettent de moduler l'activité hippocampique via l'inhibition « feed foward » des cellules pyramidales et ont également une influence sur l'intégration des autres entrées des structures extra-hippocampiques qui convergent vers le SLM de CA1. De plus, le VMT joue un rôle dans la fonction de navigation spatiale associée à l'hippocampe en influençant la décharge des cellules de lieu de CA1 lors des processus de planification de trajectoire (Ito et al., 2015). La lésion ou l'inactivation du VMT réduit fortement l'activité des cellules pyramidales de CA1 qui dépendent de la trajectoire choisie par l'animal. De

façon plus générale, il a été montré que la lésion du VMT induit une diminution durable de la stabilité des champs de lieu lors de l'exploration d'un nouvel environnement ou familier (Cholvin et al., 2018).

iii) Connexion cortex préfrontal médian -hippocampus

Le cortex préfrontal médian (mPFC) du rongeur est composé de quatre sous-régions : deux sous-régions dorsales, le cortex agranulaire médian et le cortex cingulaire antérieur, ainsi que de deux sous-régions ventrales, le cortex prélimbique et le cortex infralimbique (Heidbreder and Groenewegen, 2003).

Les neurones glutamatergiques de la région ventrale de CA1 projettent sur les cellules pyramidales des structures ventrales du mPFC, en revanche ils se projettent très peu vers les régions dorsales (Hoover and Vertes, 2007; Jay and Witter, 1991 ; Vertes, 2002). Quant aux régions CA3, CA2 et GD, elles n'envoient pas de projections axonales vers le cortex préfrontal médian (Jay and Witter, 1991).

Il est globalement admis qu'il n'existe pas de connexion anatomique directe du mPFC vers CA1, contrairement aux autres aires corticales vers lesquelles CA1 se projette (Sesack et al., 1989; Vertes, 2004). Cependant, des études utilisant le virus de la rage modifié (« Rabies Virus ») ont montré la présence de connexions excitatrices du mPFC dorsal vers les régions de CA1 et CA3 de l'hippocampe (Rajasethupathy et al., 2015). Cette étude est, à ce jour, la seule à décrire des connexions directes du mPFC vers l'hippocampe.

La communication du mPFC vers CA1 utilise donc des structures relais. Il existe plusieurs structures ayant des connexions avec ces deux régions corticales et pouvant servir de pont entre elles telles que le septum, le cortex rétrosplenial ou encore certains noyaux hypothalamiques mettant en jeu des fonctions cognitives distinctes. Cependant, le VMT apparaît comme étant le lien principal entre le mPFC et la région CA1 de l'hippocampe (Dolleman-van der Weel et al., 2019) jouant ainsi un rôle d'intermédiaire entre ces deux structures. Comme nous l'avons vu précédemment, des neurones glutamatergiques du VMT peuvent se projeter vers ces deux structures (Vertes, 2006 ; Hoover and Vertes, 2012; Varela et al., 2013; Viena et al., 2021). Les neurones innervant CA1 et le mPFC se situent principalement dans la partie antérieure médiane du VMT, correspondant aux noyaux du Réuniens. En retour, le VMT reçoit des afférences en provenance à la fois de CA1 et du cortex préfrontal médian (Vertes, 2002). Il a été montré que le VMT maintient le couplage entre le mPFC et CA1 grâce aux oscillations γ générées sous forme de bouffées pendant le sommeil lent (Ferraris et al., 2018 ; Roy et al., 2017). Ces oscillations permettent de synchroniser et de coordonner l'activité et les échanges d'information entre le mPFC et CA1. Ainsi, les connexions forment une boucle cortico-thalamo-hippocampique ayant un rôle central pour les fonctions associées à l'hippocampe.

iv) Voie commissurale : connexion inter-hippocampique

Chez le rongeur, il y a de fortes connexions entre les hippocampes de chaque hémisphère. En effet, les cellules pyramidales de la région CA1 de l'hippocampe sont connectées par des neurones pyramidaux de CA3 controlatéraux via la voie commissurale (Swanson et al., 1980; Sun et al., 2014). Les axones des neurones de CA3 controlatéral projettent principalement dans le stratum oriens et contactent à la fois les cellules pyramidales et les neurones GABAergiques de la région CA1 (Shinohara et al., 2012). Ils montrent également que les neurones pyramidaux de la région de CA2 controlatérale se projettent sur la région de CA1 ipsilatéral.

v) Autres : Amygdale et hypothalamus

L'hippocampe possède des connexions réciproques avec l'amygdale, structure impliquée dans la perception et la gestion des émotions, en particulier la peur et l'anxiété (Pitkänen et al., 2000). Dans la région de CA1, les afférences de l'amygdale proviennent principalement de la partie postérieure du noyau basolatéral (« basolateral nuclei of the amygdala », BLA) mais aussi de la région postérieure du noyau basomédian (Pikkarainen et al., 1999 ; Petrovich et al., 1996). Les projections provenant de l'amygdale ciblent la partie ventrale de CA1. Le BLA se projette principalement vers le SLM de CA1 mais on retrouve également quelques fibres dans le so et le sr (Pikkarainen et al., 1999; Pitkänen et al., 2000). En retour, des cellules pyramidales de CA1 situées dans la partie superficielle du stratum pyramidale (proches du stratum radiatum) projettent sur le noyau de l'amygdale basale (Jimenez et al., 2018). Ces connexions entre l'amygdale et l'hippocampe jouent un rôle important dans la peur conditionnée (Phillips and LeDoux, 1992).

L'hypothalamus est une structure sous-corticale qui présente également des connexions bilatérales avec l'hippocampe. L'aire latérale de l'hypothalamus contient une sous-population de neurones exprimant l'hormone de concentration mélano (« melanin-concentrating hormone » MCH) qui est impliquée notamment dans la stimulation de l'appétit et peut influencer la prise alimentaire (Bittencourt et al., 1992). Ces neurones projettent dans la région de CA1 au niveau du stratum oriens et radiatum (Izawa et al., 2019).

Durant le sommeil paradoxal (« REM sleep »), ces connexions sont impliquées dans le processus d'oubli des souvenirs dépendants de l'hippocampe (Izawa et al., 2019). En effet, leur inactivation optogénétique augmente les performances de mémoire dans différentes tâches comportementales dépendantes de l'hippocampe. De plus, les projections des neurones exprimant la MCH sur les cellules du CA1 ventral semblent moduler l'impulsivité dans le comportement de prise alimentaire (Kowalski et al., 2004).

Les connexions anatomiques intra-hippocampiques sont fondamentales pour comprendre l'organisation fonctionnelle de l'hippocampe, région qui sous-tend des fonctions cognitives élaborées, comme la mémoire épisodique et la navigation spatiale.

vi) Autres : connexions monoaminergiques

Certaines structures composées de neurones spécifiques qui synthétisent des neurotransmetteurs monoamines (contenant une seule amine dans leur structure chimique) projettent leur afférence directement dans la formation hippocampique au niveau de CA1.

Parmi ces structures on retrouve le raphé médian est composé principalement de neurones de projection sérotoninergiques qui innervent l'ensemble de l'hippocampe. Les afférences en provenance de cette structure contactent les somas et les dendrites des neurones GABAergiques CB+ du SLM de la partie dorsale de CA1 et ont un effet excitateur sur ces derniers via une co-transmission sérotoninergique et glutamatergique (Freund et al., 1990; Varga et al., 2009). Ces connexions entre le raphé médian et l'hippocampe sont impliqués dans le traitement des informations liées à la récompense (Luchetti et al., 2020).

De plus, la région de CA1 reçoit également des afférences dopaminergiques provenant de la substance noire, et de l'aire tegmentale ventrale (VTA, « Ventral Tegmental Area ») ainsi que des projections noradrénergiques provenant du locus coeruleus (LC). Ces afférences se terminent principalement dans le stratum lacunosum moleculare de CA1 (Lisman and Grace, 2005). Ces entrées participent aux phénomènes de plasticité synaptique dans l'hippocampe, à l'apprentissage et à la consolidation de la mémoire (Li et al., 2003; Lemon and Manahan-Vaughan, 2012 ; McNamara et al., 2014).

Nous venons de voir ici que de nombreuses structures cérébrales externes projettent directement leurs afférences vers la région de CA1, laquelle établit en retour des connexions directes avec ces structures. Toutefois, ces structures externes peuvent également connecter la région de CA1 par une voie indirecte en passant par des régions intermédiaires au sein de la formation hippocampique.

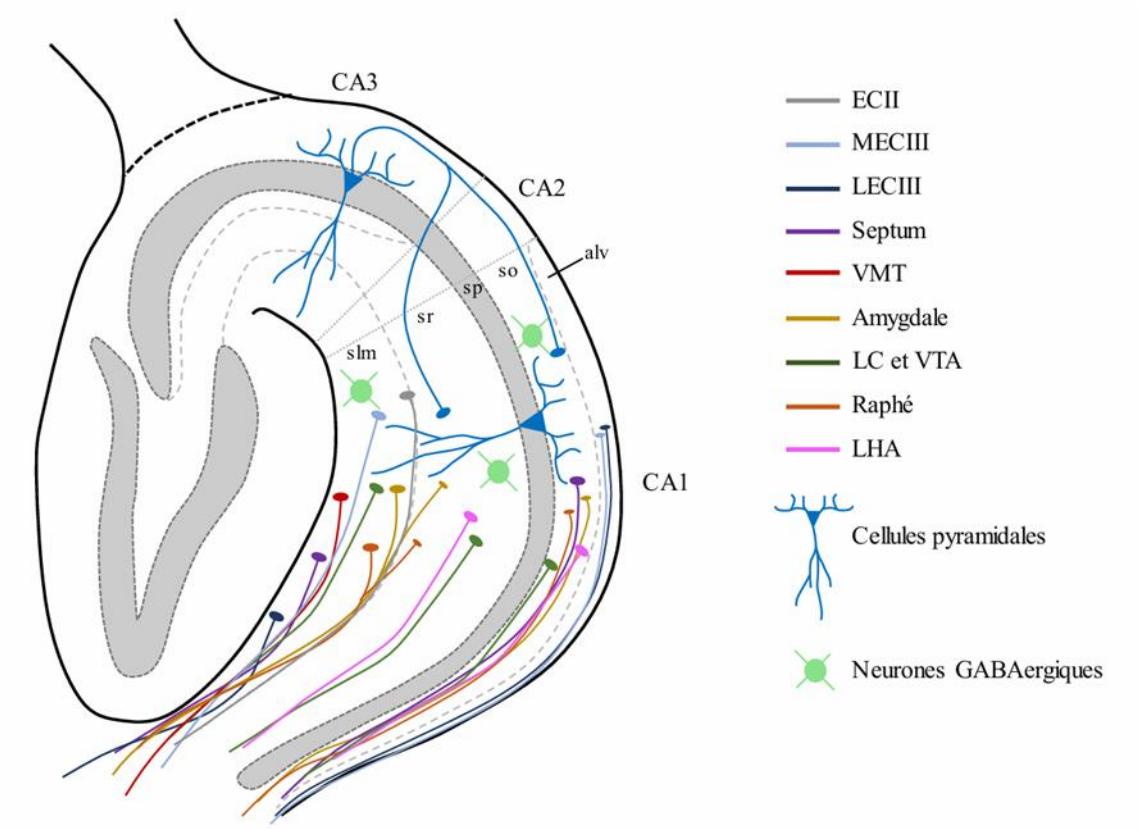


Figure I.7 : Connectivité extra- et intra- hippocampique de la région de CA1

Représentation schématique de l'ensemble des afférences extra-hippocampes résumées sur une coupe horizontale d'hippocampe. Les projections de l'amygdale (jaune) et du raphé (orange) sont principalement localisées dans le slm de CA1 mais quelques collatérales sont également décrites dans le sr et le so. *alv : alveus ; so : stratum oriens ; sp : stratum pyramidale ; sr : stratum radiatum ; slm : stratum lacunosum moleculare ; ECII : couche II du cortex entorhinal ; MECIII : couche III du cortex entorhinal médian ; LECIII : couche III du cortex entorhinal latéral ; VMT : ligne ventro-médiane du thalamus ; LC : locus coeruleus ; VTA : aire tegmentale ventrale ; LHA : aire latérale de l'hypothalamus. Figure provenant de la thèse de Leprince, 2022.*

b. Connexions indirectes : structures externes vers le EC

Le cortex entorhinal (EC) est considéré comme la principale porte d'entrée de la formation hippocampique puisqu'il reçoit des afférences provenant de diverses régions du système nerveux et achemine l'information reçue jusqu'à la région de CA1. Nous verrons que ces diverses voies d'entrée et de sortie sont ségrégées dans les différentes couches du EC afin que cette structure puisse remplir son rôle fonctionnel.

i) Anatomie du EC

Comme nous l'avons vu précédemment, le EC fait partie de la formation hippocampique avec l'hippocampe et le subiculum. Il est la structure la plus interconnectée avec l'hippocampe puisqu'on observe de fortes connexions entre ces deux structures (Ramón y Cajal, 1902; Brodmann, 1909; Witter et al., 2017).

Le EC est subdivisé en deux parties : le cortex entorhinal médial (« medial entorhinal cortex », MEC) et le cortex entorhinal latéral (« lateral entorhinal cortex », LEC). Cette subdivision a été adoptée principalement en se référant à la cytoarchitecture et à la connectivité de ces deux régions qui projettent différemment sur l'hippocampe (ce point sera traité dans la partie suivante). Sur le plan cytoarchitectural, les deux subdivisions du EC sont composées de 6 couches (Moser et al., 2010). La couche I est la plus superficielle du EC dans laquelle se trouvent des neurones GABAergiques intégrés dans un dense faisceau d'axones provenant de différentes structures. La couche II est principalement constituée de grandes cellules glutamatergiques multipolaires : des cellules étoilées (« stellate cells ») dans le MEC (Klink and Alonso, 1997) et des cellules en éventail (« fan cells ») dans le LEC (Tahvildari and Alonso, 2005). La couche III est composée de cellules pyramidales et dans les couches II et III on trouve des neurones GABAergiques exprimant différents types de neuromarqueurs comme la PV, la CB, le VIP, la CCK, la SST, ou encore le NPY. La plupart sont des neurones à projection locale mais certains présentent des projections extra-entorhinales (Melzer and Monyer, 2020; Moser et al., 2010). La couche IV contient très peu de corps cellulaires de neurones et d'interneurones et reçoit, comme la couche I, les axones provenant du septum ou monoaminergiques provenant du tronc cérébral (Moser et al., 2010). La couche V peut être divisée en deux sous-couches : la couche Va (proche de la couche IV) qui contient des cellules pyramidales dont les dendrites apicales s'étendent jusque dans les couches superficielles du EC (Lingenhöhl and Finch, 1991) et la couche Vb (proche de la couche VI) est composée de neurones plus petits. Et enfin, la couche VI présente une population neuronale hétérogène dont la densité diminue en profondeur.

Le EC est impliqué dans les processus d'apprentissage et de navigation spatiale. Cependant, il est intéressant de noter que les deux subdivisions anatomiques, le MEC et le LEC, se distinguent sur le plan fonctionnel. Le MEC est impliqué dans le codage d'informations spatiales (le « où ? » de la mémoire épisodique) de différentes natures (Fyhn et al., 2004; Hargreaves et al., 2005; Sargolini et al., 2006) tandis que le LEC traite des informations non-spatiales (le « quoi ? ») davantage liées à des processus mnésiques (association d'informations olfactives ou d'un objet à un lieu et un contexte) (Hargreaves et al., 2005; Yoganarasimha et al., 2011; Igarashi et al., 2014b).

La diversité des afférences reçues par le EC et leur ségrégation au sein de celui-ci permettent à ses deux subdivisions de remplir leur rôle fonctionnel, en intégrant des informations multisensorielles.

ii) Connectivité afférente et efférente du EC

Le MEC et le LEC se distinguent par leur connectivités afférentes et efférentes avec les structures auxquelles ils sont anatomiquement connectés, ce qui contribue à leur différenciation en deux sous-divisions (Kerr et al., 2007; Pereira et al., 2016; Agster et al., 2016).

En effet, le LEC reçoit de plus fortes connexions en provenance de structures corticales que le MEC (Burwell and Amaral, 1998). Il reçoit notamment des connexions de structures olfactives comme le cortex piriforme ou les bulbes olfactifs mais également celles en provenance des cortex insulaire, perirhinal et postrhinal (Kerr et al., 2007; Chapuis et al., 2013; Agster et al., 2016). Le MEC, quant à lui, est innervé par les aires visuelles associatives, le cortex postérieur pariétal et le cortex cingulaire (Burwell and Amaral, 1998; Kerr et al., 2007). Les entrées sous-corticales représentent un tiers des afférences du MEC et du LEC (Kerr et al., 2007). Le LEC est

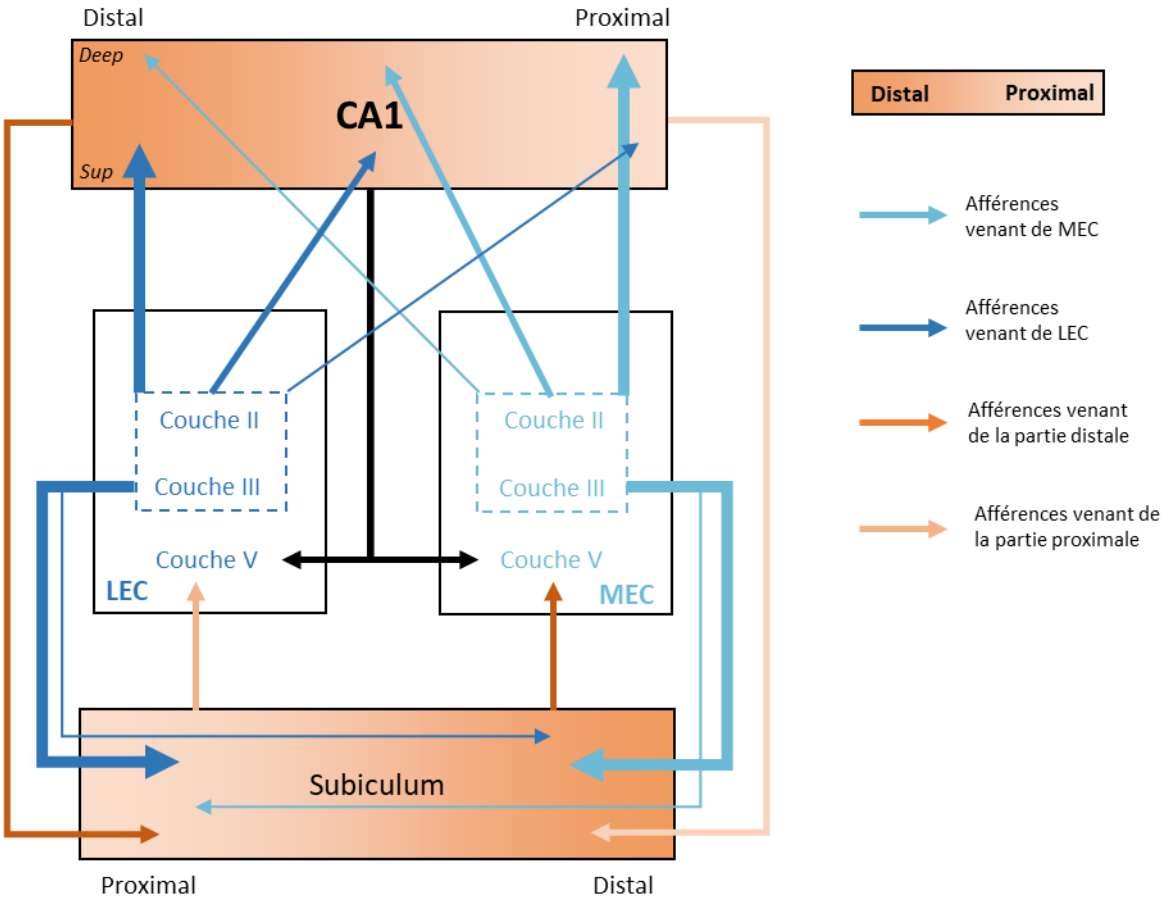


Figure I.8 : La connectivité afférente (directe) et efférente du cortex entorhinal avec la région de CA1 et le subiculum.

Représentation schématique des efférences de la couche II et III du cortex entorhinal médian (MEC, en bleu clair) et latéral (LEC, en bleu foncé) qui se projettent dans les parties proximales et distales de la région de CA1 et le subiculum via la voie temporo-ammonique (voie directe). L'épaisseur des flèches représente la densité d'afférence projetée sur la région cible en fonction de l'axe radial de cette dernière. Les efférences de la région de CA1 sur le subiculum et la couche V du MEC et LEC sont également représentées. La gradation de la partie proximo-distale de la région de CA1 et du subiculum est représentée par des nuances d'orange (orange clair correspond à la partie proximale et orange foncé à la partie distale). Les afférences partant de ces différentes parties sont représentées avec le même code couleur. Les afférences projetées par une structure indépendamment de la localisation des cellules dans l'axe proximo-distale sont représentées en noir.

innervé par les structures olfactives sous-corticales comme le noyau endopiriforme mais également par l'amygdale (Pereira et al., 2016), alors que le MEC reçoit des afférences des noyaux thalamiques comme les noyaux médians du thalamus ainsi que du septum médian (Burwell and Amaral, 1998; Canto et al., 2008). En retour, le LEC et le MEC projettent des efférences dans les aires corticales qui sont réciproques avec leurs régions corticales afférentes (Kerr et al., 2007). Cependant cette réciprocité n'est pas bien respectée pour les structures sous-corticales. Notamment, le LEC et le MEC se projettent fortement vers les ganglions de la base mais ne sont que faiblement contactés en retour par ces structures. Des connexions réciproques sont cependant présentes entre les noyaux olfactifs/amygdaliens et le LEC mais aussi entre les noyaux septaux et le MEC.

Ainsi, les afférences provenant de diverses régions cérébrales convergent vers le EC qui va ensuite acheminer les informations jusqu'à CA1 faisant de cette structure la principale voie d'entrée de la formation

hippocampique. Nous verrons que le EC conduit les informations jusqu'à la région de CA1 via une voie directe et une voie indirecte. Cependant, le EC peut également être considéré comme une des voies de sortie de l'hippocampe puisqu'il reçoit également des afférences provenant de la formation hippocampique. En effet, les couches profondes (V et VI) du MEC reçoivent les projections venant des cellules pyramidales de CA1 et du subiculum comme nous le verrons plus tard dans ce manuscrit (**Figure I.7)**.

2) Connexions entre les régions intra-hippocampiques

Les régions intra-hippocampiques (comprenant le DG, CA3, CA2 et CA1) établissent des connexions bidirectionnelles entre elles. Ainsi, les informations sensorielles provenant du EC convergent jusqu'à la région de CA1 via deux voies principales qui passent par ces différentes régions.

Après avoir été traitées et intégrées, les informations sont renvoyées vers des structures externes via les afférences excitatrices de CA1 vers le subiculum et le EC.

a. Acheminement de l'information du EC vers la région de CA1

La transmission des informations sensorielles du EC jusqu'à la région de CA1 se fait principalement par deux voies : la boucle tri-synaptique (voie indirecte) et la voie temporo-ammonique (voie directe).

i) La boucle tri-synaptique

La boucle tri-synaptique est un circuit neuronal composé de trois connexions synaptiques excitatrices successives, d'où son nom. Ces connexions, principalement unidirectionnelles, forment une boucle reliant différentes régions de la formation hippocampique, chacune ayant un rôle spécifique dans le traitement de l'information, avec le EC comme point de départ et la région de CA1 comme point d'arrivée (**Figure I.9**).

La première synapse de cette boucle, appelée voie perforante, se forme au niveau de la projection des cellules pyramidales de la couche II du cortex entorhinal médial (« medial entorhinal cortex », MEC) et latéral (« lateral entorhinal cortex », LEC) vers le Gyrus Denté (GD) où elles contactent les cellules granulaires. La deuxième synapse se situe entre le GD et CA3, où les cellules granulaires du GD envoient leurs terminaisons axonales, les fibres moussues, sur les cellules pyramidales de CA3. Ces neurones pyramidaux projettent ensuite leurs axones via les collatérales de Schaffer (SC) vers les neurones pyramidaux de CA1 au niveau du stratum radiatum, formant ainsi la troisième synapse de la boucle tri-synaptique.

Cependant, si on regarde plus précisément la connectivité au sein de la boucle tri-synaptique, deux circuits différents peuvent être distingués. En effet, la voie perforante du premier circuit a pour départ les neurones pyramidaux de la couche II du MEC qui se projettent sur la partie proximale des dendrites apicales des cellules granulaires du GD et sur la partie profonde du SLM de CA3. Concernant les collatérales de Schaffer de ce circuit, les projections des neurones pyramidaux de CA3 situés proches de CA2 connectent les neurones de CA1 proximaux (proches de CA2) (Sun et al., 2018). Dans le deuxième circuit, la voie perforante à pour départ les neurones de la couche II du LEC qui envoient leurs axones vers la partie la plus superficielle de la couche moléculaire du GD dont les neurones contactent les dendrites des neurones pyramidale de CA3 au niveau du stratum lucidum (Hjorth Simonsen, 1972 ; Hjorth-Simonsen and Jeune, 1972). Les neurones de CA3 proches du GD projettent à leur tour dans la partie distale de CA1 sur les dendrites proximales des cellules pyramidales via

les collatérales de Schaffer (Andersen et al., 2007; Sun et al., 2018). Ainsi, les projections des neurones pyramidaux de CA3 sur ceux de CA1 ont une connectivité graduelle qui est inversée sur l'axe proximo-distal (Ishizuka et al., 1990; Andersen et al., 2006; Sun et al., 2018). Ces différences de connectivité ont une importance sur le plan fonctionnel, puisque la combinaison des entrées provenant de la couche II du EC sur les neurones de l'hippocampe permet d'intégrer des informations spatiales issues du MEC et des informations non spatiales provenant du LEC.

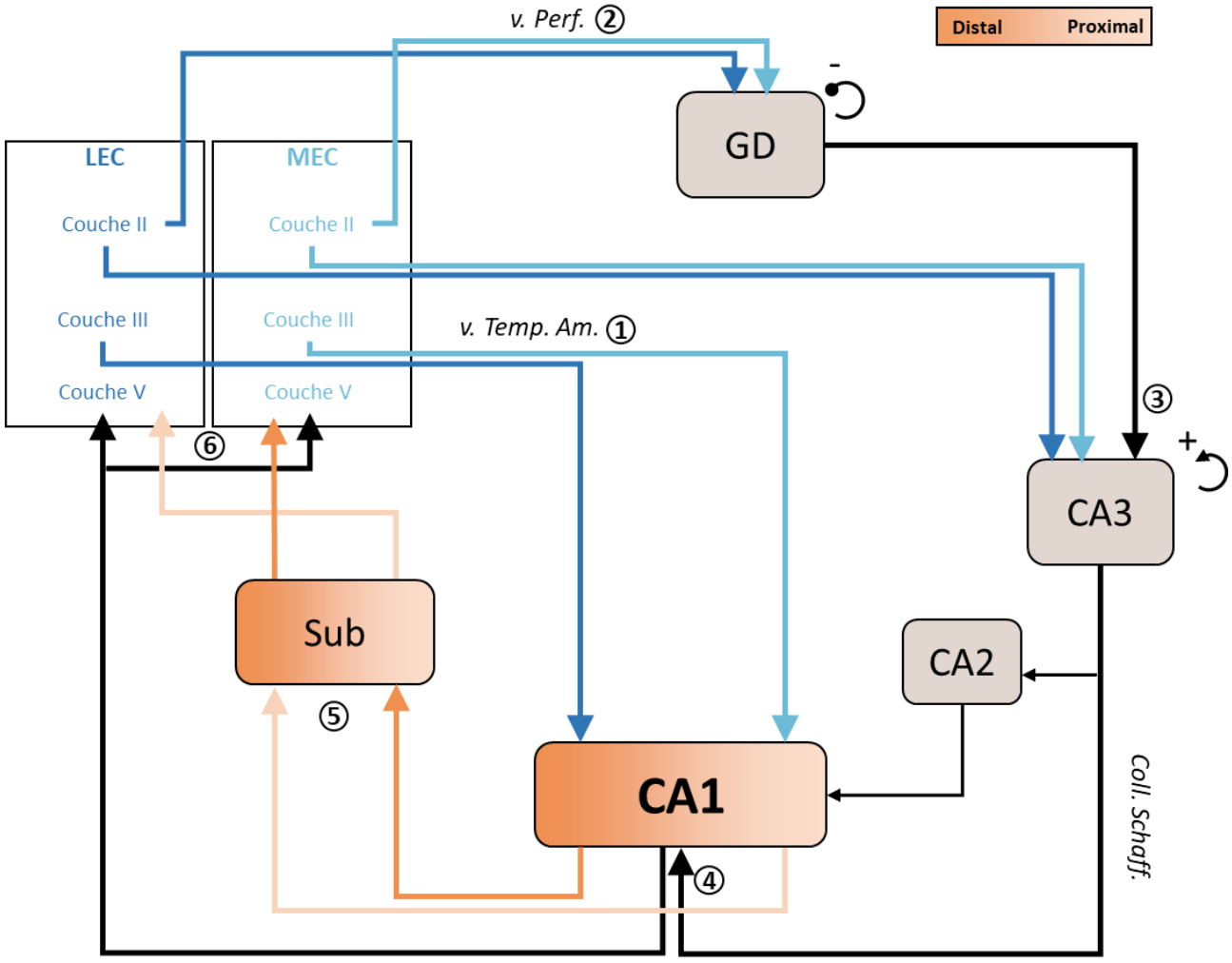


Figure I.9 : La connectivité générale de la formation hippocampique

Représentation schématique de la voie temporo-ammonique (1) et du circuit tri-synaptique (2)(3)(4) chez le rongeur. Les flèches indiquent des connexions entre les régions de l'hippocampe (GD, CA3, CA1), le subiculum et les différentes couches du cortex entorhinal médian (MEC) et latéral (LEC). Le MEC et le LEC envoient des projections (en bleu) à travers 2 voies : la voie directe (1) et la voie indirecte (2, 3 et 4). Dans la voie directe, le MEC se projette vers la partie proximale de CA1 alors que le LEC contacte la partie distale de CA1 (1). La voie indirecte correspond au circuit tri-synaptique : les neurones de la couche II du MEC et du LEC convergent vers le GD (2) et CA3. Ces informations combinées dans le GD et CA3 sont ensuite transmises à CA1 via les fibres mousses (3) et les collatérales de Schaffer (4). Pour les 2 voies, la sortie de CA1 est amenée au cortex entorhinal principalement par le subiculum (5). Une fois dans le subiculum, les informations de la région proximale de CA1 sont transmises au MEC via le subiculum distal, tandis que celles de CA1 distal sont transférées au LEC via le subiculum proximal (5 et 6). La gradation de la partie proximo-distale de la région de CA1 et du subiculum est représentée par des nuances d'orange (orange clair correspond à la partie proximale et orange foncé à la partie distale). Les afférences partant de ces différentes parties sont représentées avec le même code couleur. Les afférences projetées par une structure indépendamment de la localisation des cellules dans l'axe proximo-distale sont représentées en noir. *Coll. Schaff. = collatérales de Schaffer; v. Perf. = voie perforante; v. Temp. Am.=voie temporo ammonique.*

ii) La voie temporo-ammonique

La voie temporo-ammonique se caractérise, quant à elle, par des projections directes des neurones pyramidaux des couches II / III du MEC et du LEC vers le stratum lacunosum moleculare (SLM) de la région de CA1 qui innervent à la fois les neurones GABAergiques et les neurones pyramidaux (Van Strien et al., 2009) (**Figure I.8 et 9**).

Cependant, les afférences provenant du MEC et du LEC contactent des populations distinctes de neurones le long de l'axe proximo-distal de CA1 (Steward, 1976; Wyss, 1981; Masurkar et al., 2017). En effet, le MEC se projette préférentiellement vers le SLM de la partie proximale de CA1 (près de CA2) où il connecte les cellules pyramidales profondes ainsi que les neurones GABAergiques tels que les NGFs. Le LEC, quant à lui, contacte la partie distale du SLM de CA1 (près du subiculum) et forme des connexions avec les cellules pyramidales superficielles (Masurkar et al., 2017). Il est intéressant de noter que cette ségrégation des projections entorhinales se retrouve également dans le subiculum, puisque le MEC et le LEC ciblent respectivement le subiculum distal et proximal. De plus, une étude a montré que les neurones du LEC de la couche III forment des synapses excitatrices uniquement avec des neurones pyramidaux CB+ de la région dorsale de CA1, tandis que ceux de la couche III du MEC innervent de manière homogène toutes les cellules pyramidales de la région dorsale de CA1 (Li et al., 2017). Une sous population de neurones excitateurs CB+ de la couche II du MEC et LEC, appelés « island cells », se projettent spécifiquement au niveau de la bordure sr/SLM de la partie proximale de CA1, via la voie temporo-ammonique, où elles établissent principalement des connexions avec les neurones GABAergiques et, dans une moindre mesure, avec les neurones pyramidaux (Kitamura et al., 2014). Chez les rongeurs, on observe également une organisation anatomique des projections du EC vers l'hippocampe en fonction de l'axe allant de la partie dorsolatérale à celle ventromédiale (Strange et al., 2014). La zone dorsolatérale du EC est préférentiellement connectée à l'hippocampe dorsal. Progressivement, des sections plus ventrales et médiales du EC sont connectées à des niveaux de plus en plus ventraux de l'hippocampe (Dolorfo and Amaral, 1998; Witter et al., 2000).

Toutefois, bien que cette voie soit essentiellement excitatrice comme en témoigne le courant négatif observé suite à des stimulations électriques dans les enregistrements en extra-cellulaires (Colbert and Levy, 1992; Dolleman-van der Weel et al., 2017), les axones des neurones GABAergiques des couches II et III du MEC et du LEC se projettent également dans le SLM de CA1 (Melzer et al., 2012; Basu et al., 2016). Les entrées inhibitrices provenant du EC ciblent les neurones GABAergiques du SLM de CA1 qui expriment la CCK jouant ainsi un rôle de désinhibition des cellules pyramidales. De plus, la stimulation ex vivo à 8 Hz (fréquence des oscillations θ) des afférences GABAergiques provenant de neurones PV+ du MEC entraîne la synchronisation de l'activité dans la région de CA1 (Melzer et al., 2012). Ces neurones seraient également impliqués dans les oscillations θ enregistrées dans l'hippocampe in vivo (Ye et al., 2018).

Ainsi, la boucle tri-synaptique et la voie temporo-ammonique constituent les deux voies d'entrée principales acheminant les informations du EC vers CA1 via de multiples connexions entre les différentes régions de la formation hippocampique. Cependant, il existe d'autres connexions intra-hippocampiques entre différentes régions de la formation hippocampique qui sont cruciales pour l'acheminement et le traitement correct de l'information par CA1.

iii) La voie alvéaire

Il existe une seconde voie de projections directes du EC vers CA1 : la voie alvéaire (Ramón y Cajal, 1911; Deller et al., 1996). Les fibres provenant du EC s'étendent de façon tangentielle dans l'alvéus, puis traversent

radialement les couches de CA1 jusqu'à atteindre la région où se situent des fibres de la voie temporo-ammonique dans le SLM de CA1 (Deller et al., 1996). Des collatérales provenant des fibres issues du MEC empruntant la voie alvéaire forment des contacts monosynaptiques sur les cellules pyramidales de CA1 et les neurones GABAergiques du so (Bell et al., 2021). Ces fibres ciblent principalement les neurones GABAergiques exprimant la PV et le VIP (70%) et plus faiblement les neurones O-LM (20%). Lors de la stimulation des fibres dans l'alvéus et l'inhibition simultanée des cellules PV positives, on observe une diminution de 50 % de l'amplitude des courants postsynaptiques inhibiteurs au niveau des cellules pyramidales de CA1. Ces résultats suggèrent ainsi que la voie alvéaire affecte principalement la fonction de l'hippocampe par inhibition « feedfoward » via certains sous-types d'interneurones.

iv) Autres connexions intra-formation hippocampique : connexion entre les régions de CA1, CA2 et CA3

En parallèle des connexions intra-hippocampiques précédemment décrites, il existe d'autres connexions qui s'établissent entre les différentes régions de l'hippocampe et notamment avec CA1 aussi très important pour le contrôle du transfert d'informations vers CA1 et pour les processus cognitifs de l'hippocampe.

C'est notamment le cas de la région de CA2 qui se projette sur les neurones de CA1. Des enregistrements électrophysiologiques de paires de neurones pyramidaux de CA2 et CA1, réalisés ex vivo, ont mis en évidence des connexions monosynaptiques entre ces deux régions (Chevaleyre and Siegelbaum, 2010). La force des connexions monosynaptiques entre CA2 et CA1 n'est pas la même selon l'axe radial de CA1. En effet, les cellules pyramidales de la couche profonde du stratum pyramidale (à proximité du stratum Oriens) reçoivent une excitation plus forte des neurones de CA2 que ceux de la couche superficielle (Kohara et al., 2013). De plus, CA2 reçoit les afférences en provenance directe du GD et de la région de CA3 via les collatérales de Schaffer, l'incluant dans la boucle tri-synaptique. La région de CA2 reçoit également des projections directes de la couche II du cortex entorhinal par la voie perforante (Kohara et al., 2013). Si le rôle de CA2 dans la fonction de l'hippocampe est encore très peu connu, sa densité élevée en neurones inhibiteurs par rapport aux autres régions de l'hippocampe suggère qu'il pourrait être impliqué dans le contrôle du transfert d'informations provenant de la formation hippocampique ou d'autres structures externes.

Dans la région de CA3 de l'hippocampe, les neurones pyramidaux présentent des connexions récurrentes, c'est-à-dire qu'ils contactent d'autres cellules pyramidales de CA3. Ces récurrences jouent un rôle essentiel dans la réactivation et la consolidation des informations qui ont été encodées dans l'hippocampe en renforçant les synapses entre CA3 et CA1. Cependant à l'inverse de CA3, les cellules de CA1 présentent peu de récurrences (Aniksztejn et al., 2001).

Enfin, certains neurones GABAergiques de CA1, appelés neurones à rétroprojection, projettent leurs axones sur CA3 afin de moduler les informations entrantes qui parviennent jusqu'à CA1 via les collatérales de Schaffer (Goldin et al., 2007; Sik et al., 1995).

b. Restitution de l'information vers les structures externes

Les cellules pyramidales de la région de CA1 constituent la principale sortie de l'hippocampe en projetant leurs axones soit directement vers d'autres régions du cerveau (comme nous l'avons vu précédemment), soit vers le subiculum qui projette à son tour dans le EC qui va transférer l'information à l'extérieur de l'hippocampe (**Figure I.8 et 9**).

Ainsi, le subiculum est considéré comme étant la principale voie de sortie de la formation hippocampique. Nous allons décrire ici les connexions établies entre cette structure, la région CA1 et le EC.

i) Via les connexions : CA1 – Subiculum – EC

Le subiculum fait partie du complexe subiculaire situé entre la région CA1 et le MEC. Il est composé de trois couches principales dont sa couche la plus superficielle, la couche moléculaire, est à la continuité du SLM et du sr de CA1. Sa couche pyramidale, plus large que celle de CA1, contient le soma des neurones pyramidaux et la couche polymorphe, qui est la plus profonde (c'est-à-dire plus proche de l'alveus), forme une continuité avec le stratum oriens de la région de CA1 (Matsumoto et al., 2019; O'Mara, 2005).

Le subiculum reçoit principalement des afférences venant de CA1 et du EC (Amaral et al., 1991; O'Mara, 2005 ; Matsumoto et al., 2019). Les cellules pyramidales de CA1 projettent vers le subiculum en suivant un gradient sur l'axe proximo-distal inversé puisque les neurones de la partie distale de CA1 projettent vers la région proximale du subiculum tandis que ceux de la partie proximale de CA1 innervent la région distale du subiculum (Amaral et al., 1991). Cette ségrégation des projections est également observée pour les afférences en provenance du EC vers le subiculum. Les neurones de la couche III du MEC projettent sur la partie distale du subiculum tandis que ceux du LEC vers la partie proximale (Honda et al., 2012).

Les informations provenant de la région proximale de CA1 sont transmises au MEC via le subiculum distal, tandis que celles de CA1 distal sont transférées au LEC via le subiculum proximal (Matsumoto et al., 2019; O'Mara, 2005). De plus, des neurones glutamatergiques et GABAergiques du subiculum se rétroprojettent également vers la région CA1 (Commins et al., 2002; Sun et al., 2014).

Des structures extra-hippocampiques corticales et sous-corticales sont également directement contactées par le subiculum comme c'est le cas pour le VMT qui reçoit des afférences provenant de la couche profonde du subiculum (Witter et al., 1990; Mathiasen et al., 2019). C'est également le cas pour certaines structures corticales comme les régions corticales limbiques, paralimbiques, infralimbiques, olfactives, et périrhinales.

ii) Autre voie de sortie : Cellules pyramidale CA1 vers fornix.

Le fornix forme également une voie de sortie de l'hippocampe. A travers cette structure, les cellules pyramidales hippocampiques projettent des collatérales axonales vers différentes régions extra-hippocampiques telles que le septum, le thalamus, les corps mamillaires, le tronc cérébral, l'hypothalamus et le noyau accumbens. Cette dernière projection glutamatergique semble être la voie d'influence de l'hippocampe sur l'activité locomotrice (Whishaw & Mittleman, 1991; Cassel et al., 1997).

Comme nous venons de le voir, l'information transite jusqu'à la région de CA1 grâce à des connexions complexes formées entre les différentes régions de la formation hippocampique. Une fois arrivée dans CA1, l'information est traitée et consolidée grâce au microcircuit local jouant un rôle crucial dans les processus cognitifs sous-tendus par l'hippocampe.

3) Les microcircuits de CA1

L'organisation des connexions entre les neurones pyramidaux, les interneurones et les entrées de CA1 constitue des motifs ou modules qui se répètent avec une faible variabilité tout au long de CA1. Ces modules, ou microcircuits, constituent une unité anatomique qui jouerait un rôle fonctionnel spécifique.

Pour mieux comprendre cette fonction, je vais d'abord décrire les connexions intra-hippocampiques entre les cellules pyramidales, les neurones GABAergiques et les Cajal-retzuis. Nous verrons ensuite comment les connexions GABAergiques influencent le flux d'information au sein de ces microcircuits. Cette influence sur la dynamique du traitement de l'information hippocampique est cruciale pour la coordination des activités des neurones de CA1, notamment dans la genèse de séquences neuronales et la modulation des oscillations nécessaires à l'émergence des capacités cognitives.

a. Connectivité entre les neurones glutamatergiques et GABAergiques

Dans la région de CA1, contrairement à CA3, les cellules pyramidales forment très peu de connexions récurrentes excitatrices entre elles (Soltesz and Losonczy, 2018). Cependant, ces neurones présentent tout de même une connectivité locale, en innervant certains neurones GABAergiques qui leur envoient des projections en retour, comme c'est le cas notamment pour les cellules en panier PV (PVBCs) (**Figure I.10**).

Selon leur localisation dans l'axe radial, les cellules pyramidales ont une connectivité différente avec les neurones GABAergiques locaux. En effet, les PVBCs innervent de façon plus abondante les cellules pyramidales de la couche profonde et les inhibent plus fortement que les cellules superficielles, tandis que les CCKBCs ciblent davantage les cellules pyramidales superficielles (Lee et al., 2014; Valero et al., 2015). En retour, les cellules pyramidales superficielles connectent principalement les PVBCs (Lee et al., 2014). Cette connectivité locale procure aux PVBCs une place importante dans le traitement de l'information au niveau du réseau de CA1 car leur activation par les cellules pyramidales superficielles entraîne l'inhibition des cellules pyramidales profondes.

En ce qui concerne la connectivité des Cajal-Retzius (CRs) dans le réseau de CA1, ce sujet sera détaillé plus loin dans une partie dédiée à la connectivité durant le développement.

b. Connectivité des différents sous-types de neurones GABAergiques

Dans la région de CA1, les différents sous-types de neurones GABAergiques établissent des connexions spécifiques avec les cellules pyramidales et entre eux (**Figure I.10**).

En effet, comme nous l'avons vu précédemment, les neurones GABAergiques en panier reçoivent des afférences glutamatergiques des neurones locaux mais également en provenance de CA3 (via les collatérales de Schaffer) ou de structures extra-hippocampiques (EC, septum médian) (Buhl et al., 1995; Gulyás et al., 1996 ;Valero and de la Prida, 2018).

Les neurones O-LM, quant à eux, sont principalement stimulés par les collatérales de Schaffer et exercent un rétrocontrôle inhibiteur sur les cellules pyramidales de CA1 qu'ils connectent au niveau de la partie distale des dendrites apicales situées dans de SLM (Pelkey et al., 2017). Ces neurones forment également des connexions inhibitrices avec les neurones GABAergiques du stratum radiatum qui forment des synapses sur les dendrites des pyramides favorisant ainsi l'effet direct des collatérales de Schaffer sur les cellules pyramidales de CA1. Les

AACs reçoivent des afférences GABAergiques des neurones en panier et glutamatergiques (collatérales de Schaffer principalement) (Buhl et al., 1994b). Les PPAs reçoivent les afférences provenant directement de la couche III du EC (via la voie perforante). Ces neurones interviennent donc dans l'intégration des entrées extra-hippocampiques. Les NGFs reçoivent des afférences synaptiques des collatérales de Schaffer, des neurones GABAergiques du SLM (Price et al., 2005) ainsi que des cellules de Cajal-Retzius (Quattrocolo and Maccaferri, 2014). Elles reçoivent également des entrées synaptiques extra-hippocampiques provenant du EC et des noyaux de la ligne ventro-médiane du Thalamus (Chittajallu et al., 2017). ISIs de type II reçoivent des contacts provenant des entrées extra-hippocampiques du EC et du VMT (Acsády et al., 1996). ISIs de type III reçoivent des entrées locales (provenant des collatérales de Schaffer) et extra-hippocampiques, dans le SLM de CA1. Ces connexions qu'elles reçoivent permettent leur recrutement durant les oscillations Thêta (Luo et al., 2020).

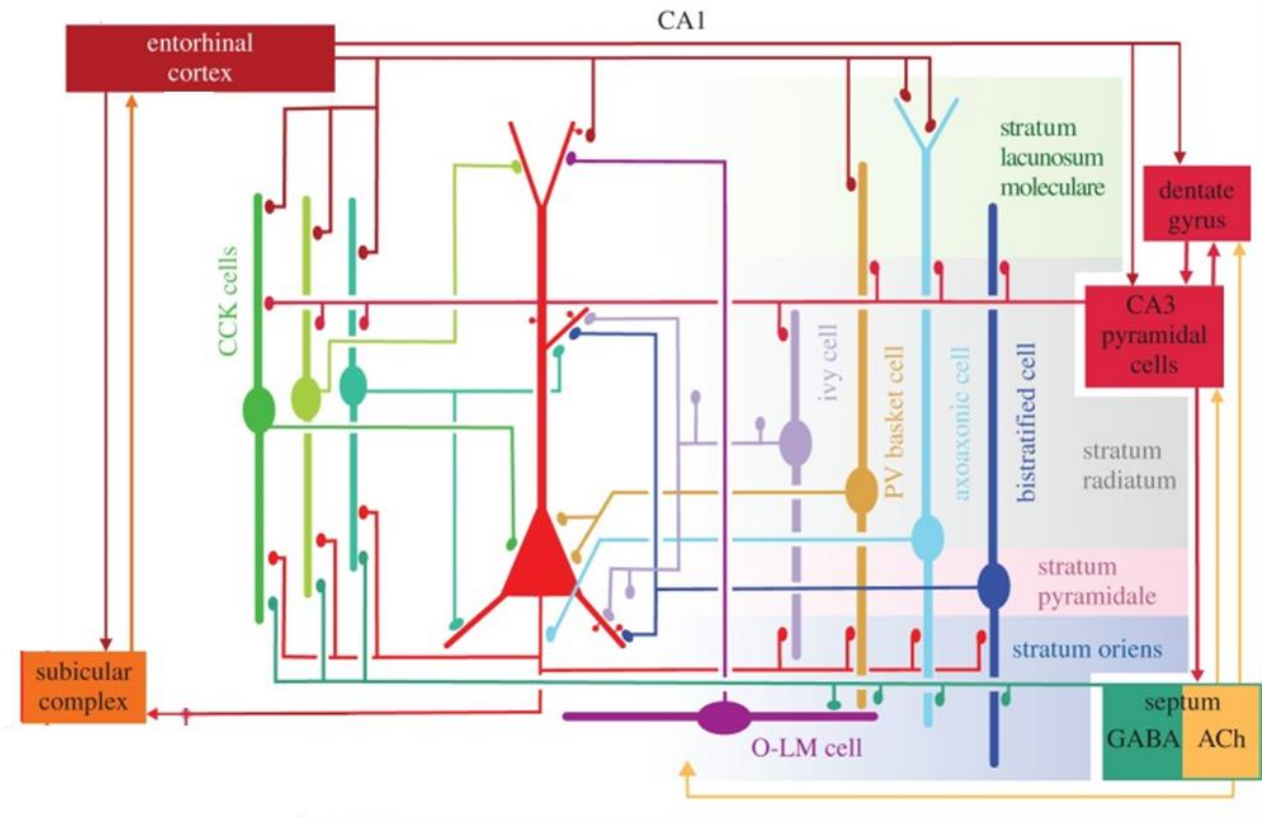


Figure I.10 : Le microcircuit de la région de CA1

Représentation schématique des connexions établies entre les cellules pyramidales et plusieurs classes de neurones GABAergiques (exprimant la parvalbumine (PV), y compris les cellules en panier, axo-axonique, bistratifiées, O-LM, et trois classes d'interneurones exprimant la CCK) formant le microcircuit de CA1. *D'après Klausberger et Somogyi, 2008*

c. Les différents circuits

Les neurones GABAergiques sont, comme les cellules pyramidales, également très importants pour l'organisation et la synchronisation des réseaux de CA1 (Klausberger and Somogyi, 2008).

Traditionnellement, il est admis que, dans les structures corticales, la connectivité GABAergique aurait plutôt un rôle modulateur, par opposition au rôle de transmission d'information qu'ont les neurones

glutamatergiques. En effet, les circuits GABAergiques sont vus comme ayant un rôle de frein à l'excitation neuronale afin de maintenir un équilibre plus ou moins statique du système. Il est commun de se référer au concept de balance Excitation/Inhibition (E/I). Cependant, comme nous allons le voir, l'inhibition peut affecter la fonction des réseaux différemment selon le type de connexion que possède le neurone GABAergique considéré. Dans cette section, je vais décrire les différents modes d'action de la transmission GABAergique au niveau des circuits.

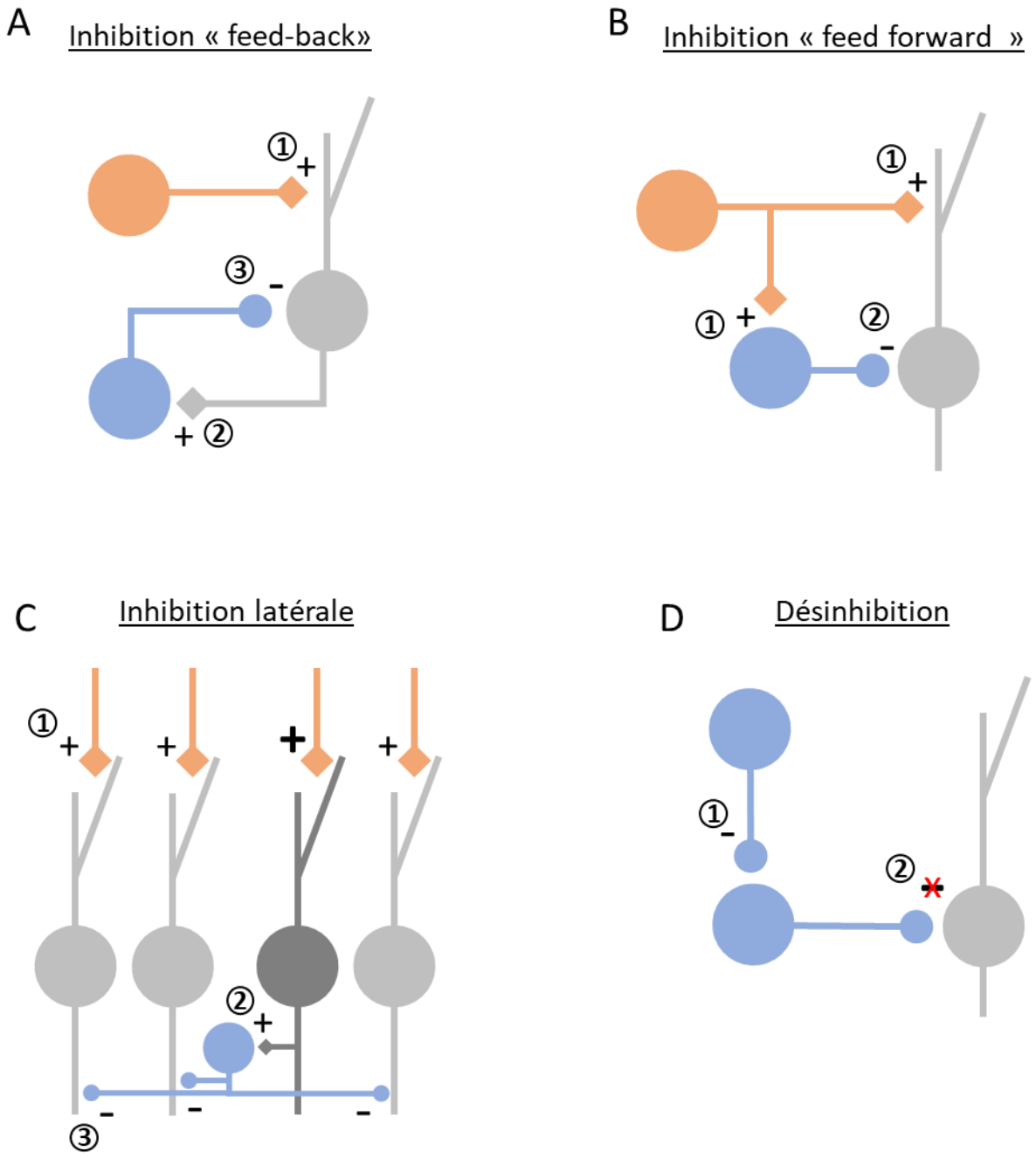


Figure I.11 : Computation des circuits GABAergiques

Représentations schématiques des types d'inhibition qu'exercent les neurones GABAergiques avec d'autres neurones au sein des réseaux neuronaux. En bleu sont représentés les neurones GABAergiques (inhibitrices (-)), en orange les cellules glutamatergiques (excitatrices (+)) et en gris les neurones "cibles". La numération correspond à l'ordre d'activation des terminaisons synaptiques.

Les circuits inhibiteurs récurrents, ou ''feed-back'', consistent en une boucle rétroactive négative. Ici, la décharge d'une cellule excitatrice augmente la décharge d'une cellule inhibitrice qui y est connectée (**Figure I.11A**). En retour cet interneurone, qui innerve la cellule excitatrice, causera une diminution de son activité (Andersen et al. 1964). On a donc une boucle en retour inhibiteur. Dans certains cas, ces réseaux sont susceptibles de réverbération, c'est-à-dire qu'ils génèrent ou amplifient des activités répétitives ou rythmiques (Kullmann, 2011). Il est admis que les interneurones O-LM et les neurones en panier puissent constituer de tels circuits avec les cellules pyramidales de l'hippocampe (Zeldenrust & Wadman, 2009, Kullmann, 2011). Cependant, la vitesse des courants synaptiques induits par ces deux types de cellules suggère que l'impact de leur inhibition rétroactive soit différent. Par exemple, les synapses inhibitrices des interneurones O-LM étant lentes, elles contribueraient plus à influencer les entrées rythmiques à basse fréquence que celles des cellules en panier, à conduction rapide, qui elles influenceraient l'intégration à haute fréquence des informations.

Les circuits inhibiteurs « feed-forward » consistent, quant à eux, en une entrée excitatrice qui connecte à la fois une cellule cible et une cellule inhibitrice qui elle-même innerve cette cible (**Figure I.11B**). Lorsque l'influx nerveux arrive, l'excitation de la cellule cible est couplée à une inhibition venant du neurone GABAergique (Alger and Nicoll, 1982). Etant donné que les neurones GABAergiques sont plus facilement excitables et ont des synapses excitatrices plus efficaces que les cellules pyramidales (Roux & Buzsaki., 2015), les deux entrées, excitatrices et inhibitrices arrivent en même temps sur la cible. Cette inhibition en « feed-forward » réduit le potentiel de membrane de la cellule cible et allant jusqu'à empêcher la décharge de cette cellule. Ce type d'inhibition joue donc un rôle fondamental dans la précision temporelle avec laquelle les entrées synaptiques sont intégrées par la cellule pyramidale, ce qui est primordial pour un traitement efficace de l'information. Dans la région de CA1, de nombreux neurones GABAergiques sont connectés par la même source excitatrice que celle dont ils affectent le domaine d'innervations sur les cellules pyramidales (Buzsaki, 1984). De plus, les interneurones de CA1 reçoivent à la fois des entrées de CA3, via les collatérales de Schaffer, et du EC (Kajiwara et al., 2008). Ces deux entrées entraînent une inhibition en « feed-forward » des cellules pyramidales de CA1. Des études ont montré que les interneurones exprimant le NPY (probablement les interneurones neurogliaformes) sont activés à la fois par les entrées de CA3 et du EC et qu'elles influencent, en retour la décharge des cellules pyramidales (Milstein et al. 2015). Il semble que les cellules en panier et en chandelier reçoivent aussi des entrées directes du EC et de CA3 (Klausberger et Somogyi, 2008). Elles seraient capables aussi d'une inhibition en « feed-forward » sur les cellules pyramidales de CA1 à la suite de leur activation via la voie temporo-ammonique.

Il existe également des circuits d'inhibition latérale dans lesquels un neurone excitateur recrute un neurone GABAergique qui inhibe ensuite l'activité de cellules excitatrices voisines (**Figure I.11C**). Ainsi, si, dans le cas d'une activation globale du réseau, une cellule reçoit une activation un peu plus forte que les autres, l'activité des autres cellules sera supprimée par l'inhibition latérale. On a donc une activation dite « winner take all » (le gagnant prend tout) où la cellule la plus activée du réseau va empêcher ses voisines de décharger. Ainsi, une faible différence entre les activations de cellules est donc amplifiée à la sortie des cellules.

De plus, lorsqu'un neurone GABAergique inhibe l'activité d'un autre neurone GABAergique, il se produit une désinhibition de la cible de ce dernier (**Figure I.11D**). Dans l'hippocampe, ce type de circuit peut être constitué par les interneurones ciblant les interneurones, ou bien par les interneurones à projection longue. C'est le cas, par exemple, des neurones GABAergiques PV du septum médian qui projettent sur les interneurones en panier de CA1. Leur activité rythmique peut ainsi désinhiber celle des cellules pyramidales de façon rythmique. Sachant que les cellules en panier peuvent innerver des milliers de cellules pyramidales, il est facile d'imaginer la forte influence qu'a une telle inhibition sur le réseau.

Comme nous venons de le voir, les afférences de multiples structures extra- et intra- hippocampiques projettent, de façon directe ou indirecte, vers les différentes couches de la région de CA1. La connectivité complexe entre les neurones excitateurs et inhibiteurs locaux, formant un microcircuit, confère à CA1 un rôle crucial dans le traitement et la consolidation de l'information.

Dans la partie suivante, nous allons voir l'importance de ces connexions dans la genèse et la modulation des rythmes oscillatoires ainsi que dans la coordination dynamique de l'activité neuronale de CA1 à l'origine de processus cognitifs complexes propres à l'hippocampe.

C- ORGANISATION FONCTIONNELLE DE LA REGION DE CA1

L'hippocampe est une structure corticale impliquée dans de nombreux processus cognitifs tels que la mémoire, l'apprentissage et la navigation spatiale. Pour cela, les informations doivent être encodées, puis stockées/consolidées à plus ou moins long terme afin d'être restituées de façon efficace aux moments voulus. Ces processus dépendent essentiellement de la synchronisation de l'activité neuronale au sein des réseaux de la région de CA1 sous-tendue par la connectivité complexe qui existe entre les neurones glutamatergiques et GABAergiques locaux mais aussi avec les structures extra- et intra-hippocampiques.

Nous verrons dans cette partie que les fonctions cognitives sont rendues possibles grâce aux différents rythmes présents dans CA1 permettant de coordonner dans le temps l'activité des neurones afin de traiter les informations reçues. Nous verrons que les neurones GABAergiques jouent un rôle important dans la synchronisation de l'activité de groupes de neurones pyramidaux ainsi que dans la genèse et la modulation de ces oscillations. Une altération de leur dynamique d'activité conduirait à des neuropathologies.

1) Les rythmes dans CA1

Le traitement de l'information par la région de CA1 dépend essentiellement de la synchronisation de l'activité neuronale donnant lieu à des oscillations. Ces oscillations sont caractérisées par des ondes d'activité électrique qui peuvent être observées par des enregistrements extracellulaires ou par des électroencéphalogrammes (EEG) (**Figure I.12A**). Les interactions entre les cellules pyramidales et les neurones GABAergiques, au sein de la formation hippocampique ou en relation avec d'autres structures cérébrales, sont un des mécanismes majeurs pour la genèse de ces oscillations.

Dans cette section, nous verrons qu'il existe différents rythmes oscillatoires, de fréquence et d'origine différentes, observés au sein des réseaux neuronaux de CA1, chacun associé à des états comportementaux spécifiques de l'animal. Nous verrons également que la synchronisation de l'activité neuronale est dépendante de la précision spatio-temporelle des interactions entre les neurones GABAergiques et les cellules pyramidales.

a. Rythme Thêta (θ)

Le rythme Thêta est une oscillation enregistrée à une fréquence de 5-12 Hz chez le rongeur. Ces oscillations sont observées lors des périodes d'exploration et de déplacement mais aussi pendant le sommeil paradoxal (rapid eye movement - REM) de l'animal (Vanderwolf 1969 ; Buzsaki 2002) (**Figure I.12B et C**).

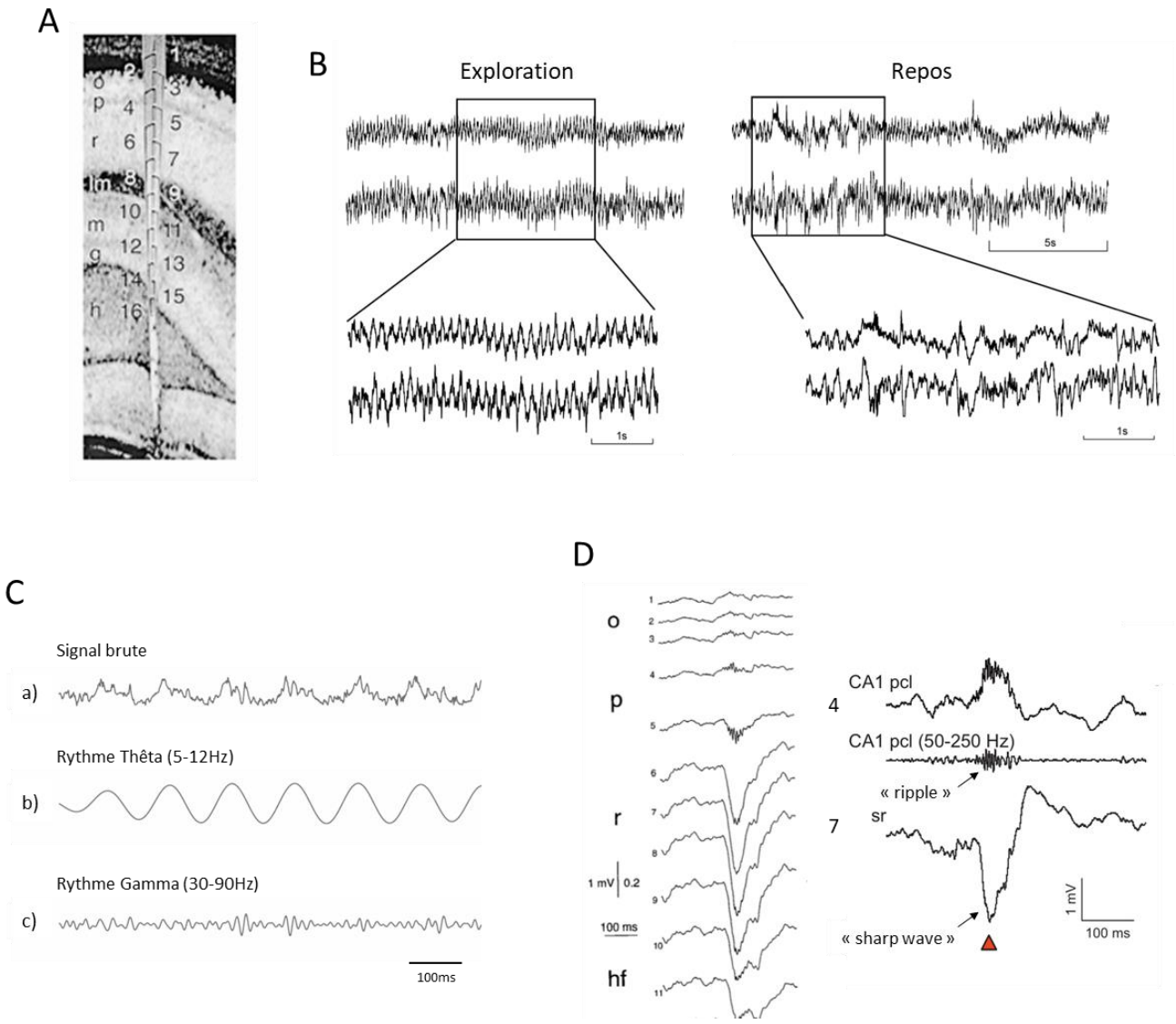


Figure I.12 : Les différents rythmes dans CA1

A. Représentation du positionnement d'une électrode multisites (16 sites séparés de 100 µm) le long des couches dans la région CA1 et du Gyrus Dente d'un hippocampe de souris. **B.** Enregistrements en potentiels de champ locaux intra-hippocampiques montrant le rythme Thêta (à gauche) associé à l'exploration de l'animal et les oscillations lentes et irrégulières ainsi que les SPW-R pendant le repos (à droite). **C.** Enregistrements extracellulaires chez la souris en mouvement. En (a) il s'agit du signal brut non filtré, en (b) et (c) il s'agit de l'oscillation (a) filtrée à différentes fréquences : à 4– 12 Hz (b) on obtient du Thêta et à 30– 90 Hz (c) on obtient du Gamma. **D.** À droite, une SPW-R enregistrée à différentes profondeurs de CA1. A gauche, agrandissement des oscillations de type « Sharp Wave » enregistrées dans le stratum radiatum (par le canal 7 ; trace du bas) et associées aux « Ripples » enregistrés simultanément dans le stratum pyramidale (par le canal 4 ; trace du haut). (Au milieu) le signal enregistré dans le stratum pyramidale est filtré (50-250 Hz) de sorte à visualiser les « Ripples ». *o : stratum oriens ; p ou pcl : stratum pyramidale ; r ou sr : stratum radiatum ; hf : Hile. D'après Allen and Monyer, 2015.*

Dans l'hippocampe, le rythme Thêta est généré par la décharge coordonnée des entrées du EC et de CA3 mais également par les afférences provenant du septum médian et de la bande diagonale de Broca (MSDB) qui innervent les dendrites distales des cellules pyramidales de CA1 situées dans la SLM (Vertes et al. 2004; Buzsaki, 2002). La succession répétitive de dépolarisation (creux des oscillations) et d'hyperpolarisation (pics des oscillations) des membranes des cellules pyramidales de CA1 est à l'origine de ces oscillations observables sur le LFP obtenu lors d'enregistrements extracellulaires (Buszaki 2002). Ainsi, ces entrées sont considérées comme les générateurs du Thêta tandis que l'influence du MSDB comme le générateur du rythme ("pace maker").

L'activité des cellules pyramidales, mais aussi celle des neurones GABAergiques, est fortement modulée par le rythme Thêta puisque chaque sous-type cellulaire décharge à une phase du Thêta qui lui est propre (Klausberger and Somogyi 2008). En effet, les neurones pyramidaux déchargent majoritairement juste après le creux de l'oscillation Thêta (Klausberger, 2009) tandis que les différents sous-types de neurones GABAergiques déchargent à des phases différentes. Les neurones GABAergiques à innervation péri-somatique, comme les neurones en panier PV positifs, et ceux à innervation péri-axonique, comme les neurones chandeliers, déchargent préférentiellement pendant le pic de l'oscillation Thêta. Quant aux neurones GABAergiques à innervation péri-dendritique, comme les neurones bistratifiés ou les neurones O-LM, ils déchargent principalement pendant le creux de l'oscillation Thêta (Klausberger, 2009; Somogyi et al., 2013). De plus, les neurones O-LM qui contactent l'arborisation dendritique distale des cellules pyramidales dans le SLM sont actifs juste avant les neurones pyramidaux aux creux du Thêta. Nous le reverrons plus loin dans ce chapitre, chaque type de neurone agit donc sur un compartiment particulier de la cellule pyramidale à une phase spécifique du rythme thêta. Selon le type cellulaire, cette action rythmique consiste soit à filtrer les entrées dendritiques des cellules pyramidales, soit à contrôler, par action péri-somatique, à quel moment la cellule va décharger.

Les afférences provenant des cellules du septum médian, générateur du rythme thêta, inhiberaient, quant à elles, les réseaux de neurones GABAergiques de CA1. Leur activation rythmique lors du thêta permettrait une levée rythmique d'inhibition des cellules pyramidales (Toth, Freund, & Miles, 1997).

Pendant les processus cognitifs, les activités rythmiques entre les différentes régions du cerveau sont coordonnées et synchronisées grâce aux connexions établies entre les neurones GABAergiques de CA1 à projection à longue distance avec d'autres structures, tels que le septum médian (Jinno et al., 2007; Katona et al., 2017). Ainsi, la genèse et la coordination du rythme Thêta dans CA1 dépendent de l'activation rythmique et coordonnée des entrées entorhinales et de CA3, de la modulation dans le temps de ces entrées par plusieurs types spécifiques d'interneurones et des propriétés intrinsèques des cellules hippocampiques (Kamondi et al., 1998; Buzsaki et al., 2002; Amilhon et al., 2015; Huh et al., 2016; Fernandez-Ruiz et al., 2017; Stark et al., 2013).

b. Rythme Gamma (γ)

Le rythme Gamma est une oscillation enregistrée à une fréquence de 30-90 Hz qui est présente dans pratiquement toutes les aires corticales, dont l'hippocampe et le néocortex. Comme pour le rythme Thêta, il est associé aux comportements d'exploration de l'animal et joue un rôle fondamental dans le traitement de l'information puisqu'il est associé à de nombreuses fonctions cognitives dans l'hippocampe comme l'attention et la mémoire épisodique (Buzsáki and Wang, 2012 ; Bragin et al. 1995; Montgomery and Buzsaki 2007; Llinas and Ribary 1993; Canolty et al. 2006) (**Figure I.12B et C**).

Dans l'hippocampe, les entrées provenant du EC et de CA3 génèrent les oscillations Gamma à des rythmes différents : un Gamma rapide (60-90Hz) pour les entrées entorhinales dans la SLM et un Gamma lent (30-60Hz) pour les entrées de CA3 dans le stratum radiatum (Colgin et al. 2009, Fries 2009). Il a été proposé que ces deux rythmes Gamma permettent d'amener différents types d'informations vers CA1 où ils sont intégrés et utilisés pour soutenir la performance en mémoire épisodique (Bieri et al., 2014; Colgin, 2015). Il est donc possible que le rôle de comparateur de CA1 soit dynamique, favorisant selon la phase du thêta soit les entrées directes du CE via le gamma rapide, soit celles de CA3 via le gamma lent. De plus, les oscillations Gamma peuvent également être générées de façon endogène dans l'hippocampe et le néocortex où les neurones GABAergiques semblent jouer un rôle essentiel dans cette génération (Whittington et al., 1995; Bartos et al., 2007).

Les rythmes Gamma et Thêta sont étroitement liés étant donné que chacun des différents rythmes Gamma arrivent à une phase différente des oscillations Thêta et l'amplitude des oscillations Gamma et Thêta co-varient

(lorsque l'amplitude du Thêta est forte, celle du Gamma l'est aussi) (Bragin et al. 1995 ; Buzsáki and Wang, 2012; Colgin and Moser, 2010).

Comme pour le rythme Thêta, la décharge des cellules pyramidales et des neurones GABAergiques est aussi fortement influencée par le rythme Gamma (Bragin et al., 1995). En effet, des expériences in vivo ont montré que certains neurones GABAergiques déchargent en fonction de la phase du rythme Gamma chez les rongeurs comme c'est le cas pour les neurones bistratifiés (Tukker et al., 2007).

c. SharpWave Ripple

Les « Sharp Waves » sont des oscillations lentes (0.1-3 Hz, potentiels synaptiques de large amplitude et d'une durée allant de 50 à 100ms) localisées dans le stratum radiatum. La majorité du temps, elles sont associées aux « Ripples », oscillations très rapides (100-300 Hz) que l'on enregistre uniquement dans le stratum pyramidale (Buzsáki, 2015; Girardeau and Zugaro, 2011). Ces deux phénomènes sont considérés comme une seule entité appelée « Sharp Wave Ripples » (SPW-R) (**Figure I.12D**).

Les SPW-R sont des activités propres à la formation hippocampique que l'on observe durant les périodes d'immobilité, de sommeil lent et de comportements automatiques comme le toilettage ou la prise de nourriture (Suzuki and Smith, 1988; Buzsaki et al., 1992; Wilson & McNaughton, 1994). Les « Sharp Wave » sont induites par une dépolarisation massive des dendrites apicales des cellules pyramidales de CA1 par les afférences excitatrices de CA3 (Ylinen et al., 1995), tandis que les « Ripples » sont générées localement dans CA1 grâce à l'activation synchrone et coordonnée des cellules pyramidales et des interneurones locaux (Stark et al., 2014; Foffani et al., 2007 ; Buzsáki, 2015; Oliva et al., 2016).

Pendant les SPW-Rs, les cellules pyramidales s'activent de façon cohérente, reproduisant les expériences passées de l'animal mais aussi des trajectoires possibles, ou planifiées (Foster and Wilson 2006; Diba and Buzsáki 2007; Gupta et al. 2010; Jadhav et al. 2012; Buzsáki 2015). Ainsi, ces oscillations seraient impliquées dans la mémorisation (réactivation puis consolidation d'un événement). Lors du sommeil, les SPW-R joueraient un rôle primordial dans la consolidation mnésique (Girardeau et al.2009 , Jadhav et al., 2012 , Van de Ven et al., 2016).

d. Rôle des neurones GABAergiques dans la modulation de l'activité neuronale lors des rythmes de CA1

La synchronisation de l'activité de la population neuronale de CA1 est dépendante de la précision spatio-temporelle des interactions entre les neurones GABAergiques et les cellules pyramidales. Ces interactions sont définies par la localisation des connexions sur l'architecture (dendrite, soma, axone) des cellules pyramidales qu'établissent les neurones GABAergiques en fonction de leur type et de la précision temporelle avec laquelle les neurones GABAergiques déchargent en relation avec la phase et le type d'oscillation en cours dans le réseau.

En effet, il a été montré que selon leur sous-type, les neurones GABAergiques déchargent différemment par rapport aux oscillations Thêta, gamma et aux ripples (Klausberger and Somogyi, 2008 ; Klausberger et al., 2003, 2005) (**Figure I.13**). Par exemple, les CCKBC et les PVBC sont activées à des phases différentes des oscillations Thêta : les CCKBCs déchargent juste avant le pic de synchronie, alors que les PVBCs sont actives lors de la phase descendante de ce même pic (Klausberger and Somogyi, 2008 ; Klausberger et al., 2003, 2005). Les PPAs, quant à elles, déchargent en même temps que les PVBCs, c'est-à-dire durant la phase descendante du pic de synchronie (**Figure I.13A**).

De plus, le même domaine sur une cellule pyramidale (dendritique ou somatique) reçoit des entrées synaptiques des différentes cellules avec un timing différent. Chaque interneurone joue donc un rôle bien précis, à la fois temporellement et spatialement dans la façon dont les entrées excitatrices vont pouvoir influencer la cellule pyramidale. En effet, des études ont montré que les cellules pyramidales de CA1 déchargent avec un délai trop long par rapport aux cellules du MEC (couche III) pour s'expliquer par un simple délai synaptique (Mitsuzeki et al. 2009). Ce délai est causé par la décharge des interneurones (notamment les cellules en panier) qui empêchent les cellules pyramidales de décharger lorsqu'elles sont le plus excitées. De plus, les entrées entorhinales sont aussi inhibées par les interneurones (OLM) à une certaine phase du Thêta, favorisant les entrées de CA3.

Pendant les « Ripples », les cellules pyramidales augmentent leur taux de décharge alors que seuls certains neurones GABAergiques sont actifs (Somogyi et al., 2013). En effet les neurones O-LM, ceux associés à la voie perforante CCK+ et ceux du radiatum rétro-hippocampiques réduisent tous leur taux de décharge pendant les SWRs. En revanche, les neurones en panier PV+, les bistratifiés ainsi que les neurones GABAergiques à projection longue distance (tels que les neurones trilaminaires, les neurones à rétroprojection, les neurones oriens rétro hippocampiques, et les neurones à doubles projections) augmentent fortement leur taux de décharge pendant les « Ripples » (Katona et al., 2017; Klausberger, 2009) (**Figure I.13B**).

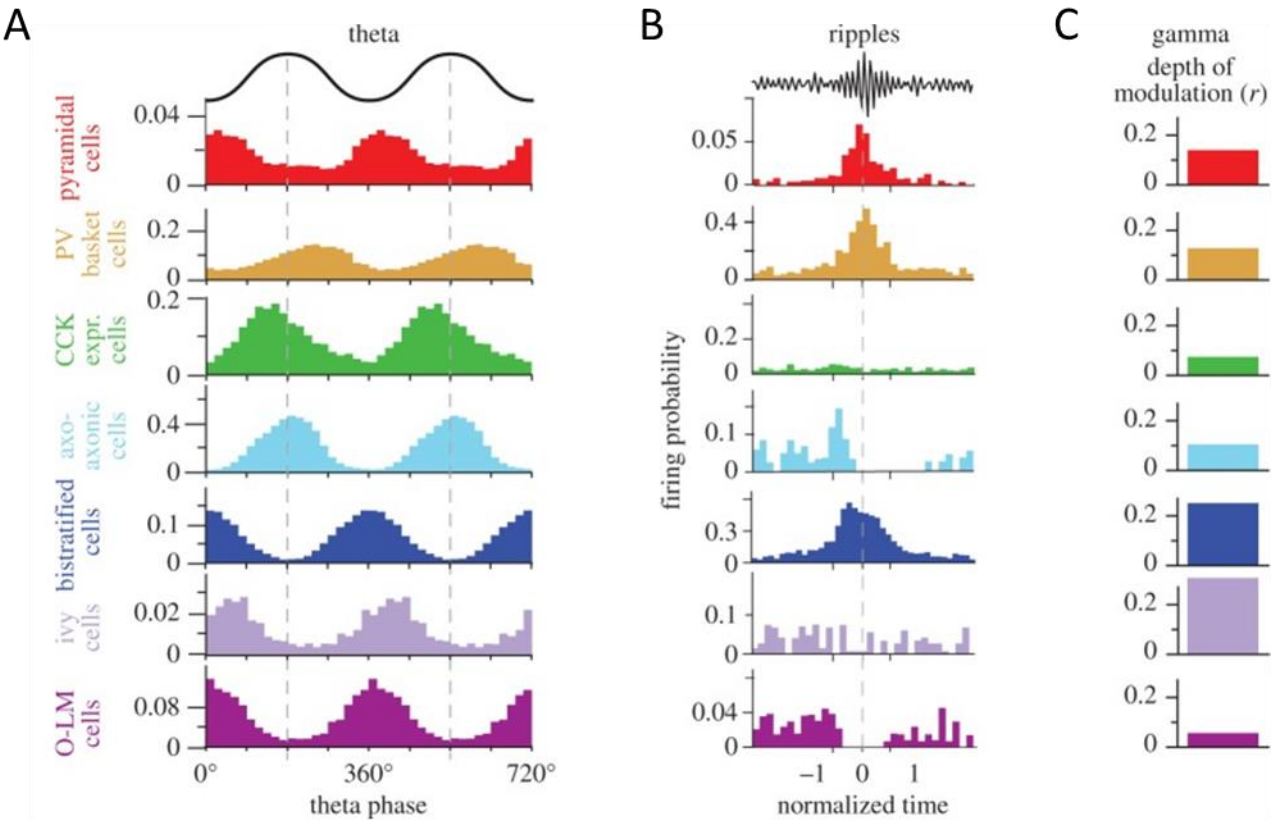


Figure I.13 : Modulation des neurones GABAergiques par les oscillations hippocampiques

A. Histogrammes montrant les patrons d'activité des neurones GABAergiques et des cellules pyramidales par rapport aux oscillations Thêta, aux ripples (**B**) et (**C**) Gamma. Le signal lors de ces oscillations est représenté au-dessus de chaque groupe d'histogramme (traces en noir). *D'après Klausberger et Somogyi, 2008.*

Ainsi, les neurones GABAergiques ont un rôle important dans la synchronisation de l'activité des neurones pyramidaux et donnent une précision temporelle au codage de l'information. Nous verrons plus loin que certaines études suggèrent que cette organisation extrêmement précise de l'activité des neurones GABAergiques et des entrées synaptiques de CA1 serait altérée dans l'épilepsie, expliquant les troubles cognitifs qui y sont associés (Klausberger et al. 2004; Somogyi and Klausberger 2005 ; Klausberger and Somogyi 2008).

2) Les patrons d'activité sous-jacents aux fonctions de l'hippocampe

Comme nous venons de le voir, l'activité neuronale de CA1 est synchronisée selon des rythmes particuliers dépendant du comportement de l'animal. Cette activation coordonnée des neurones à des moments précis dans le temps est essentielle pour les processus cognitifs sous-tendus par l'hippocampe.

Pour illustrer ce phénomène, nous allons voir, ici, les patrons d'activité qu'adoptent les cellules de CA1 pour encoder l'information provenant de l'environnement permettant ainsi la navigation spatiale de l'animal. Nous verrons également comment ces informations sont consolidées afin de pouvoir être restituées en temps voulu à plus ou moins long terme.

a. Encodage de la représentation de l'espace

La majorité des animaux, y compris l'homme, se déplacent dans leur environnement dans le but de se rendre dans différents endroits dont l'importance est capitale (gîte, source de nourriture etc..). Pour cela, chaque espèce dispose d'un répertoire plus ou moins étendu de comportements de navigation, chacun impliquant des processus de traitement de l'information multiples et variés. Une des stratégies employées par de nombreux mammifères (dont les rongeurs et les primates) est la navigation basée sur la représentation spatiale.

En 1948, Tolman (Tolman, 1948 ; Tollman & Honzic, 1930; Tolman et al., 1946) présenta de nombreux arguments expérimentaux soutenant l'existence d'un type de représentations mentales permettant la navigation par l'utilisation de «cartes cognitives» qui consiste à se représenter et mémoriser l'arrangement spatial des indices présents dans l'environnement, à la fois les uns par rapport aux autres mais aussi par rapport à une direction générale, comme s'ils étaient placés sur une carte. Ici, les indices sont représentés dans un cadre de référence centré sur l'environnement basé sur des repères externes à l'individu, un cadre dit "allocentré", mais il faut garder à l'esprit qu'ils peuvent également être centré sur l'individu, un cadre dit ''égocentré''. De nombreuses études ont permis de mettre en évidence le rôle important de la formation hippocampique dans l'établissement et l'utilisation de représentations spatiales. Parmi ces études se trouvent celles de O'Keefe (O'Keefe, 1976 ; O'Keefe and Dostrovsky 1971) dans lesquels il a montré que des lésions de l'hippocampe affectent fortement les tâches de navigation, notamment lorsqu'elles reposent sur l'utilisation de représentations allocentrées (basées sur les indices présents dans l'environnement et non centrées sur l'individu).

i) Les cellules de lieu

L'existence des cellules de lieu est l'évidence la plus forte en faveur de l'utilisation de représentations spatiales pour la navigation. Découvertes chez le rat en 1971 par O'Keefe et Dostrovsky, les cellules de lieu (« place cells » en anglais) sont des cellules pyramidales hippocampiques localisées dans les couches cellulaires CA1 et CA3.

Lorsque l'on enregistre l'activité unitaire de cellules de l'hippocampe dorsal de rats lors d'une tâche d'exploration spatiale, on observe que certaines cellules sont actives lorsque l'animal se trouve dans un endroit particulier de l'environnement, appelée « champ d'activité » de la cellule et qu'elles sont pratiquement silencieuses ailleurs (**Figure I.14A**) (O' Keefe and Dostrovsky, 1971). Ainsi, l'ensemble de l'environnement est représenté par l'activité collective de la population de cellules de lieu (O'Keefe, 1976). Chaque cellule possède un champ d'activité de taille, forme et position différente des autres. On estime que la totalité de l'environnement est couverte par les champs d'activité de l'ensemble des cellules de lieu hippocampiques (Muller et al., 1987; Wilson & McNaughton, 1993). Lorsqu'un rat se déplace dans son environnement et traverse successivement plusieurs champs d'activité, les cellules de lieu correspondantes sont alors activées en séquence, dans un ordre correspondant à la trajectoire du rat (Colgin, 2016; O'Keefe, 1976). Ainsi, il est possible de retracer sa trajectoire en se fiant à la séquence d'activation des cellules de lieu (Wilson and McNaughton, 1993; Colgin, 2016).

Selon leur localisation dans l'axe radial, les cellules de lieu présentent des différences fonctionnelles en fonction des informations présentes dans l'environnement. En effet, les cellules de lieu des couches profondes du stratum pyramidale sont plus actives et plus susceptibles de former des « champs d'activité » comparées aux cellules des couches superficielles. Ces cellules sont plus actives dans les environnements riches en indices à l'aide d'un code de phase piloté par des entrées entorhinales. Les cellules de lieu des couches superficielles, quant à elles, sont plus actives dans les environnements pauvres en indices et utilisent préférentiellement un code de taux de décharge piloté par des entrées intra-hippocampiques (Mizuseki et al., 2011 ; Danielson et al., 2016). Ces différences de fonctionnalités s'expliquent par les différentes afférences en provenance du MEC ou du LEC qu'elles reçoivent comme on l'a vu précédemment.

L'organisation spatiale des champs d'activité d'une population de cellules de lieu est stable dans un environnement donné. En effet, une fois la séquence d'activité mise en place dans un environnement, les patterns d'activité des cellules de lieu demeurent globalement inchangés à chaque nouvelle réintroduction de

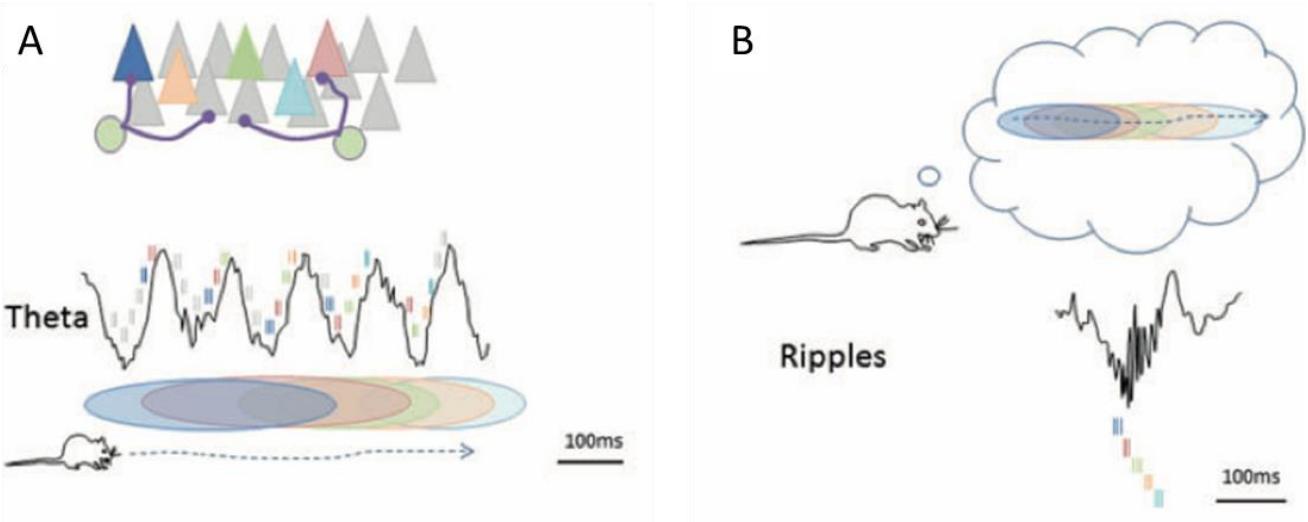


Figure I.14 : Modes de traitement de l'information par les cellules de lieu.

A. Le mode Thêta/Gamma. L'emplacement de chaque cellule (triangles de couleur) est représenté au sein de la couche pyramidale (haut). Lors de déplacements, au fur et à mesure que l'animal traverse les champs d'activité des cellules de lieu (ellipses de couleur correspondante), chaque cellule décharge (une barre verticale=1pa) à une phase de plus en plus précoce par rapport au rythme θ (tracé en noir). Ce phénomène est appelé "précession de phase". A chaque cycle, les cellules s'activent dans l'ordre correspondant à la trajectoire en cours de l'animal. **B.** Le mode SPW-R. Lors du repos, l'hippocampe génère des SPWs lors desquelles les cellules de lieu s'activent dans l'ordre de trajectoires passées, futures ou planifiées de l'animal. *D'après Lenck-Santini, 2017.*

l'animal dans ce même environnement et peuvent le rester pendant plusieurs semaines voire plusieurs mois après la première exposition (Thompson & Best, 1990). Le passage d'un environnement familier à un nouveau induit une modification complète de l'activité de la plupart des cellules (Muller & Kubie, 1987 ; Muller et al., 1987; Sharp, 1997, 1999). On appelle ce phénomène de recodage ou « remapping ».

En plus des cellules de lieu, il existe également d'autres cellules spécialisées dans un codage de type spatial. Il s'agit des cellules en grille situées dans le MEC (Hafting et al. 2005 ; Fyhn et al., 2004) ; des cellules codant pour la direction générale de la tête de l'animal dans l'environnement dans le spara-subiculum dorsal ou le thalamus dorso-médian (Taube, Muller, and Ranck 1990 ; Muller et al. 1996) ou de la distance par rapport aux obstacles tels que les murs ou bordures dans le subiculum (Lever et al., 2009). Les cellules hippocampiques peuvent aussi être modulées par les aspects temporels des tâches expérimentales réalisées (Eichenbaum, 2014) ou la vitesse de l'animal (Gois Tort, 2018). De plus, les cellules de lieu peuvent, lorsque l'animal se déplace en l'absence de repères externes, coder uniquement pour la distance parcourue par l'animal (Villette et al., 2015).

ii) Les rythmes hippocampiques et leur rôle dans le codage de l'espace

L'activité des cellules de lieu est fortement influencée par le rythme Thêta lors de l'exploration d'un environnement. Lorsqu'un animal se déplace, par exemple, d'un point A à un point C, si à un instant ''t'' il se trouve à une position B (entre A et C), les cellules de lieu déchargent selon différentes phases du Thêta : la cellule de lieu correspondant à la position actuelle (B) décharge au creux du Thêta, celle de la position passée (A) décharge pendant la phase descendante, et celle de la position future (C) pendant la phase ascendante. Cette corrélation reflète un codage spatio-temporel de l'information.

Une caractéristique importante de cette activité est la précession de phase. Lorsque l'animal traverse leur champ d'activité, les cellules de lieu déchargent des bouffées de potentiels d'action à un rythme légèrement plus rapide que celui du Thêta enregistré sur le LFP. Ainsi, au fur et à mesure du déplacement de l'animal dans les champs d'activité de ces cellules, à chaque cycle θ, la cellule décharge à une phase de plus en plus précoce par rapport au cycle θ précédant (**Figure I.14A**) (O'Keefe & Recce, 1993). La précession de phase est en partie causée par l'influence combinée des entrées entorhinales et de CA3 sur CA1, mais aussi des actions inhibitrices des interneurones, qui agissent à différentes phases du rythme thêta (Fernández-Ruiz et al. 2017). Ce phénomène est crucial pour permettre la formation de séquences d'activations neuronales organisées temporellement dans le cycle Théta (Skaggs et al. 1996; Gupta et al. 2012). En effet, la précession de phase permet de compresser dans le temps l'épisode en cours vécu par l'animal, en organisant les décharges neuronales selon les événements sensori-moteurs (spatiaux et autres) que l'animal perçoit et traverse (Drieu and Zugaro 2019). Ainsi, l'activité des cellules de lieu dont le champ se recouvre est compressée en séquences lors de chaque cycle Thêta, qui reproduisent la trajectoire en cours de l'animal, tout en balayant l'environnement devant lui (Skaggs et al., 1996; Dragoi et al. 2003; Gupta et al. 2012). Parfois, ces trajectoires compressées peuvent balayer au-delà de la position actuelle de l'animal, révélant des trajectoires possibles, planifiées mais non encore exécutées par l'animal (Wikenheiser & Redish, 2015; Kay et al., 2020). Cela pourrait indiquer une forme de prévision ou de planification des déplacements.

iii) Rôle des neurones GABAergiques dans les rythmes et la navigation spatiale

L'interaction entre les neurones GABAergiques et les cellules pyramidales est primordiale pour la genèse et le maintien des oscillations dans CA1 mais aussi pour la décharge des cellules de lieu. En effet, la perturbation des neurones 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), tandis que la perturbation des neurones qui expriment

la SST augmente le taux de décharge des cellules de lieu mais n'altère pas leur probabilité de décharge dans la phase du cycle Thêta (Royer et al., 2012). L'inhibition péri-somatique et l'inhibition dendritique ont donc des rôles distincts dans la décharge des cellules de lieu lors d'une tâche d'exploration.

b. Processus de consolidation de l'information

Une des caractéristiques des représentations spatiales est qu'elles subsistent même en l'absence de ce à quoi elles se rapportent. Ainsi, un animal est capable de se rendre en un lieu, même si celui-ci n'est pas perceptible depuis son point de départ (Tolman et al., 1946; Morris, 1981). Pour cela il est donc nécessaire que, après avoir été encodée, l'information soit consolidée par les réseaux locaux de CA1, c'est-à-dire que l'information passe de la mémoire à court terme à la mémoire à long terme.

Donald Hebb a été l'un des premiers à proposer que la capacité du cerveau à générer des pensées cohérentes repose sur l'orchestration spatio-temporelle de l'activité neuronale (Hebb, 1949). Il a introduit le concept d'« assemblées de neurones », des groupes fortement interconnectés de neurones actifs représentant des entités cognitives distinctes. En raison de leur interconnectivité élevée, la stimulation d'un nombre suffisant de neurones peut activer l'ensemble complet (Buzsáki, 2010). L'enchaînement systématique de telles assemblées en séquences d'activation neuronale fournirait la base à des processus cognitifs, tels que le rappel de mémoire, la pensée, la planification et la prise de décision.

Dans la région CA1 de l'hippocampe, ces assemblées s'organisent en séquences d'activation neuronale qui se produisent à différentes résolutions temporelles, telles que celles observées à l'échelle comportementale (par exemple, les cellules de lieu) ou compressées dans des périodes d'oscillations rapides, les « Sharp Wave Ripples » (SWRs) (Buzsáki, 2015). Les SWRs sont observées principalement lors des périodes d'immobilité ou de sommeil lent. Curieusement, les SWRs induisent la réactivation de la séquence des cellules de lieu activées lors des explorations passées, soit de façon rétrospective (représentant des trajectoires déjà parcourues), soit prospectivement, comme si l'animal planifiait ses futures trajectoires (Diba & Buzsaki, 2007; Pfeiffer & Foster, 2013 ; Foster & Wilson, 2006). Cette réactivation peut également être associée à des expériences vécues en dehors du contexte actuel ou à des trajectoires possibles mais jamais encore explorées, ce qui pourrait jouer un rôle dans la consolidation mnésique et la planification de comportements futurs (Karlsoon & Frank, 2009; Gupta et al., 2010 ; Pfeiffer & Foster., 2013) (**Figure I.14B**).

Plusieurs études montrent que l'interruption des SWRs après un apprentissage spatial, diminue les performances en mémoire spatiale et en mémoire de travail (Girardeau et al., 2009 ; Jadhav et al., 2012) et provoque des déficits de codage des cellules de lieu. Ainsi la réactivation observée lors des SWRs serait essentielle pour la consolidation des cartes cognitives de l'environnement et jouerait un rôle primordial dans la consolidation mnésique, tant pendant le sommeil (en renforçant la mémoire spatiale) que pendant l'éveil (en améliorant la mémoire de travail) (Buzsáki, 2015; Colgin, 2016 ; Karlsoon & Frank, 2009; Gupta et al., 2010 ; Pfeiffer & Foster., 2013).

S'ajoutant au rôle dans la mémoire, il semble aussi que les séquences associées aux SWRs aient un rôle dans la mise en place des cellules de lieu précédant l'exploration d'un nouvel environnement. En effet, Dragoi & Tonegawa (2011) ont montré que les séquences de cellules de lieu spécifiques à l'exploration d'un environnement nouveau pouvaient être observées avant même que l'animal n'entre dans l'environnement pour la première fois. Ces séquences seraient donc préconfigurées. Elles influenceraient l'ordre d'activation futur des cellules de lieu dans un environnement donné sans nécessiter l'exploration préalable de celui-ci. Nous émettons l'hypothèse que l'ordre de ces séquences est défini dans la structure même des circuits hippocampiques et que cette structure se met en place pendant la période néonatale.

3) Dysfonctionnement de l'hippocampe et pathologies associées

Comme nous venons de le voir, les propriétés mnésiques des réseaux neuronaux reposent sur deux aspects : la plasticité de la transmission synaptique (via la potentialisation à long terme par exemple) et la structure des réseaux neuronaux qui repose sur la présence de boucles excitatrices ou inhibitrices. Dans les cas neuro-pathologiques, ces bases neuronales fondamentales sont affectées. Il est donc possible d'envisager que, dans le cadre d'une pathologie neurologique, une altération de la structure ou de la plasticité de ces réseaux empêcherait le système de coder, stocker, ou de rappeler les informations, ce qui entraînerait un déficit fonctionnel important. Parmi les altérations potentielles, les déficits de la migration, la transmission ou la fonction GABAergique sont observés dans un grand nombre de syndromes, notamment ceux du neurodéveloppement et de l'épilepsie. Etant donné le rôle fondamental que joue l'activité GABAergique dans la coordination de la dynamique de l'activité neuronale et les oscillations ainsi que le rôle de ces oscillations dans la performance cognitive, P-P. Lenck-Santini et L. Meñendez de la Prida proposent le concept de ''rythmopathie'', par lequel une altération des rythmes neuronaux serait directement responsable des troubles cognitifs associés à l'épilepsie.

En effet, des altérations des rythmes oscillatoires de type Thêta, Gamma et des SPW-R sont observées chez les patients épileptiques (Dugladze et al. 2007; Lopez-Pigozzi et al. 2016; Shuman et al. 2020 ; Lenck-Santini & Holmes, 2008 ; Sederberg et al., 2003, 2007; Lega et al., 2015 ; Foffani et al. 2007; Marchionni et al. 2019). Ces altérations des rythmes sont corrélées à une diminution de la performance des modèles animaux ainsi que des patients dans diverses tâches comportementales liées à la mémoire spatiale, épisodique et de travail, parfois indépendamment des crises d'épilepsie (Dugladze et al. 2007 ; Chauvière et al., 2009; Inostroza et al., 2013; Barry et al., 2016; Richard et al., 2013 ; Lopez-Pigozzi et al. 2016).

Comme dit plus tôt, ces rythmopathies observées chez les sujets épileptiques seraient dues à un déficit GABAergique. En effet, la perte des neurones GABAergiques inhibiteurs observée dans les modèles d'épilepsie du lobe temporal (TLE), considérée comme un syndrome post-lésionnel, est particulièrement problématique puisque cela entraîne une perte de l'inhibition sur le réseau (Cossart et al. 2001). Ainsi, les altérations GABAergiques observées dans la TLE pourraient non seulement contribuer à l'hyperexcitabilité du système mais aussi à la perte du contrôle dynamique de l'activité du réseau (Dugladze et al. 2007; Lopez-Pigozzi et al. 2016; Shuman et al. 2020 ; Lenck-Santini & Holmes, 2008). En plus de générer des crises et des pointes intérictales, il est proposé que cette perte de contrôle dynamique soit aussi responsable des déficits cognitifs associés à la TLE (Lenck-Santini 2021; Lenck-Santini and Sakkaki 2021).

Des hypothèses récentes placent les altérations de la dynamique de décharge des neurones GABAergiques au centre de la physiopathologie des troubles neuro-développementaux sévères (Nomura, 2021; Rubenstein & Merzenich, 2003; Tempio et al., 2023; Yu et al., 2006). En effet, un excès de chlore ou un retard dans la transition GABA dépolarisant hyperpolarisant est observé dans plusieurs modèles de syndromes neurologiques développementaux comme l'autisme (Tyzio et al. 2014) ou le syndrome de Down (Deidda, Parrini, et al. 2015). Une conséquence de cette théorie d'un rôle majeur du GABA dépolarisant pendant le développement est que, toute anomalie de cette homéostasie précoce du chlore, ou de sa dynamique en fonction de l'âge, aurait des conséquences catastrophiques sur la mise en place des réseaux, et donc sur leur fonction future. Cependant, l'action du GABA pendant le développement et les mécanismes sous-jacents restent encore à élucider. Le développement des circuits hippocampiques et de l'activité associée ont donc un rôle déterminant sur l'organisation morpho-fonctionnelle chez l'animal adulte. La connectivité et la dynamique de l'hippocampe à l'âge adulte pourraient être, en partie, préconfigurées pendant le développement.

Dans la prochaine partie de cette introduction, nous verrons comment les réseaux neuronaux de la région de CA1 se mettent en place au cours du développement ainsi que l'importance de l'activité GABAergique dans ces processus développementaux.

II Développement des circuits neuronaux de CA1

Comme nous venons de le voir dans le chapitre précédent, les réseaux neuronaux de la région CA1 chez l'adulte s'organisent en sous-unités fonctionnelles qui sont à la base de fonctions cognitives élaborées. Pour en arriver à une telle organisation de réseaux, de longs et complexes processus de maturation sont nécessaires.

Les réseaux neuronaux de CA1 commencent à se former dès les premiers stades du développement embryonnaire et continuent de maturer jusqu'à l'âge adulte. Pendant cette période, les réseaux se mettent en place à la fois sur le plan anatomique et fonctionnel, ces deux dimensions étant étroitement liées et interdépendantes. Pendant longtemps, les processus développementaux sous-tendant la construction des structures cérébrales et de leurs réseaux ont été considérés comme essentiellement guidés par des programmes génétiques. Ces processus étaient perçus comme indépendants de l'activité électrique qui n'était nécessaire qu'à des stades ultérieurs pour le raffinement des connexions. Cependant, des études récentes ont montré que les activités neuronales néonatales et postnatales jouent un rôle essentiel dans les premières étapes du développement du système nerveux, dont la migration neuronale, l'axo- et dendrito-genèse ou la synaptogenèse. La maturation anatomique et fonctionnelle des réseaux immatures est donc activité dépendante.

Dans cette partie, nous examinerons les processus développementaux responsables de la mise en place des réseaux sur le plan anatomique. Ceux-ci vont de la genèse des neurones et leur migration jusqu'à l'émergence des connexions fonctionnelles intra- et extra- hippocampiques. Puis, nous décrirons les différents patrons d'activité neuronale observés durant les stades précoces du développement ainsi que leur évolution à travers les âges. Enfin, nous explorerons les mécanismes par lesquels ces activités précoces influencent le développement des réseaux neuronaux. Nous nous intéresserons particulièrement aux mécanismes moléculaires liés à l'effet trophique du GABA durant la période néonatale.

« Le développement des réseaux sur le plan anatomique et fonctionnel est étroitement lié. »

A- DEVELOPPEMENT ANATOMIQUE DE LA REGION DE CA1

Dans cette partie, après une brève présentation du développement de la formation hippocampique durant la période embryonnaire précoce, je décrirai les processus développementaux par lesquels passent les différents types cellulaires pour aboutir aux microcircuits matures de CA1. Nous verrons également que les récepteurs GABAergiques et glutamatergiques sont exprimés très tôt dans le développement et qu'ils sont fonctionnels bien avant la formation des premières synapses.

1) Développement embryonnaire de la structure hippocampique

Au cours des premiers stades de la période embryonnaire (<E10), le télencéphale donne naissance à deux évaginations latérales correspondant aux futurs hémisphères cérébraux (**Figure I.15A et B**). La partie dorsale du télencéphale contient le pallium, une structure embryonnaire qui pendant le développement donne naissance à plusieurs structures corticales dont l'hippocampe (Marín and Rubenstein, 2003). Entre E10 et E11, l'ourlet cortical (« cortical hem »), issu de l'invagination du pallium, permet la ségrégation entre l'hippocampe et le néocortex, via la sécrétion de nombreux signaux moléculaires (Monuki et al., 2001; Mangale et al., 2008; Subramanian and Tole, 2009; Godbole et al., 2018). Ces processus sont responsables de la position de l'hippocampe sous le néocortex, tout le long de l'axe dorso-ventral. Ainsi, la zone ventriculaire de l'hippocampe est positionnée "dos à dos" avec celle du néocortex (**Figure I.15C**).

Le pallium est composé de différentes couches (**Figure I.15B'**). La zone ventriculaire (« ventricular zone », VZ) est la couche la plus interne du pallium, située près des ventricules cérébraux. Elle est principalement composée de cellules souches neurales à l'origine des futures cellules pyramidales. Juste en dessous se trouve la zone sous-ventriculaire qui est principalement impliquée dans la maturation et la migration des neurones nouvellement formés. Au-dessus de la zone ventriculaire se trouve la zone intermédiaire qui sert de couloir par lequel les neurones migrent vers leur emplacement final dans les structures corticales et contribue également à la maturation et à l'établissement des connexions neuronales. Ensuite on trouve la plaque corticale dans laquelle les neurones nouvellement formés migrent également et commencent à s'organiser en couches distinctes correspondant aux futures couches des structures corticales. La couche la plus externe du pallium est la zone marginale où les neurones en migration s'installent et établissent des connexions neuronales. Nous verrons plus loin dans ce manuscrit que les neurones GABAergiques et les cellules pyramidales adoptent différents modes de migration dans le télencéphale à travers les différentes couches du pallium.

Dans la partie ventrale du télencéphale, se trouve le sous-pallium qui forme les corps striés télencéphalique qui sont à l'origine de trois zones germinales hautement prolifératives émergent sous les ventricules latéraux : l'éminence ganglionnaire médiane (« Medial Ganglionic Eminence », MGE), l'éminence ganglionnaire caudale (« Caudal Ganglionic Eminence », CGE), et l'éminence ganglionnaire latérale (« Lateral Ganglionic Eminence », LGE). Ces structures apparaissent successivement, avec la MGE qui se forme en première vers E9 dans la partie antérieure. Puis vers E10, la LGE émerge du côté dorsal de la MGE. La structure la plus postérieure, la CGE, apparaît en dernière vers E11. Les éminences ganglionnaires sont des structures transitoires impliquées dans la neurogenèse des neurones GABAergiques du cortex et de l'hippocampe et qui disparaissent ensuite pour devenir la structure des ganglions de la base.

Dans les sections suivantes de ce manuscrit, je détaillerai les processus de genèse des cellules pyramidales et des neurones GABAergiques, qui sont très similaires entre les différentes structures corticales et l'hippocampe.

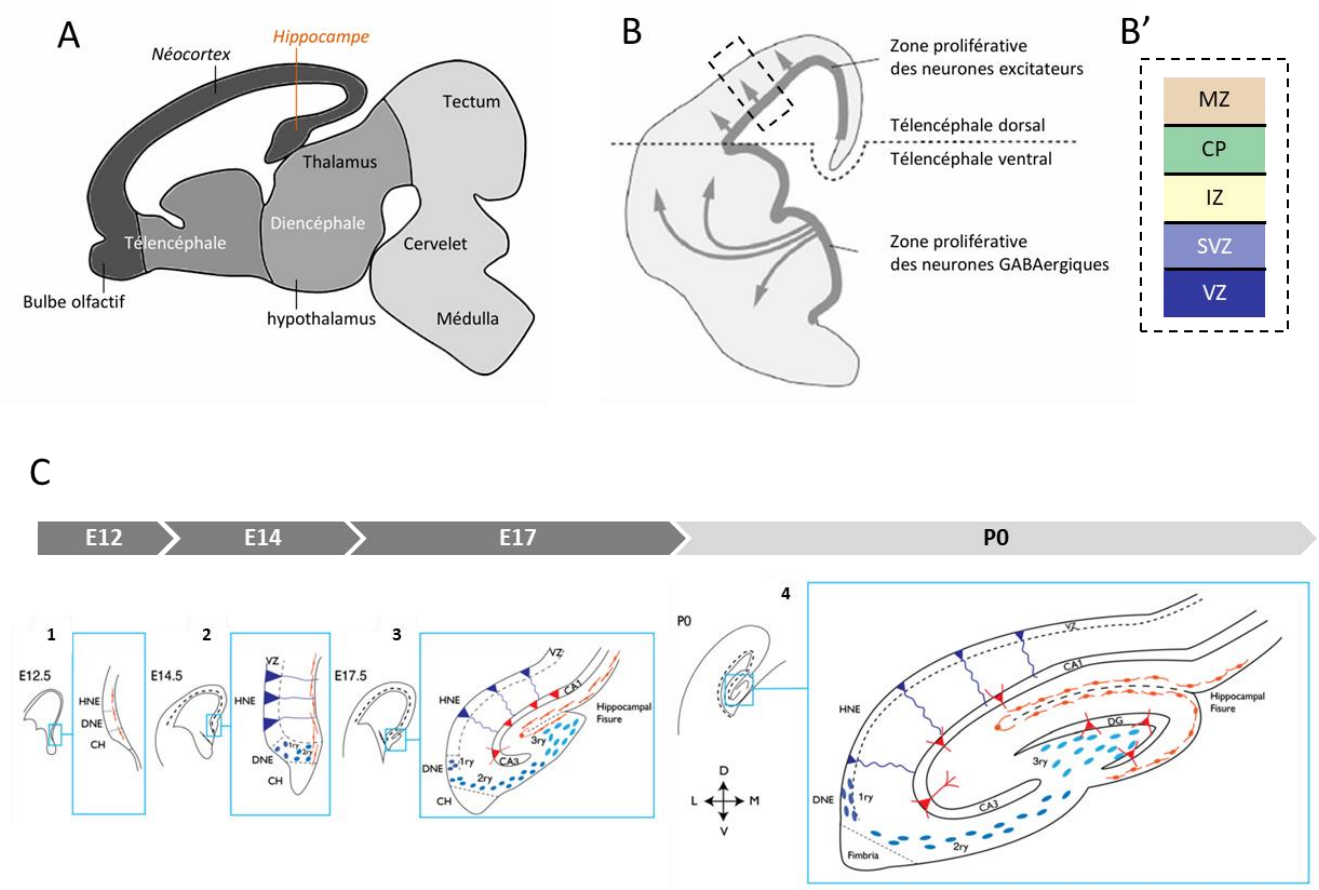


Figure I.15 : Anatomie de la formation hippocampique en développement

A. Coupe sagittale d'un cerveau de souris à E15. **B.** Coupe coronale d'un cerveau de souris au stade embryonnaire représentant la limite entre le télencéphale dorsal et le télencéphale ventral. Le télencéphale dorsal produit des cellules pyramidales excitatrices qui migrent radialement sur de courtes distances dans le cortex et l'hippocampe. Le télencéphale ventral produit des neurones GABAergiques qui suivent de longues et complexes voies migratoires vers diverses régions du cerveau. La zone indiquée dans la zone en pointillé correspond au pallium représenté en B'. **B'**. Représentation des différentes couches du pallium. **C.** Représentation schématique du télencéphale dorsal à différents stades embryonnaires (E) et à la naissance (P0). La zone indiquée dans chaque image correspond à la région hippocampique (agrandie sur le côté droit (carrés bleus)). (1) À E12.5, le neuroépithélium denté (DNE) est situé entre le neuroépithélium hippocampique (HNE) et l'hémisphère cortical (CH), qui produit des cellules de Cajal-Retzius (orange). (2) À E14.5, les précurseurs dentés de la matrice primaire (cercles bleu foncé) sont localisés dans la zone ventriculaire (VZ), et commencent à migrer pour former la matrice secondaire. Dans la VZ du HNE, les précurseurs radiaux gliaux (triangles bleu foncé) donneront naissance aux neurones hippocampiques. (3) À E17.5, la fissure hippocampique se forme et les cellules précurseurs dentées migrent et s'y accumulent pour former la matrice tertiaire (bleu clair). Les cellules de Cajal-Retzius sont également présentes. À ce stade, le réseau glial (non représenté) s'étend du CH à la fissure hippocampique afin de diriger la migration des cellules précurseurs dentées. À partir du HNE, les neurones hippocampiques (triangles rouges) naissent et migrent le long des cellules gliales radiales vers leur emplacement dans les champs hippocampiques (CA1 et CA3 sont indiqués). (4) À la naissance, le gyrus denté (DG) commence à se former. Les neurones granulaires dans le DG (triangles rouges) apparaissent d'abord dans la lame supérieure, sous la fissure hippocampique. Les cellules précurseurs des matrices primaire et secondaire disparaîtront par la suite et celles de la matrice tertiaire continueront à se diviser et à produire des neurones granulaires pendant le développement postnatal du DG. *HNE : neuroépithélium hippocampique ; DNE : neuroépithélium denté ; CH : hémisphère cortical ; VZ : zone ventriculaire ; 1ry : matrice primaire ; 2ry : matrice secondaire ; 3ry : matrice tertiaire ; DG : gyrus denté ; D : dorsal ; M : médial ; V : ventral ; L : latéral. Adapté de Danglot et al., 2006 ; Bandler et al., 2017 ; Urban et al., 2014*

2) Genèse des neurones hippocampique

Les processus de genèse des neurones correspondent à l'ensemble des étapes permettant aux neurones de devenir des cellules matures, intégrées et connectées au sein des réseaux neuronaux fonctionnels. Cela inclut les mécanismes allant de la prolifération des cellules souches à la différenciation des neurones, en passant par leur migration, leur maturation et l'établissement des connexions synaptiques. Ces processus développementaux dans l'hippocampe sont similaires à ceux observés dans le cortex.

a. Neurogénèse et migration des neurones pyramidaux

Les neurones pyramidaux du néocortex et de l'hippocampe ont pour origine la zone ventriculaire (VZ) qui tapisse la paroi du ventricule de la partie dorsale du télencéphale. Cette zone est composée de cellules neuroépithéliales qui sont des cellules progénitrices bipolaires et hautement polarisées qui s'étirent tout le long de l'axe apico-basal du neuroépithélium (Götz and Huttner, 2005). Pendant les phases précoces de la formation du neuroépithélium (avant E10), les cellules neuroépithéliales prolifèrent par division symétrique (c'est-à-dire que chaque division produit deux nouvelles cellules identiques) dans le but d'augmenter leur nombre et de mener à la formation de la zone ventriculaire (Götz and Huttner, 2005).

Au début de la neurogenèse (vers E10), les cellules neuroépithéliales acquièrent progressivement un phénotype de cellules de la glie radiaire (« radial glial cells », RGC). Ces cellules, dont le soma se trouve dans la VZ, présentent un prolongement court ancré à la face ventriculaire et un autre plus long qui s'étend jusqu'à la surface de la future fissure hippocampique. Ainsi ces cellules s'étendent sur toute l'épaisseur du CA1 en formation (Alvarez-Buylla et al., 2001; Noctor et al., 2001; Hayashi et al., 2015). Grâce à la présence de ces neuroprogéniteurs primaires dans le VZ hippocampique, la neurogénèse des cellules pyramidales de CA1 se fait localement entre E10 et E18 avec un pic de neurogenèse autour de E15 (**Figure I.16A**) (Angevine, 1965; Stanfield and Cowan, 1979; Kitazawa et al., 2014 ; Manent et al., 2005; Save et al., 2018).

La neurogénèse est basée sur les mécanismes de division asymétrique des RGCs et des progéniteurs neuronaux intermédiaires issus de ces dernières. En effet, lors de la division asymétrique les RGCs peuvent donner naissance à un neurone immature et à une nouvelle RGC (pour conserver le stock de cellules progénitrices). Les RGCs peuvent également se diviser pour former une nouvelle RGC et un progéniteur intermédiaire neuronal qui se divisera à son tour de façon asymétrique pour former deux neurones immatures. Il existe un dernier cas de figure dans lequel les RGCs sont capables de divisions symétriques où une RGC forme deux cellules progénitrices intermédiaires qui chacune donneront naissance à deux nouveaux neurones immatures (Götz and Huttner, 2005; Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009).

Suite à leur genèse, les neurones pyramidaux immatures migrent radialement à travers des zones sous-ventriculaires jusqu'au stratum pyramidale (**Figure I.18**). Dans l'hippocampe, les neurones pyramidaux migrent en « escalade » passant le long de différents prolongements afin d'atteindre leur destination finale dans le stratum pyramidale (Kitazawa et al., 2014). De plus, à partir de E16, les prolongements des RGCs se plient perpendiculairement à l'axe radial provoquant ainsi une distribution horizontale des neurones issus du même progéniteur neuronal (Xu et al., 2014), tandis que dans le cortex, ces neurones migrent uniquement dans l'axe radial le long d'un seul prolongement de RGC et sont par conséquent localisés dans une même colonne corticale. Ainsi en plus d'adopter une organisation verticale, les neurones pyramidaux s'organisent également horizontalement le long de l'axe proximo-distal de CA1 (**Figure I.16B**).

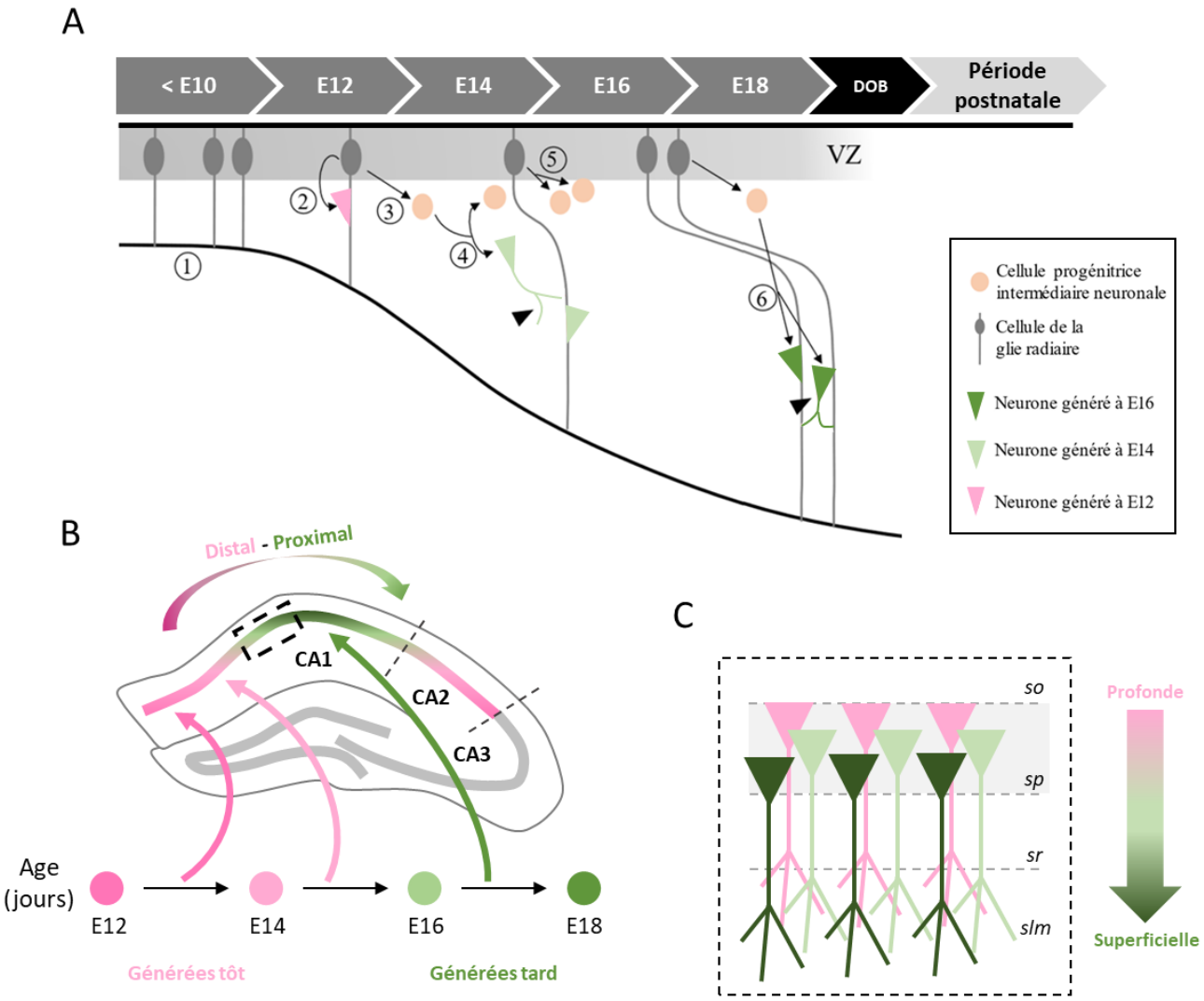


Figure I.16 : Représentation schématique de la neurogenèse et de la migration des cellules pyramidales de CA1

A. Les cellules pyramidales corticales sont issues du pallium, une monocouche composée de cellules neuroépithéliales. Ces cellules se divisent de façon symétrique, c'est-à-dire qu'une cellule mère donnera deux cellules filles identiques, permettant de créer un pool de cellules progénitrices (1). Au début de la neurogenèse, les cellules neuroépithéliales vont devenir des cellules de la glie radiaire (RGC). Les RGCs vont se diviser de façon asymétrique pour former une RGC et un neurone (2), ou une RGC et une cellule progénitrice intermédiaire neuronale (3). Ces dernières pourront également se diviser de façon asymétrique pour donner naissance à un neurone et à une cellule progénitrice neuronale (4). On observe également des divisions cellulaires symétriques où une RGC formera deux cellules progénitrices (5) ou une cellule progénitrice donnera naissance à deux neurones (6). Une des particularités de la neurogénèse dans la région de CA1 est que les prolongements des RGCs vont se tordre au fur et à mesure provoquant ainsi une distribution horizontale des neurones issus de la même RGCs. De plus, les neurones présentent un mode de migration en escalade, passant de RGCs en RGCs (tête de flèches). Au cours de la neurogénèse les cellules générées les plus tôt migreront jusqu'à la future bordure so/sp, puis plus une cellule sera formée tard plus elle devra migrer loin, vers le sr. On observe ainsi à l'âge adulte une organisation radiale des cellules pyramidales qui est une conséquence directe de la neurogenèse. **B-C.** Schéma montrant la distribution des neurones pyramidaux dans la région CA1 selon les axes transversal et radial (encadré) en fonction de leur date présumée de naissance (du jour embryonnaire (E)12.5 à E18.5). Les neurones pyramidaux nés précocement sont représentés en rose, tandis que ceux nés plus tard sont représentés en vert. *VZ : zone ventriculaire ; so : stratum oriens ; sp : stratum pyramidale ; sr : stratum radiatum ; slm : stratum lacunosum moleculare. Adapté de Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009 ; Hayashi et al., 2015 ; Cossart et Khazipov, 2022*

Enfin, la migration des cellules pyramidales jusqu'au stratum pyramidale suit un schéma de migration « interne-externe ». Cela signifie qu'une fois les premières cellules générées atteignent le stratum pyramidale les neurones suivants traversent cette couche pour atteindre une couche plus superficielle vers le stratum radiatum. Ainsi les neurones qui apparaissent les premiers constituent la couche profonde du stratum pyramidale et les neurones générés tardivement occupent la couche superficielle (**Figure I.16C**) (Bayer, 1980 ; Andersen et al., 2007). La répartition des cellules pyramidales le long de l'axe proximo-distal se fait aussi en fonction de leur période de neurogénèse puisque les neurones générés tôt (E12,5) se trouvent préférentiellement dans le CA1 distal et que ceux générés tard sont localisés dans la partie proximale (**Figure I.16B**) (Bayer, 1980). Comme nous l'avons vu précédemment, en fonction de leur date de naissance et de leur localisation, ces neurones présentent, à l'âge adulte, des caractéristiques morpho-physiologiques et fonctionnelles qui leur sont propres (Save et al., 2019; Cavalieri et al., 2021).

Une fois arrivés dans leur structure cible, les neurones pyramidaux vont maturer, via des processus de synaptogenèse et dendritogenèse durant lesquels on observe une élongation des axones de sorte à établir des connexions synaptiques pour établir des circuits fonctionnels et une ramification des dendrites pour former des synapses. Après la naissance de l'animal, les dendrites apicales des neurones pyramidaux commencent à se développer et à s'étendre dans la SLM (Tyzio et al., 1999). Le développement de la connectivité locale et externe des neurones pyramidaux de CA1 se fait au cours des deux premières semaines postnatales, ce point sera traité plus en détail dans la suite de ce manuscrit.

b. Neurogénèse et migration des Cajal-Retzuis

Les Cajal-retzuis (CRs) sont parmi les premiers neurones qui apparaissent dans le cortex et l'hippocampe, puisqu'ils sont générés entre le 9ème et le 11ème jour embryonnaire dans plusieurs sites à la frontière du pallium. Ils migrent ensuite tangentiellement jusqu'à la zone marginale (couche corticale la plus externe) du néocortex et de l'hippocampe en développement (Soriano et Del Río, 2005 ; Takiguchi-Hayashi et al., 2004). Dans l'hippocampe immature, les corps cellulaires des CRs sont localisés dans la SLM où ils intègrent les réseaux locaux comme nous le verrons plus loin dans ce manuscrit.

Comme nous l'avons vu précédemment, une fois la migration neuronale terminée, la quasi-totalité des CRs meurent suite à des mécanismes de mort cellulaire pendant les premières semaines de vie (del Rio et al., 1995; Super et al., 1998 ; Chowdhury et al., 2010 ; Anstötz et al., 2014, 2016).

c. Genèse des neurones GABAergiques

i) Neurogenèse des neurones GABAergiques

La genèse des neurones GABAergiques a lieu dans les éminences ganglionnaires médianes (EGM), caudales (EGC) et latérales (EGL) qui se trouvent dans le télencéphale ventral (**Figure I.17A et A'**) (Pelkey et al., 2017).

La grande majorité des neurones GABAergiques des structures corticales provient des progéniteurs de la EGC et de la EGM, tandis que les progéniteurs de la EGL donnent naissance aux cellules GABAergiques des bulbes olfactifs et du striatum (Wichterle et al., 1999, 2001; Pleasure et al., 2000; Wonders and Anderson, 2006; Hébert and Fishell, 2008; Tricoire et al., 2011; Pelkey et al., 2017). Une autre structure, l'aire pré-optique (POA, « Pre-Optic Area »), contribue également à la genèse des neurones GABAergiques hippocampiques (Gelman et al., 2011, 2009).

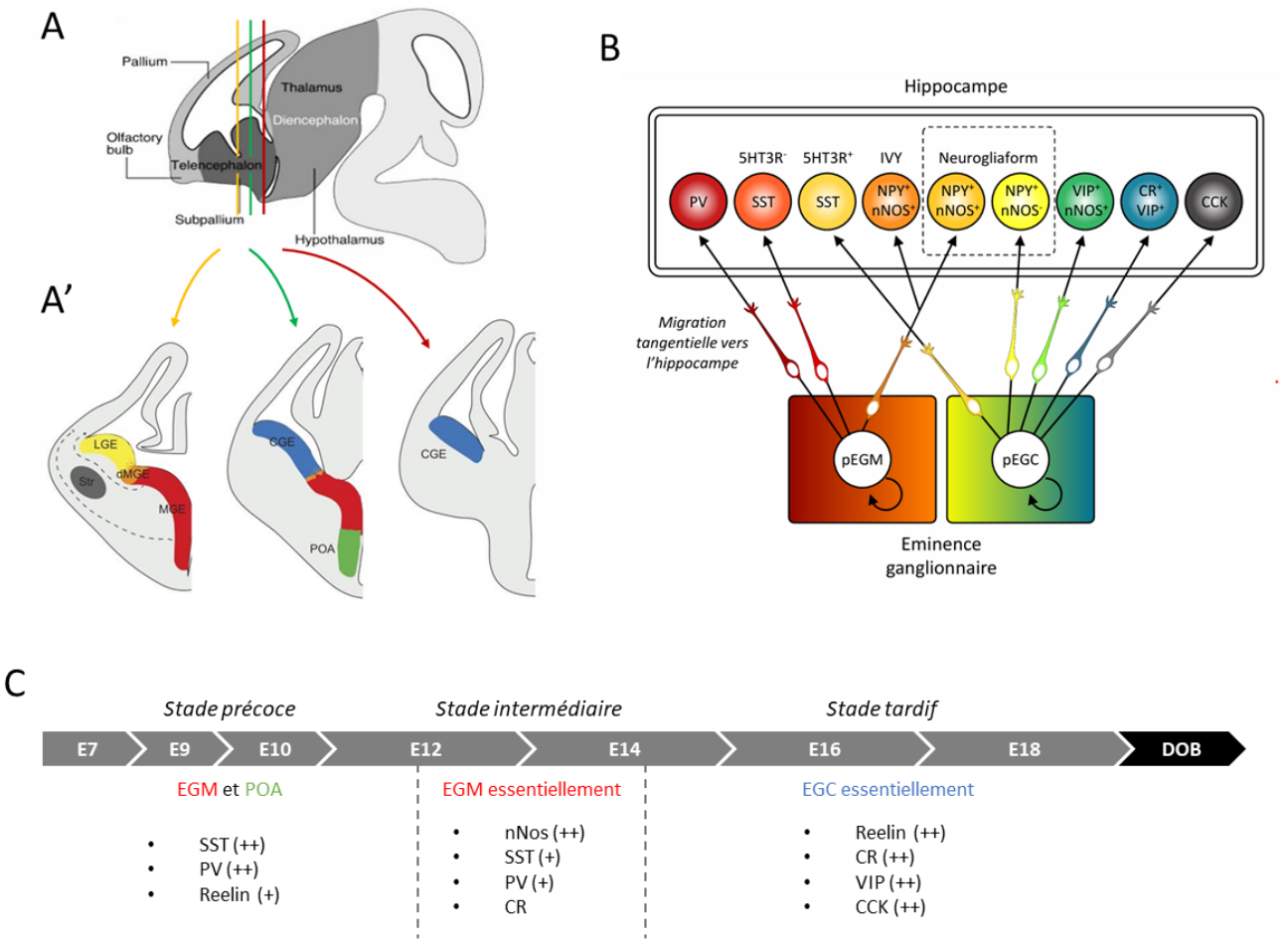


Figure I.17 : Neurogenèse des neurones GABAergiques de CA1

A. Coupe sagittale d'un cerveau de souris à E12. **A'**. De gauche à droite, coupes coronales à différents niveaux le long de l'axe antéro-postérieur, sur le cerveau de souris embryonnaire de la figure A. Les éminences ganglionnaires médianes (MGE, en rouge ; partie dorsale de la MGE, en orange), latérales (LGE, en jaune) et caudales (CGE, en bleu) et de l'aire pré-optique (POA, en vert) sont représentées sur ces coupes. **B.** Origines et diversité des neurones GABAergiques de l'hippocampe. Les neurones de CA1 issus des progéniteurs de l'éminence ganglionnaire médiane (pMGE) exprimeront la PV, la SST le NPY et le nNos. Ceux qui dérivent des progéniteurs de l'éminence ganglionnaire caudale (pCGE) expriment la SST, le NPY, le nNOS, le VIP, la CR et la CCK. Les différentes combinaisons de marqueurs moléculaires seront spécifiques des cellules issues des pMGE ou des pCGE. Par exemple les IvYs et NGFs issues de la MGE exprimeront le NPY et le nNOS, alors que les NGFs issues de la CGE exprimeront seulement le NPY. Autre exemple, les neurones SST qui dérivent des pCGE expriment le récepteur HT R à l'inverse de ceux issus de la MGE. **C.** Dates et lieux de naissance des neurones GABAergiques hippocampiques. Stade précoce du développement embryonnaire (E7.5– E12.5) : l'éminence ganglionnaire médiane (EGM) et l'aire pré-optique (POA) donnent majoritairement naissance aux futures neurones GABAergiques SST+ et PV+. Stade intermédiaire du développement embryonnaire (E12.5– E14.5) : la proportion de neurones GABAergiques SST+ et PV+ diminue. On assiste aussi à la naissance des neurones GABAergiques nNOS+. Stade tardif du développement embryonnaire (E14.5– E19.5) : l'éminence ganglionnaire caudale (EGC) est la principale source de genèse des futures neurones GABAergiques qui expriment la Reelin, la CR et le VIP *PV : parvalbumine ; SST : somatostatine ; NPY : neuropeptide Y ; nNOS : « neuronal Nitric Oxide Synthase » ; VIP : polypeptide intestinal vasoactif ; CR : calrétinine ; CCK : Cholecystokinine. Adapté de Marín and Rubenstein, 2003 ; Pelkey et al., 2017*

Comme nous l'avons vu précédemment dans ce manuscrit, il existe une grande diversité de neurones GABAergiques exprimant notamment des marqueurs moléculaires différents. Cette diversité peut s'expliquer par les différentes origines embryonnaires de ces neurones. En effet, les neurones issus de la MGE représentent ~60% des neurones corticaux et sont les premiers à être générés durant le développement embryonnaire (**Figure I.17C**) (Pleasure et al., 2000 ; Tricoire et al., 2011; Pelkey et al., 2017). Parmi ces neurones se trouvent ceux qui expriment la parvalbumine (PV), tels que les neurones en panier PV+ (PVBC), les neurones bistratifiés

(BiC), les neurones axo-axoniques (AAC). Environ 60 % des neurones exprimant la somatostatine (SST), comme par exemple les neurones « O-LM », ainsi que les neurones exprimant le neuropeptide Y (NPY) et le nNos, tels que les neurones en forme de lierre (IvC) et une partie des neuroglialformes (NGF) dérivent également de la MGE (**Figure I.17B**) (Chittajallu et al., 2013 ; Pleasure et al., 2000; Tricoire et al., 2010, 2011).

Les neurones issus de la CGE, quant à eux, représentent ~30% des neurones corticaux et sont générés à des stades plus tardifs du développement embryonnaire (**Figure I.17C**) (Miyoshi et al., 2010; Tricoire et al., 2011; Pelkey et al., 2017). Ces neurones incluent ceux exprimant la cholecystokinine (CCK), tels que les neurones en panier CCK+ (CCKBC), les neurones associés aux collatérales de Schaffer (SCA) et à la voie perforante (PPA) mais également les neurones exprimant le VIP et la CR tels que les neurones GABAergiques qui contactent d'autres neurones GABAergiques (ISI). Environ 40 % des neurones exprimant la somatostatine (SST) ainsi qu'une partie des neurones exprimant la NPY proviennent également de la CGE (**Figure I.17B**) (Pelkey et al., 2017 ; Tricoire et al., 2011; Chittajallu et al., 2013).

Les 10% des neurones GABAergiques corticaux restant sont issus de l'aire pré-optique (POA) et sont générés pendant les premiers stades de développement embryonnaire comme ceux issus de la EGM. Les neurones qui sont générés dans la POA expriment la PV et la SST ou le VIP et la Reelin (Gelman et al., 2011, 2009).

Bien que certains marqueurs moléculaires soient communs entre les neurones issus des progéniteurs MGE et CGE comme la SST et la NPY, les différentes combinaisons faites avec d'autres marqueurs moléculaires sont spécifiques des cellules provenant de ces deux sites de genèse. Par exemple les IvYs et NGFs issues de la MGE exprimeront le NPY et le nNOS, alors que les NGFs issues de la CGE exprimeront seulement le NPY. Autre exemple, les neurones SST qui dérivent des pCGE expriment le récepteur 5HT3R à l'inverse de ceux issus de la MGE (**Figure I.17B**).

Cette diversité au sein des neurones GABAergiques est étroitement liée à l'expression de différents facteurs de transcription en fonction des éminences ganglionnaire d'où ils sont issus. Par exemple, la majorité des progéniteurs de l'EGM expriment le facteur de transcription Nkx2.1 tandis que ceux de l'EGC expriment la Gsx2, COUPTF1/2 et SP8. Ces facteurs de transcriptions sont impliqués dans la genèse, la migration, la spécification et la maturation des neurones GABAergiques en provenance des différentes éminences ganglionnaire (Kanatani et al., 2008; Sussel et al., 1999; Pleasure et al., 2000 ; Butt et al., 2008 ; Tricoire et al., 2010). De plus certains facteurs de transcription sont plus spécifiques de certains sous-types de neurones comme c'est le cas par exemple pour les futurs neurones exprimant la PV ou la SST issus de la EGM qui vont exprimer le facteur de transcription Lhx6 qui agit en aval de NkX2.1 (Du et al. 2008).

En plus de l'origine spatiale, la date de naissance des neurones GABAergiques est un facteur important dans le devenir des neurones que ce soit au sein d'une même région de genèse ou dans des sites différents. Dans l'EGM, les neurones GABAergiques exprimant la SST sont les premiers à être générés à partir de E7.5-E9.5 avec un pic aux alentours de E11.5, suivis de près par les neurones GABAergiques exprimant la PV avec un pic aux alentours de E12.5 (Inan et al., 2012; Picardo et al., 2011; Tricoire et al., 2011). Au stade intermédiaire du développement embryonnaire (aux l'alentours de E13), la proportion de neurones SST et PV générés diminue tandis que les neurones GABAergiques nNOS+, comme les neurones IvY et les NGF, commencent à être généré dans l'EMG (Miyoshi et al., 2007). Cependant, certains neurones sont générés à des stades tardifs (aux alentours de E15.5) comme c'est le cas pour les neurones GABAergiques axo-axoniques exprimant la PV (**Figure I.17C**) (Inan et al., 2012; Taniguchi et al., 2013). Au niveau de l'EGC, les neurones GABAergiques exprimant la Reelin et VIP commencent à être produits vers E12.5 avec un pic de genèse pour les neurones GABAergique qui expriment la CR vers E16.5 (Miyoshi et al., 2010). Le pic de neurogénèse des neurones GABAergiques dans l'aire pré-optique se situe autour de E11.5 tout comme l'EGM (Gelman et al., 2011).

Parmi les cellules GABAergiques qui dérivent de la EGM, il existe une sous-population de neurones SST+ appelés neurones « hub » correspondent aux neurones GABAergiques pionniers, générés les premiers au cours de la

neurogenèse (entre E7.5 et E9.5) (Bocchio et al., 2020; Mòdol et al., 2017; Picardo et al., 2011; Villette et al., 2016). Ces neurones jouent un rôle important dans le développement de la dynamique hippocampique que je détaillerai plus loin dans ce manuscrit et constituent, dans l'hippocampe adulte, une population de neurones GABAergiques à part entière.

Ainsi, la dynamique complexe de l'organisation spatio-temporelle des éminences ganglionnaires et de l'aire pré-optique dans la genèse de neurones GABAergiques explique cette diversité des neurones GABAergiques dans l'hippocampe.

ii) Migration des neurones GABAergiques

Suite à leur genèse dans les éminences ganglionnaires, les neurones GABAergiques migrent jusqu'au télencéphale dorsal où se trouve le cortex et l'hippocampe en formation (**Figure I.18**) (Ang et al., 2003). Cette étape migratoire commence aux alentours de E14/E15 puisque des neurones GABAergiques dérivant de la MGE et de la CGE peuvent déjà être observés à ce stade du développement dans la Corne d'Ammon (Manent et al., 2006).

La migration des neurones GABAergiques se fait en deux temps. Tout d'abord, ils quittent les éminences ganglionnaires pour aller jusqu'aux structures corticales en formation en adoptant une migration tangentielle (c'est-à-dire perpendiculaire aux prolongements des RGC). En fonction de leur éminence ganglionnaire d'origine ainsi que des différents facteurs de transcription qu'ils expriment, les différents types de neurones GABAergiques vont suivre des voies de migration distinctes pour atteindre leur destination finale. En effet, ceux qui proviennent de l'EGM passeront par des voies dorsolatérales alors que ceux originaires de l'EGC suivront des routes latérales, médiales et caudales (Touzot et al., 2016; Wichterle et al., 2001; Yozu et al., 2005 ;Pelkey et al., 2017). Une fois arrivé au niveau cortical, la migration tangentielle des neurones GABAergiques issus de l'EGC et de l'EGM se fait selon deux voies migratoires qui s'organisent de part et d'autre de la plaque corticale : la voie profonde, qui se situe dans la zone intermédiaire à proximité de la SVZ, et la voie superficielle, qui est dans la zone marginale (Danglot et al., 2006). Ainsi les interneurones se propagent et se répartissent dans l'ensemble des structures corticales en formation.

Ensuite, les neurones GABAergiques migrent radialement dans différentes orientations pour se répartir dans les différentes couches de l'hippocampe (Danglot et al., 2006). Certains neurones de la zone intermédiaire migrent radialement pour atteindre la plaque corticale, la zone marginale ou le ventricule. Tandis que les neurones GABAergiques de la zone marginale peuvent migrer radialement vers la plaque corticale (Danglot et al., 2006). De multiples mécanismes, intrinsèques et extrinsèques, agissent simultanément favorisant l'arrêt de la migration tangentielle des neurones GABAergiques en faveur de la migration radiale pour atteindre leur destination finale. Ces notions seront abordées plus en détail plus loin dans ce manuscrit.

Les différents sous-types de neurones GABAergiques se répartissent dans les différentes couches de CA1 en fonction de leur origine germinative et de signaux moléculaires permettant leur guidage jusqu'à leur destination finale. En effet, les neurones issus de la MGE qui sont générés à des stades précoces du développement se (de E7,5 à E14,5) répartissent préférentiellement dans les couches profondes de l'hippocampe comme le stratum oriens et pyramidale. Les neurones issus de la CGE, quant à eux, sont générés à des stades plus tardifs (de E14,5 à E19,5), colonisent principalement les couches superficielles comme le stratum radiatum et lacunosum moleculare (Tricoire et al., 2011). Une fois arrivé dans leur structures cible, les dendrites et les axones des neurones GABAergiques se développent lors de processus de synaptogenèse et de dendritogenèse. La sélection des partenaires synaptiques va être également facilité par des signaux moléculaires comme c'est le cas, par exemple, des cellules pyramidales dont le soma attire les axones et corps cellulaire des neurones GABAergiques en panier PV+ et qui repousse les axones des neurones GABAergiques bistratifiés PV+ (Fleck et al., 2000).

Bien que ces signaux moléculaires jouent un rôle dans le guidage des neurones et le choix des partenaires synaptiques, la formation de circuits neuronaux dépend également de l'activité des réseaux neuronaux. Nous verrons plus loin dans ce manuscrit comment ces activités de réseaux impactent les processus développementaux des neurones mais également quel est le rôle des neurones GABAergiques dans cette dynamique de réseaux.

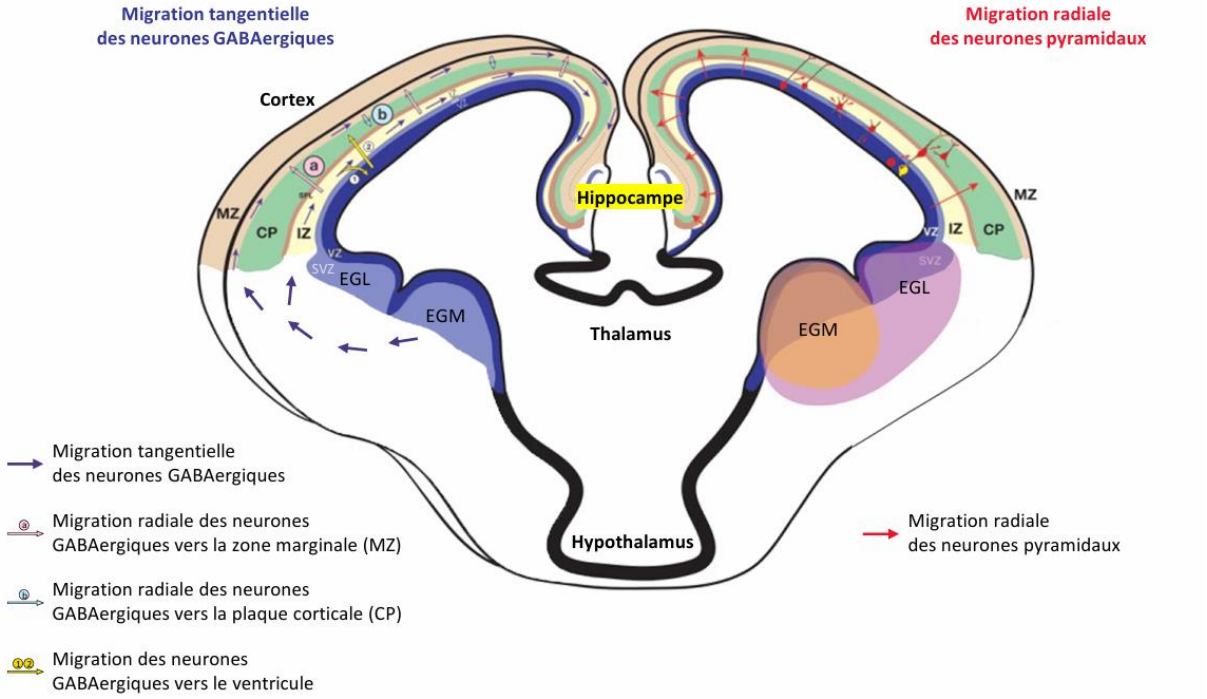


Figure I.18 : Migration des neurones GABAergiques vers l'hippocampe et le cortex

Modes de migration des neurones GABAergiques et des cellules pyramidales dans le télencéphale (à environ E15). Hémisphère droit : les cellules pyramidales proviennent du neuroépithélium et migrent orthogonalement vers la couche superficielle de l'hippocampe et du cortex (flèches rouges) appelée la zone marginale (MZ, en marron clair). Hémisphère gauche : les neurones GABAergiques hippocampiques et corticaux sont issus de l'EGM. Ils migrent tangentiellement (flèches bleues) de part et d'autre de la plaque corticale (CP, en vert), dans la zone marginale (MZ) ou dans la zone intermédiaire (IZ, en jaune). Quand les neurones GABAergiques arrivent dans le télencéphale dorsal, ils commencent à migrer radialement jusqu'à leur destination finale. Zone sous-ventriculaire (SVZ, en bleu clair), zone ventriculaire (VZ, en bleu foncé), éminence ganglionnaire latérale (EGL). *Adapté de Danglot et al., 2006*

3) Processus de mort cellulaire programmée

Bien que la plupart des neurones hippocampiques en maturation finissent par s'intégrer dans des réseaux fonctionnels, une fraction d'entre eux disparaissent par mort cellulaire au cours du développement. Ce processus physiologique est essentiel pour le développement de réseaux équilibrés (Jiang et al. 2001 ; Murase et al. 2014 ; Southwell et al. 2012 ; Wong et al. 2018). L'apoptose développementale a très bien été étudiée dans le néocortex en développement mais moins dans l'hippocampe (Southwell et al. 2012 ; Wong et al. 2018 ; Blanquie et al. 2017 ; Duan et al. 2020 ; Priya et al. 2018 ; Causeret et al.2018 ; Wong et al. 2019). Cependant, il est connu que ce processus dans l'hippocampe soit similaire à celui observé dans le cortex.

Comme dans le néocortex, l'apoptose développementale hippocampique est principalement observée au cours de la première semaine postnatale chez les rongeurs et affecte les cellules glutamatergiques et GABAergiques. Dans le néocortex, ce processus de mort cellulaire touche d'abord les cellules glutamatergiques entre P0 et P5 puis les neurones GABAergiques entre P5 et P10, entraînant ainsi la disparition de plus d'un tiers des deux types cellulaires (Southwell et al. 2012 ; Wong et al. 2018 ; Causeret et al.2018 ; Wong et al. 2019). Dans l'hippocampe, l'intensité et le moment où a lieu ce processus d'apoptose diffèrent en fonction du type cellulaire et de la région. Par exemple, il y a plus d'apoptose dans le stratum oriens de la partie distale de CA1 (Ferrer et al. 1990) que dans la partie proximale et certaines sous-populations, comme les neurones GABAergiques dérivés du CGE, diminuent jusqu'à 80% entre P0 et P10 (Tricoire et al. 2011). Les cellules Cajal-Retzius présentes dans l'hippocampe, quant à elle, disparaissent plus tardivement que les autres types cellulaires puisque ces dernières rentrent en apoptose une fois la migration neuronale terminée à la fin de la première semaine de vie. A l'âge adulte, on retrouve presque deux fois plus de Cajal-Retzius survivantes dans l'hippocampe par rapport au néocortex (Causeret et al.2018 ; Anstotz et al. 2018).

La mort cellulaire est un processus dépendant de l'activité neuronale puisque les neurones qui ont une forte activité auront tendance à survivre (Murase et al. 2014 ; Causeret et al.2018 ; Wong et al. 2019). Les mécanismes moléculaires reliant l'activité électrique des neurones au processus de l'apoptose commencent à peine à être élucidés (Priya et al. 2018 ; Wong et al. 2019 ; Murase et al. 2011), mais il semblerait que les activités spontanées néonatales y jouent un rôle (Blanquie et al. 2017 ; Duan et al. 2020 ; Murase et al. 2011).

4) Développement de la transmission synaptique glutamatergique et GABAergique

En parallèle de la genèse des neurones, les récepteurs glutamatergiques et GABAergiques sont exprimés à leur membrane dès la période embryonnaire. Cependant, la quantité de certain canaux ionique exprimé à leur membrane varie au cours du développement induisant un changement de polarité de l'action du GABA.

a. Les récepteurs glutamatergiques et le glutamate

Le glutamate est le principal neurotransmetteur excitateur du système nerveux. Après avoir été libéré au niveau des fentes synaptiques, ils se fixent à leurs récepteurs en post-synaptique et entraînent la dépolarisation des neurones. Dans les cellules du système nerveux central, on retrouve deux types de récepteurs au glutamate : des récepteurs ionotropiques, qui sont des canaux ioniques transmembranaires qui s'ouvrent avec la fixation de leur ligand (laissent entrer ou sortir certains ions selon leurs gradients électriques et chimiques), et des métabotropiques, qui sont couplés à des protéines de transduction (les protéines G) (Reiner and Levitz, 2018) (**Figure I.19A**).

Il existe trois types de récepteurs ionotropiques au glutamate : AMPA, NMDA et kaïnate. Ces récepteurs tétramériques présentent une cinétique d'activation rapide et entraînent une dépolarisation des neurones en post-synaptique via l'entrée de cations. Les récepteurs AMPA et kaïnate en s'activant laissent entrer les ions Na2+ tandis que les récepteurs NMDA laissent entrer les ions Ca2+ et Na2+. Lorsqu'ils sont ouverts, ces deux

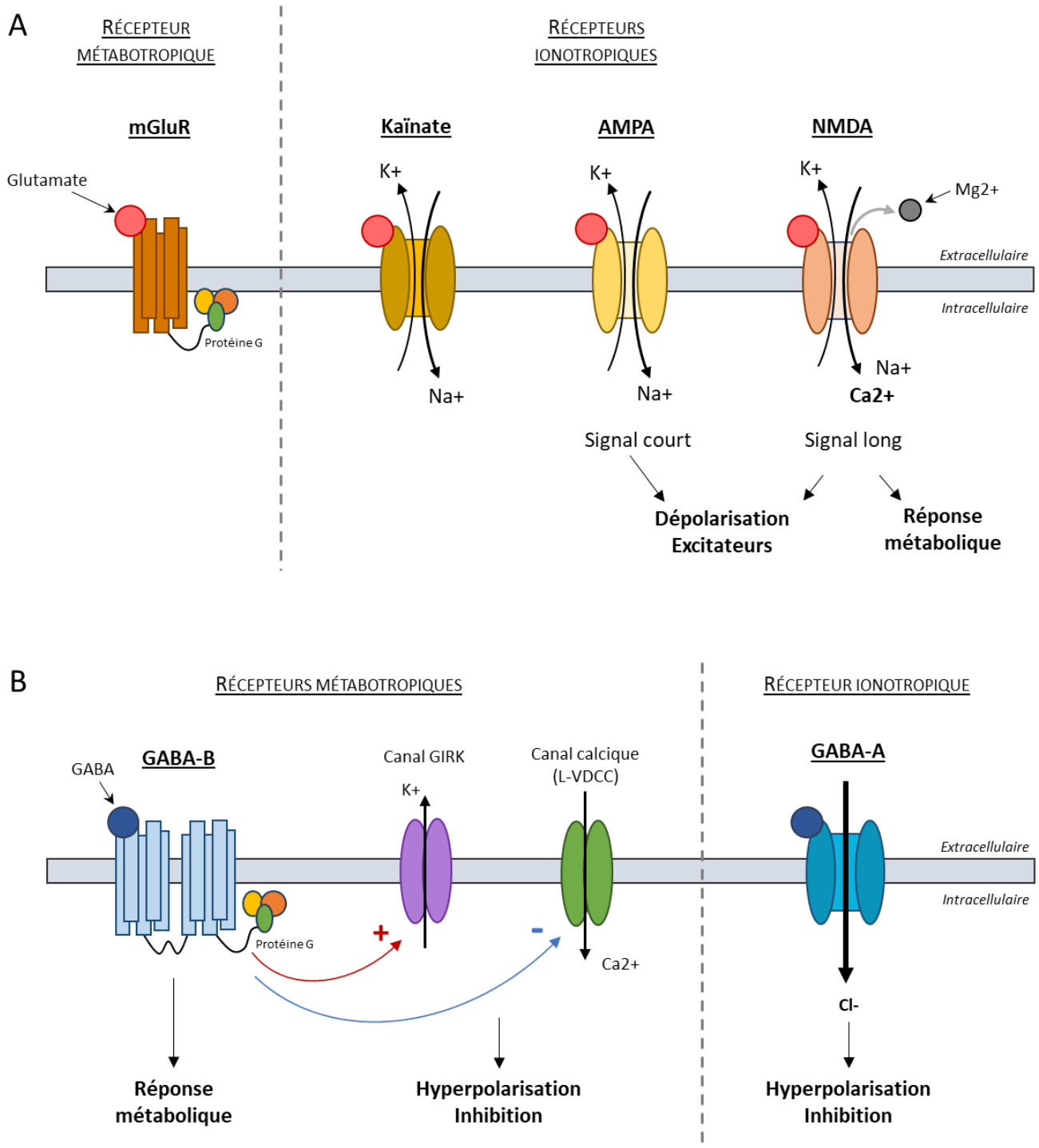


Figure I.19 : Les récepteurs glutamatergiques et GABAergiques

A. Représentation schématique des différents types de récepteurs glutamatergiques et (**B**) GABAergiques. Les échanges ioniques réalisés entre le milieu extérieur et les cellules sont représentés sur ces schémas.

canaux laissent aussi sortir des ions K+. La cinétique des canaux NMDA est plus lente que celle des canaux AMPA puisqu'ils nécessitent une forte dépolarisation pour lever le blocage du canal par le magnésium (Crunelli and Mayer, 1984).

Quant aux récepteurs métabotropiques au glutamate, il existe huit sous types de mGluR classés en trois groupes différents en fonction de leur homologie de séquence en acides aminés (Pin & Acher, 2002; Reiner and Levitz,

2018). Les mGluRs du groupe I sont couplés à la protéine Gq alors que ceux des groupes II et III sont couplés à la protéine Gi/o. La protéine Gq couplée au mGluR du groupe I augmente la concentration intracellulaire de Ca2+ en permettant la libération du Ca2+ intracellulaire des réserves de la cellule via les récepteurs IP, ou en permettant l'ouverture des canaux Ca2+ voltages dépendants. A l'inverse, les mGluR des groupes II et III inhibent ces canaux via leur protéine Gi/o. Ces récepteurs métabotropiques semblent être impliqués dans les mécanismes permettant d'accroître la concentration intracellulaire en Ca2+ à partir de réserves se trouvant dans le réticulum endoplasmique.

Ainsi, l'activation des récepteurs glutamatergiques entraîne un flux ionique à travers la membrane plasmique des neurones post-synaptiques provoquant leur dépolarisation et permettant ainsi l'initiation de potentiels d'action. Cependant, bien que ces récepteurs jouent un rôle important dans la transmission synaptique et la propagation de l'information électrique via l'initiation de PAs, certains d'entre eux sont également impliqués dans la régulation de processus transcriptionnels liés à la maturation et à la plasticité des réseaux. C'est notamment le cas des récepteurs NMDA comme nous le verrons plus tard dans ce manuscrit.

Pendant la période embryonnaire, ces récepteurs sont exprimés à la membrane des neurones immatures, et ce bien avant la formation de synapses fonctionnelles. Suite à la sécrétion du glutamate dans le milieu extracellulaire par les cellules glutamatergiques immatures, un effet paracrine de ce neurotransmetteur est observé suite à leur liaison sur les récepteurs AMPA et NMDA exprimés par les neurones GABAergiques et glutamatergiques de CA1 (Manent et al., 2005, 2006). Nous verrons plus loin dans ce manuscrit que l'altération de ces récepteurs a des conséquences sur les processus de maturation des réseaux neuronaux durant les stades précoces du développement.

Les synapses glutamatergiques fonctionnelles, quant à elles, se forment plus tard au cours du développement puisqu'à la naissance (P0), seuls 10 % des cellules pyramidales de CA1 présentent des synapses glutamatergiques fonctionnelles (Tyzio et al., 1999).

b. Les récepteurs GABAergiques et le GABA

Dans le système nerveux adulte, le GABA est le principal neurotransmetteur inhibiteur. Il est synthétisé dans le cytoplasme des neurones GABAergiques par décarboxylation du glutamate grâce à une enzyme (l'acide glutamique décarboxylase -GAD) qui catalyse cette réaction. Le GABA est le premier neurotransmetteur à devenir fonctionnel dans les réseaux en développement puisqu'il est synthétisé dès la période embryonnaire. Pendant les premiers stades du développement, le GABA est libéré par les cônes de croissance (Taylor et Gordon-Weeks, 1991 ; Gao et Van den Pol, 2000) ou de manière paracrine non-vésiculaire (Demarque et al., 2002), fournissant ainsi une source locale et endogène de GABA. Suite à sa libération dans le milieu au niveau des fentes synaptiques, ce neurotransmetteur agit sur les neurones post-synaptiques en se fixant à deux types de récepteurs : les $GABA_A$ ($GABA_A$-R) et $GABA_B$ ($GABA_B$-R) (**Figure I.19B**).

i) Les récepteurs métabotropiques $GABA_B$

Les récepteurs métabotropiques $GABA_B$ sont composés de deux sous-unités, $GABA_{B1}$ et $GABA_{B2}$, et sont associés à des protéines Gi/o (protéine liant le GTP) qui inhibent l'adénylate cyclase et qui modulent les canaux ioniques (Bowery, 1993 ; Bowery et al., 2002). En effet, l'activation de ces récepteurs génère, au niveau post-synaptique des potentiels inhibiteurs lents (100-150 ms) via l'ouverture de canaux potassiques rectifiant lents (GIRK, également appelés canaux Kir3) activés par les protéines G (Gähwiler et Brown, 1985). En pré-synaptique, ils inhibent les canaux calciques voltage dépendants responsables de la libération de neurotransmetteurs.

Les récepteurs $GABA_B$ sont présents et fonctionnels dès le stade embryonnaire, bien qu'ils ne contrôlent pas encore l'excitabilité cellulaire via l'ouverture des canaux GIRK dans certaines régions cérébrales en développement. En effet, dans l'hippocampe et le néocortex, l'ouverture de ces canaux par les récepteurs $GABA_B$ postsynaptiques est enregistrée seulement après la naissance (Gaïarsa et al., 1995 ; Nurse et Lacaille, 1999 ; Verheugen et al., 1999 ; Luhmann et Prince, 1991 ; Fukuda et al., 1993 ; Kirmse et Kirischuk, 2006). Pendant la période embryonnaire, les récepteurs $GABA_B$ sont néanmoins couplés à des voies de signalisation qui peuvent moduler des processus impliqués dans la maturation des réseaux neuronaux comme nous le verrons plus tard dans ce manuscrit. Après la naissance, les réponses postsynaptiques médiées par les récepteurs $GABA_B$ augmentent jusqu'à la deuxième semaine postnatale et restent stables par la suite (Luhmann et Prince, 1991 ; Fukuda et al., 1993 ; Gaïarsa et al., 1995 ; Kirmse et Kirischuk, 2006).

ii) Les récepteurs ionotropiques $GABA_A$

Les récepteurs ionotropiques $GABA_A$ sont des canaux ioniques pentamériques perméables aux ions chlorures (Cl-) principalement et aux ions bicarbonates (HCO3-). Dans l'hippocampe au stade embryonnaire, ce sont les premiers types de récepteurs au GABA à être exprimés. La fixation de deux neurotransmetteurs GABA est nécessaire à l'ouverture des canaux qui vont, selon le stade du développement, faire sortir ou entrer du Cl- dans la cellule. En effet, pendant les périodes embryonnaire et postnatale, l'action du GABA sur les neurones immatures est dépolarisante alors qu'elle est hyperpolarisante sur les neurones matures présents à l'âge l'adulte. Cet effet est dépendant du potentiel d'inversion du chlore (ECl-) ainsi que du potentiel de repos de la cellule qui sont étroitement lié à l'expression des transporteurs du chlore (KCC2, NKCC1) qui est différente chez le nouveau-né par rapport à l'adulte.

iii) Transition de l'effet dépolarisation à hyperpolarisant du GABA

Pendant les stades précoces du développement, le Cl- est accumulé à l'intérieur des neurones grâce au transporteur membranaire sodium potassium chlore de type 1 (NKCC1). Celui-ci est exprimé en plus grande quantité jusqu'à la deuxième semaine postnatale chez le rongeur (Fukuda et al., 1998; Yamada et al., 2004). Ainsi la concentration intracellulaire de Cl- augmente, ce qui modifie le gradient du Cl- et modifie le potentiel d'équilibre du chlore (ECl-) vers des valeurs dépolarisantes. ECl est alors supérieur au potentiel de repos de la cellule (Tyzio et al., 2006; Yamada et al., 2004). Dans ces conditions où la concentration du Cl- intra-cellulaire est élevée, l'activation des $GABA_A$-R induit donc une sortie de Cl- qui aura comme conséquence une dépolarisation du neurone postsynaptique (**Figure I.20**).

Autour de la deuxième semaine post natale, on assiste à un changement de la polarité de l'action du GABA. Un des acteurs clefs de ce changement de la polarité est le co-transporteur potassium chlore type 2 (KCC2), qui expulse activement le Cl- hors de la cellule (Ganguly et al., 2001; Rivera et al., 1999). En effet, à partir de cette période du développement, les neurones commencent à exprimer de fortes quantités de KCC2, surpassant l'action de NKCC1 ce qui a pour conséquence une diminution de la concentration en Cl- intracellulaire rendant ECl- plus négatif que le potentiel de membrane du neurone. En conséquence, l'activation des récepteurs $GABA_A$ va désormais entraîner une entrée du Cl- dans la cellule, et donc une hyperpolarisation du neurone (**Figure I.20**).

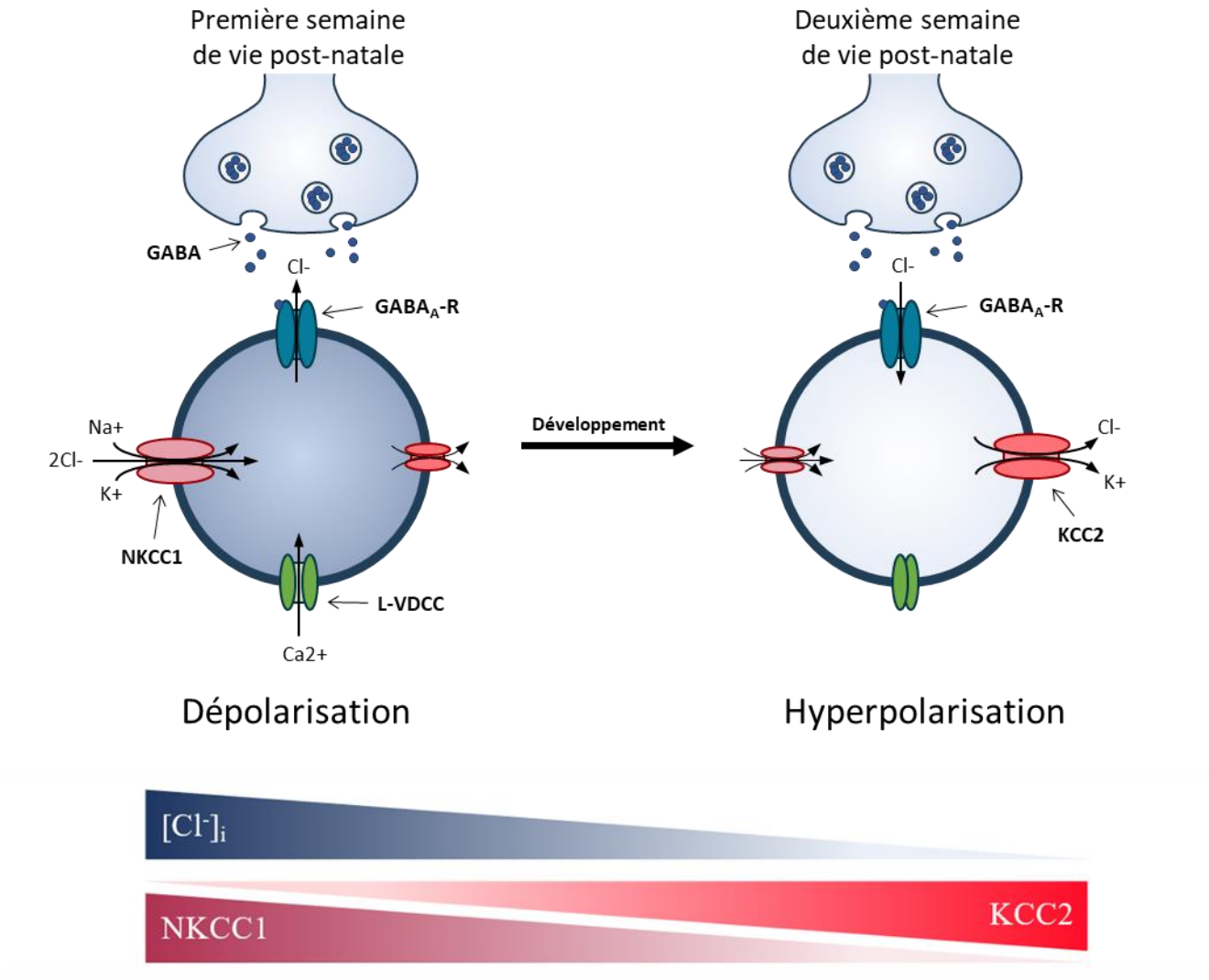


Figure I.20 : Transition de l'effet du GABA dépolarisant à hyperpolarisant

Au cours de la première semaine de vie postnatale, la concentration intracellulaire en chlore ([Cl-]i) est supérieure à celle extracellulaire. Cela est dû à la forte expression du co-transporteur membranaire Na+/K+/Cl- type 1 (NKCC1) qui permet l'entrée de deux ions Cl-. Ainsi la fixation du GABA sur le récepteur ionotropique $GABA_AR$ provoque la sortie de Cl- qui va induire la dépolarisation du neurone. Dans ces conditions, le GABA est dépolarisant. La dépolarisation du neurone conduit à une augmentation du potentiel de membrane entrainant l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants de type L (VDCC) permettant l'entrée de calcium (Ca2+). Au cours de la seconde semaine de vie postnatale, l'expression du co-transporteur K+/Cl- type 2 (KCC2), qui expulse 1 ion Cl-, est supérieure à NKCC1. Ainsi la [Cl-]i est inférieure à la concentration extracellulaire. La fixation du GABA sur le GABAAR entraîne alors une entrée de Cl- dans la cellule. Le GABA est ainsi hyperpolarisant. *Adapté de la thèse d'E. Leprince.*

Cependant, ce schéma "GABA dépolarisant" durant les premières semaines de vie est un sujet très controversé. En effet, In-vitro, Dzhala et ses collaborateurs (Dzhala et al. 2012) montrent que la concentration de Cl- intracellulaire est fortement influencée par les dommages générés par la section des tranches. Celle-ci est plus forte dans les cellules proches de la surface des tranches que dans les cellules profondes, qui sont plus intactes. Plus tard, Glykys et Staley (2016), montrent, en tenant compte de ce facteur lésionnel, que l'âge contribue toutefois à la diminution du Cl- intracellulaire (Glykys and Staley 2016). In-vivo, l'étude de Kirmse et al. (Kirmse et al. 2015) montre que bien que le GABA ait un effet légèrement dépolarisant sur les cellules du cortex à P3-P4, il n'est pas démontré que cet effet soit excitateur : l'activation des synapses GABAergiques ne déclenche pas à elle seule des potentiels d'action (Kirmse et al. 2015). De plus, les antagonistes GABAergiques augmentent

l'activité corticale in-vivo, tandis que les agonistes la bloquent (Kirmse et al. 2015), ce qui suggère que l'effet principal du GABA sur les réseaux corticaux immatures soit d'inhiber leur activité (Kirmse, 2007). De même, dans l'hippocampe néonatal, la stimulation optogénétique des neurones GABAergiques réduit les potentiels post-synaptiques excitateurs enregistrés en patch-clamp in-vivo. Toutefois, Murata et Colonnese (Murata and Colonnese 2020), en utilisant une approche DREAD, suggèrent qu'à P3, mais pas à P7, l'activation des neurones GABAergiques augmenterait l'activité unitaire hippocampique. Contrairement aux études précédentes, ils suggèrent donc que le GABA serait excitateur dans l'hippocampe néonatal. Cependant, leur technique ne différenciant pas le type cellulaire enregistré en extracellulaire, il est malheureusement impossible de déterminer si cette augmentation concerne les neurones GABAergiques (directement causée par l'activation DREADD[4]) ou les neurones Glutamatergiques (par action du GABA).

Toutefois, le GABA pourrait avoir un effet excitateur sur certaines cellules et inhibiteur sur d'autres en fonction de leur stade de maturation à un âge donné. En effet, il est possible que la concentration du Cl- dans une cellule dépende de son stade de maturation et de l'état de maturation de la structure dans laquelle elle se trouve plutôt que de l'âge global de l'individu. Par exemple, à un âge donné, l'impact du GABA sur une cellule néocorticale sera différent de celui observé sur une cellule hippocampique (Murata and Colonnese 2020). De même cet impact est probablement différent selon que l'on considère une cellule générée tôt ou une cellule plus jeune, ces cellules ayant probablement une expression différente des transporteurs du Cl- à un temps donné (Villette et al. 2016). On le voit donc bien ici, l'action du GABA pendant le développement et les mécanismes sous-jacents restent encore à élucider.

B- DEVELOPPEMENT DE LA CONNECTIVITE DE CA1

Une fois arrivés à leur destination finale dans la région de CA1, les neurones poursuivent leur maturation en établissant des connexions synaptiques fonctionnelles, localement et avec les structures externes, de sorte à sous-tendre les fonctions cognitives de l'hippocampe.

Dans cette partie, nous allons voir que la chronologie du développement de la connectivité dans la région de CA1 n'est pas la même entre les connexions récurrentes locales et les entrées extra- et intra-hippocampiques. En effet, la connectivité intra- et extra- hippocampique est la première à se mettre en place dès la période embryonnaire tandis que les connexions entre les neurones locaux de CA1 se mettent en place durant les premières semaines postnatales.

1) Mise en place de la connectivité extra-hippocampique

Des projections en provenance des structures corticales et sous-corticales innervent la région de CA1 dès la période embryonnaire, bien avant celles venant de CA3 et de l'émergence de la connectivité locale de CA1 (Cossart and Khazipov, 2021).

[4] Outil chémogénétique où un récepteur muscarinique modifié M4 ou M3 couplé à la protéine G (hM4D(Gi) ou hM3D(Gi)), aussi appelé récepteur DREADD (‘’ *’Designer Receptor Exclusively Activated by Designer Drugs’’)*, qui permet l'inhibition ou l'activation des neurones l'exprimant lors de la fixation de son ligand synthétique, la Clozapine-N-Oxyde (CNO).

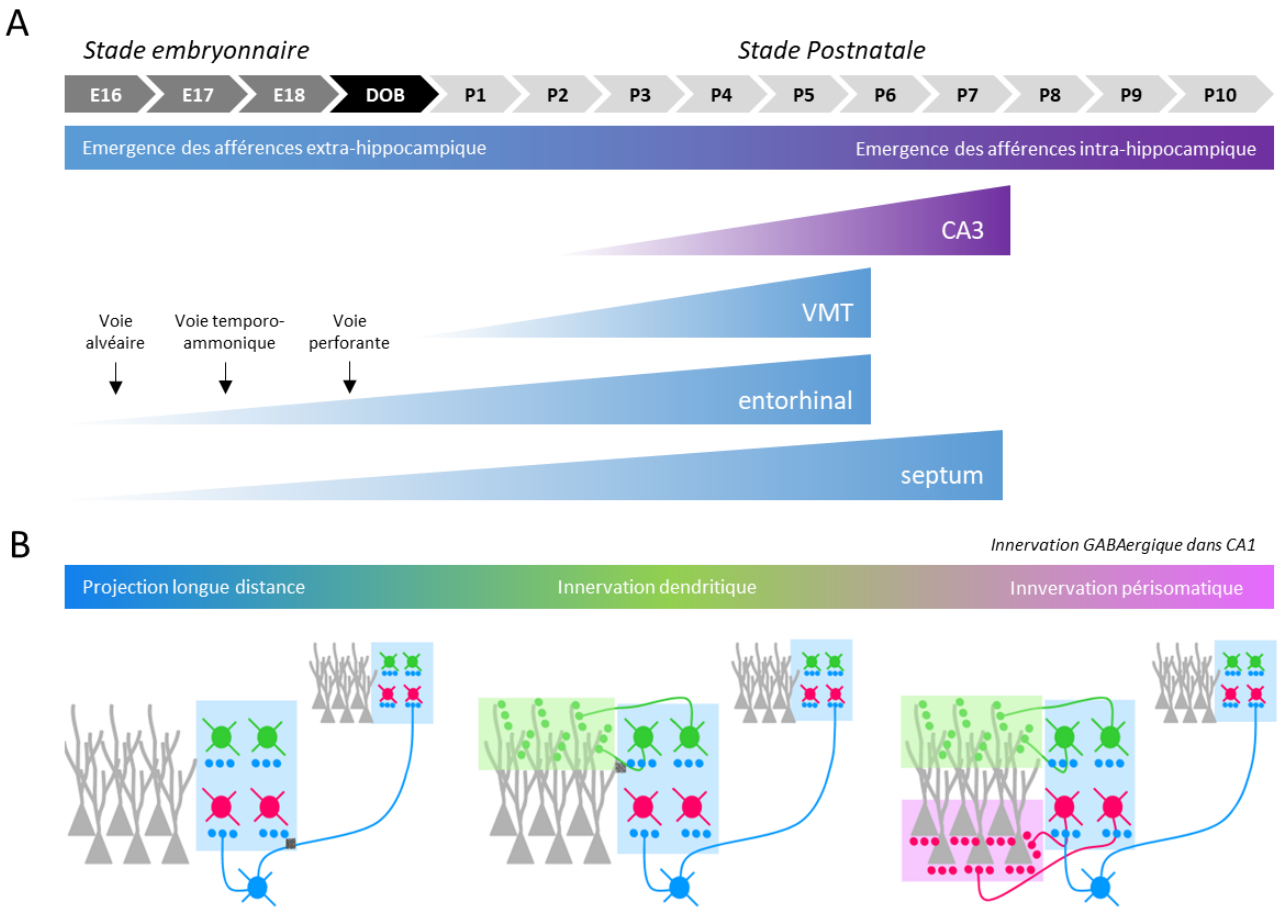


Figure I.21 : Chronologie du développement de la connectivité anatomique dans la région de CA1

Les connexions extra-hippocampiques glutamatergiques (en A, en bleu) et GABAergiques à longue distance (en B, à gauche) se mettent en place avant les afférences intra-hippocampiques dans la région de CA1 (en A en violet et en B au centre et droite). Les projections du EC et du septum (glutamatergiques et longue distance GABAergiques) se mettent en place dès E16, alors que les afférences du VMT innervent la région de CA1 vers P1. L'innervation intra hippocampique se met en place après la naissance de l'animal. Les afférences glutamatergiques de CA3 se projettent vers CA1 à partir de P2. En début de première semaine de vie postnatale, les afférences GABAergiques locales projettent d'abord sur les dendrites des neurones pyramidaux, puis sur les somas vers P7. *D'après Cossart et Khazipov, 2021*

a. Connexions entorhino-hippocampiques

Dans la région de CA1, les premières fibres provenant du EC sont observées au niveau de la voie alvéaire à E16, puis commencent à être visibles dans le SLM à partir de E17 (via la voie temporo-ammonique) (Supèr and Soriano, 1994; Deng et al., 2007) (**Figure I.21**). La densité des axones entorhinaux qui projettent dans l'hippocampe augmente au cours de la première semaine postnatale et la maturation de ces afférences se poursuit jusqu'à P5. Quant aux projections du EC dans le GD via la voie perforante, elles ne sont présentes qu'à partir de E19. L'innervation précoce de CA1 par le EC par rapport au GD est surprenante compte tenu du fait que les cellules étoilées de la couche II du EC, se projettent sur le GD, arrivent à maturité bien avant les cellules pyramidales du EC qui projettent dans CA1 (Donato et al., 2017).

Bien que les projections du EC soient déjà présentes dans le SLM de CA1 dès la période embryonnaire, les dendrites apicales des neurones pyramidaux, qui sont leurs principales cibles, ne se développent qu'après la

naissance (Supèr et al., 1998; Tyzio et al., 1999). À ce stade précoce du développement, les projections du EC établissent alors des connexions avec les neurones GABAergiques et les Cajal-Retzius (CRs) présents dans le SLM (Anstotz et al., 2018 ; 2016). En retour, les CRs envoient des projections axonales vers le EC dès E17. Ainsi, les cellules de CRs jouent le rôle de relais transitoire permettant le développement des connexions du EC vers le SLM de CA1 (Supèr et al., 1998; Squarzoni et al., 2015). En effet, comme nous l'avons vu précédemment, ces cellules générées tôt (E9-E11) sont impliquées dans le développement des régions corticales via la sécrétion de Reelin. Dans l'hippocampe, il a été montré, sur des cultures organotypiques, que la suppression des CRs perturbe la formation des connexions du EC vers CA1 (del Río et al., 1997). Des défauts de ces connexions ont également été rapportés in vivo, de P2 à l'âge adulte, chez des souris reeler (porteuses de la mutation du gène codant pour la Reelin). Dans cette lignée, une diminution de la longueur des collatérales et de la densité des terminaisons axonales provenant du EC dans le SLM de CA1 a été observée (Borrell et al., 1999; Deller et al., 1999). Ainsi, via la sécrétion de Reelin, les CRs participent au développement des connexions du EC vers le SLM de CA1.

Sur le plan fonctionnel, au cours de la première semaine postnatale, l'activation des neurones du LEC et de MEC précède l'émergence d'activités de réseau dans l'hippocampe (Hartung et al., 2016 ; Valeeva et al., 2019). Cela suggère que, dès la naissance, les connexions entorhino-hippocampiques participent à la dynamique du réseau de CA1.

b. Connexions thalamo-hippocampiques

Les cellules glutamatergiques du VMT sont générées tardivement durant la neurogenèse (E16-E17) et les afférences en provenance de cette structure atteignent le SLM de CA1 au début de première semaine postnatale aux alentours de P1 (Bayer and Altman, 1987 ; Hartung et al., 2016) (**Figure I.21**). Des études récentes mettent en évidence l'influence des connexions thalamo-hippocampiques sur l'activité de réseau de CA1 au cours du développement. Hartung et al. (2016) proposent que, dès la fin de la première semaine de vie postnatale, le mPFC modulerait indirectement la dynamique de CA1 via le VMT (Hartung et al., 2016). En effet, les auteurs décrivent un fort couplage des activités entre le mPFC et le VMT où l'activation du mPFC précède celle dans le VMT. L'étude cross-corrélative des activités entre le VMT et CA1 montre que l'information transite dans le sens thalamo-hippocampique. De plus, Leprince et al. ont montré que, à ces stades précoces du développement, les afférences du VMT ciblent préférentiellement les neurones GABAergiques (les neuroglialforms) situés dans le SLM dans la partie distale de CA1 et que ces entrées participent à la dynamique précoce des réseaux de CA1 (Leprince et al. 2023).

c. Autres connexions extra-hippocampiques (septum, etc…)

Chez les rongeurs, les afférences provenant du septum arrivent dans l'hippocampe à partir de E16 et ciblent d'abord les neurones GABAergiques de CA1 (Supèr and Soriano, 1994), puis les cellules pyramidales à partir de E17 (**Figure I.21**). Comme pour les afférences du EC, les projections septales continuent leur maturation après la naissance, en particulier celles qui projettent vers le sr et le SLM, atteignant leur pattern adulte dès P10.

En plus des projections extra-hippocampiques GABAergiques et glutamatergiques, les afférences cholinergiques, dopaminergiques et sérotoninergiques, provenant de structures sous-corticales, se développent à des stades postnataux précoces, où elles influencent également les circuits locaux (Moudy et al., 1993; Magueresse et al., 2006; Maddaloni et al., 2017).

Enfin, les projections commissurales, connectant les hippocampes des deux hémisphères, semblent se développer principalement entre E18 et P5. Ces connexions s'établissent d'abord au niveau dorsal puis dans la partie ventrale (Supèr and Soriano, 1994).

2) Mise en place de la connectivité local de la région de CA1

Dans la région de CA1, les connexions récurrentes locales se mettent en place lors de la première semaine de vie postnatale. De P0 à P2, les premières activités de réseau sont supportées majoritairement par des synapses électriques constituées par des jonctions GAP (Crépel et al., 2007). A cette même période, 20% des neurones pyramidaux forment également des synapses chimiques fonctionnelles avec des neurones GABAergiques (Tyzio et al., 1999).

Les synapses GABAergiques sont fonctionnelles avant les synapses glutamatergiques. Les contacts GABAergiques se forment d'abord sur le compartiment dendritique des cellules pyramidales puis au niveau péri-somatique à la fin de la première semaine postnatale (Dard et al. 2022 ; Marty et al., 2002; Tyzio et al., 1999) (**Figure I.21**). C'est le cas, par exemple, des neurones GABAergiques exprimant la CCK qui connectent les cellules pyramidales au niveau de leur soma et des dendrites proximales à partir de P4. C'est aussi le cas des neurones GABAergiques exprimant la PV dont l'innervation péri-somatique commence à apparaître durant la deuxième semaine de vie (Dard et al. 2022 ; Morozov and Freund, 2003). Fait intéressant, le ciblage transitoire des neurones GABAergiques à somatostatine par des afférences thalamiques précoces contribue à l'émergence de l'inhibition péri-somatique (Marques-Smith et al. 2016 ; Tuncdemir et al. 2016). Par conséquent, l'activation extra-hippocampique des neurones GABAergiques à somatostatine, favoriserait le développement des synapses GABAergiques péri-somatiques, en particulier celles associées aux neurones GABAergiques exprimant la PV.

Toutefois, des synapses fonctionnelles glutamatergiques sont également observées dès P0 mais uniquement sur les neurones pyramidaux de CA1 dont les dendrites apicales atteignent la SLM (Tyzio et al. 1999). Ces synapses correspondent aux projections venant du EC qui, comme nous l'avons vu, se mettent en place dès la période embryonnaire. Nous verrons plus loin que l'activation directe du EC, est cruciale pour la génération des activités spontanées néonatales dans CA1. Les connexions synaptiques fonctionnelles entre la région de CA3 et CA1, via les collatérales de Schaffer, se mettraient en place uniquement à partir de P2. Ces synapses premières seraient des synapses "silencieuses", c'est-à-dire qu'elles ne s'activeraient que grâce à l'ouverture des récepteurs NMDA, elle-même rendue possible par le GABA dépolarisant (Durand et al., 1996). La densité de ces projections augmente durant la seconde semaine postnatale et jusqu'à l'âge adulte (Gómez-Di Cesare et al., 1997). Durant la deuxième semaine postnatale (entre P6 et P10), la densité de synapses chimiques GABAergiques et glutamatergiques dans la région de CA1 augmente (**Figure I.23B**). Cela entraîne des modifications au niveau de l'activité de réseau. L'application d'antagonistes spécifiques des récepteurs $GABA_A$-R, AMPA et NMDA induit une diminution de la dynamique de CA1 (Crépel et al., 2007).

Le degré de connectivité des neurones GABAergiques de l'hippocampe est dépendant de leur date de genèse (Picardo et al., 2011; Bocchio et al., 2020). En effet, les neurones pionniers issus de la MGE présentent une plus grande couverture axonale que les neurones générés plus tard. Ces neurones reçoivent également plus d'entrées synaptiques excitatrices. Nous verrons plus loin dans ce manuscrit, que ces neurones GABAergiques pionniers jouent un rôle important dans la synchronisation de l'activité néonatale in vitro.

Concernant les Cajal-Retzius (CRs), ces cellules établissent des connexions synaptiques avec les neurones immatures locaux dès les premiers jours de vie (**Figure I.22**). En effet, ces cellules reçoivent principalement des

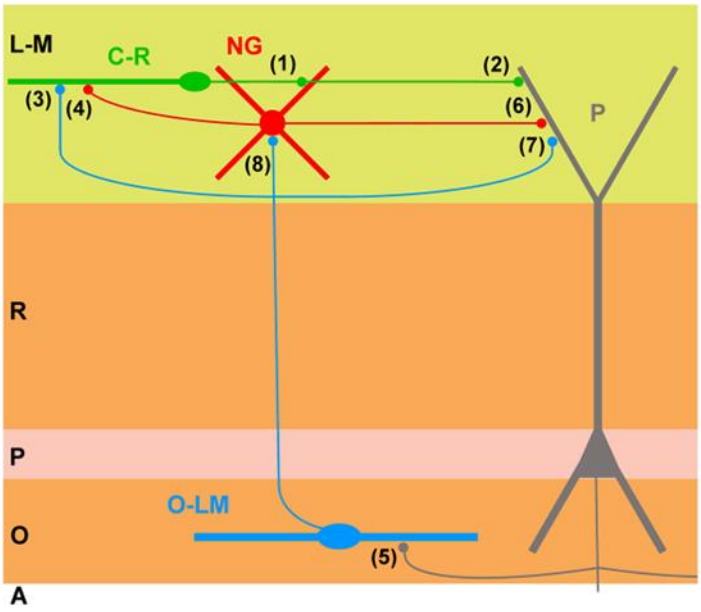


Figure I.22 : La connectivité des Cajal-Retzius dans l'hippocampe en développement

Représentation schématique de la connectivité entre les Cajal-Retzius et les neurones GABAergiques dans la région de CA1. La cellule de Cajal-Retzius (en vert, C-R) connecte les neurones neurogliaformes (NG, en rouge) et les cellules pyramidales (P, en gris) (1 et 2). En retour, les Cajal-Retzius reçoivent des connexions en provenance des interneurones O-LM (en bleu) et des cellules neurogliaformes (3 et 4). D'autres connexions sont également représentées : entre les cellules pyramidales et les interneurones O-LM (5), entre les cellules neurogliaformes et les interneurones O-LM sur les cellules pyramidales (6), ainsi qu'entre les interneurones O-LM et les cellules neurogliaformes (8). *L-M : stratum lacunosum-moleculare ; R : stratum radiatum ; P : stratum pyramidale ; O : stratum oriens ; A : alveus. D'après Anstotz et al. 2018*

afférences synaptiques GABAergiques provenant d'interneurones de CA1 comme les interneurones Neurogliaformes (NGFs) ou les neurones « O-LM » (Oriens – Lacunosum Moleculare) (Marchionni et al., 2010; Quattrocolo and Maccaferri, 2013; Anstötz and Maccaferri, 2020). De plus, il est probable que les CRs reçoivent également des connexions excitatrices provenant du EC puisqu'il a été montré, qu'au cours du développement, les afférences entorhinales contactent de façon transitoire les CRs (Supèr et al., 1998). La connectivité efférente des CRs reste aussi très locale puisqu'elles forment des connexions excitatrices avec les NGFs et les cellules pyramidales au niveau de leurs dendrites distales situées dans la SLM où elles activent les récepteurs postsynaptiques au glutamate de type AMPA et NMDA (Quattrocolo and Maccaferri, 2013, 2014). Les connexions qu'établissent les CRs sur les neurones GABAergiques permettent une levée d'inhibition sur les cellules pyramidales (Quattrocolo and Maccaferri, 2014). Des données structurelles suggèrent que les CRs se projettent également vers des régions éloignées et contribuent au dialogue synaptique bidirectionnel entre l'hippocampe et le EC (Ceranik et al. 1999).

Ainsi, l'émergence de la connectivité dans CA1 se fait progressivement durant le développement. En effet, si des synapses fonctionnelles sont observées entre CA1 et les structures extra-hippocampiques dès le stade embryonnaire (E17), ce n'est pas le cas pour les réseaux locaux où les synapses deviennent fonctionnelles plus tard durant la période postnatale.

Nous verrons dans la partie suivante que l'émergence de ces connexions synaptiques fonctionnelles conduit à une évolution des motifs d'activité néonatale observés dans la région de CA1 durant le développement.

C- EMERGENCE DE L'ACTIVITE DANS LA REGION DE CA1

Le développement anatomique soutient l'émergence de l'activité dans la région de CA1. Durant la période embryonnaire et postnatale, l'activité corticale est dite spontanée car, même si elle est alimentée par des entrées périphériques, cela reste indépendant de stimuli sensoriels de l'environnement. Dans l'hippocampe immature, la dynamique de la région de CA1 évolue au cours du développement en lien avec la maturation de la connectivité locale. Plusieurs types d'activités spontanées sont alors observées et s'organisent de façon séquentielle lors du développement périnatal de l'activité.

1) Activités des réseaux immatures in-vitro

Historiquement, les premières études des activités périnatales ont été réalisées in vitro. Les enregistrements sur tranches, via des techniques d'imagerie et électrophysiologiques, permettent d'observer l'activité des réseaux immatures dès la période embryonnaire.

Dans cette section, nous verrons que les activités de réseau locales de CA1 se développent séquentiellement durant la période périnatale. En effet, différents motifs d'activité néonatale sont observés reflétant le niveau de connectivité locale de la région de CA1. (**Figure I.23A et B**)

a. Activité spontanée non-corrélée

Au cours des premiers stades du développement (à partir de E16 jusqu'à P2 environ) l'activité corticale est majoritairement aléatoire. On observe à ces âges des pics de calcium sporadiques faiblement corrélés entre les neurones (Crépel et al., 2007 ; Allène et al., 2008; Bortone and Polleux, 2009 ; Komuro and Rakic, 1996) (**Figure I.23C,D et E**). Les enregistrements en mode "current-clamp" des neurones actifs à ces âges ont révélé que ces événements de calcium correspondaient à des potentiels d'action immatures (Allène et al., 2008).

Pendant la période embryonnaire, les synapses électriques ou chimiques fonctionnelles entre les neurones sont extrêmement rares. Ces activités non synaptiques très lentes sont donc médiées par l'effet paracrine du glutamate et du GABA (Owens et coll., 2000). En effet, les neurones immatures expriment des récepteurs aux GABA et aux glutamates bien avant la formation des synapses (Manent et al., 2005). Ainsi, le GABA et le glutamate, libérés dans le milieu extracellulaire à ces stades précoces du développement, entraînent des changements de concentration calcique intracellulaire dans les neurones. Ces transitions calciques, indépendantes de l'activité électrique, nécessitent la libération de calcium à partir des réserves intracellulaires (Owens et coll., 2000 ; Spitzer 2006). Nous verrons plus loin dans ce manuscrit que cette activité non-synaptique est impliquée dans les processus de différenciation et de migration neuronales (Komuro and Rakic, 1996; Manent et al., 2005, 2006 ; Owens et coll., 2000 ; Spitzer 2006).

Après la naissance (entre P0 et P3), un plus grand nombre de cellules génèrent des pics de calcium, mais un autre patron d'activité, caractérisé par des plateaux synchrones de calcium apparaît dans environ un tiers des cellules actives (Allene et al., 2008).

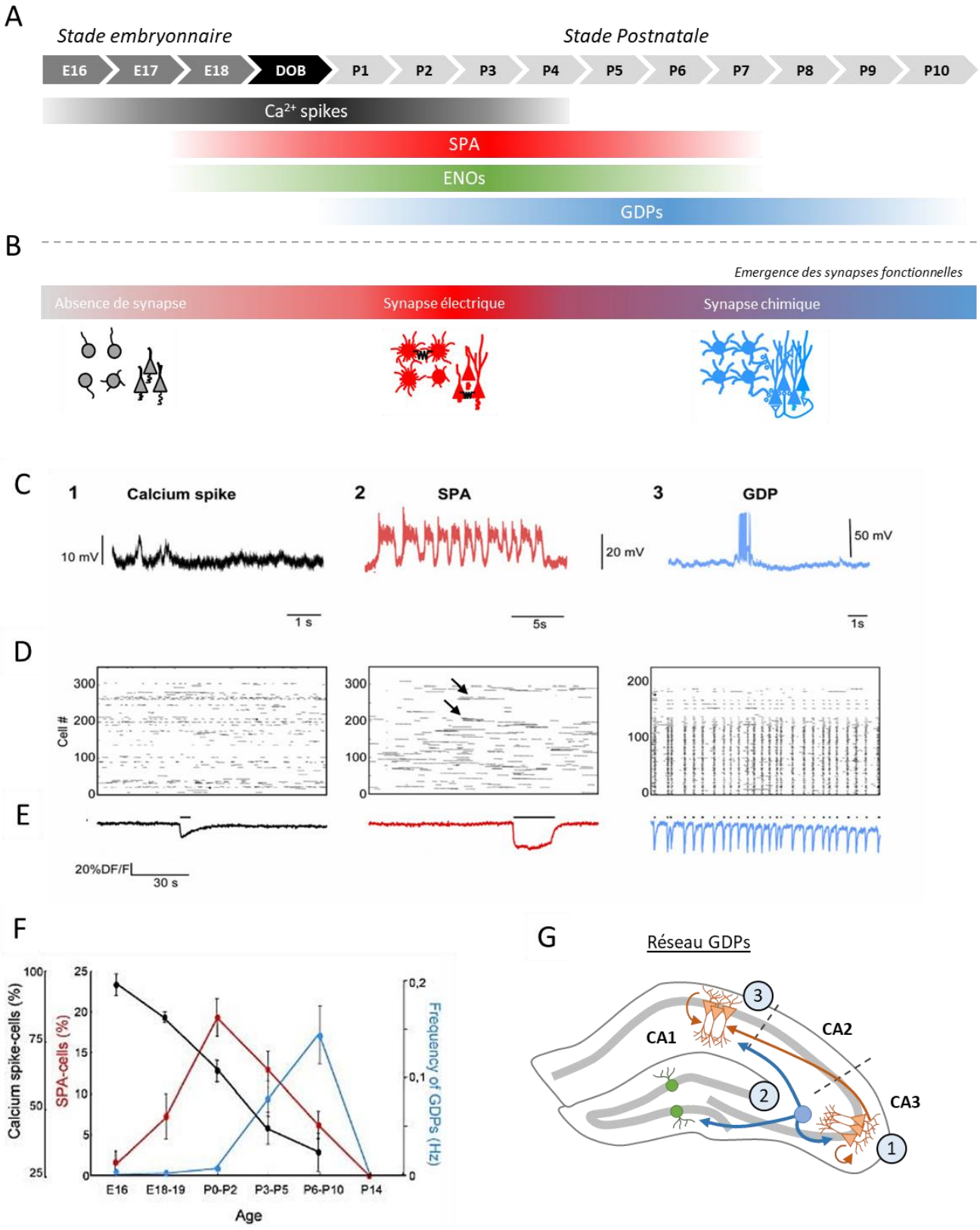


Figure I.23 : Développement de l'activité neuronale néonatale dans la région de CA1 in vitro

A. Evolution chronologique de l'activité neuronale in vitro. Différents patrons d'activités sont observés durant la période péri-natale : les potentiels d'action calcique (« Ca2+ spikes », noir), les assemblées de plateau synchrone ou SPAs (« Synchronous Plateau Assemblies », rouge), les oscillations précoces du réseau ou ENOs (« Early network oscillations », vert) et les potentiels

dépolarisants géants ou GDPs (« Giant Depolarizing Potentials », bleu). **B.** Evolution chronologique de la connectivité synaptique. Durant la période embryonnaire, les connexions synaptiques sont absentes, puis pendant la période périnatale les connexions établies entre les neurones sont majoritairement électriques puis deviennent chimiques. **C.** Représentation de l'activité des neurones au cours du temps obtenue à la suite d'enregistrements en intracellulaires et en imagerie calcique (D et E) dans la région de CA1. **D.** Chaque ligne correspond à l'activité d'une cellule. (1) Les potentiels d'action calcique correspondent à une activité spontanée non-corrélée liée à une faible connectivité entre les neurones. (2) Les SPAs se caractérisent par de longs plateaux calciques synchrones entre un petit groupe de neurones « géographiquement » proches connectés via des synapses électriques. (3) L'apparition des synapses chimiques en fin de première semaine de vie postnatale permet l'émergence des GDPs. Cette activité correspond à une activation synchrone de la quasi-totalité des cellules. **E.** Intensité de fluorescence d'une cellule en fonction du temps. 1) Activités calciques spontanées non synchrones; 2) SPAs; 3) GDPs. **F.** Evolution temporelle des motifs d'activité in vitro au cours du développement de la région de CA1. Les potentiels d'action calciques représentent l'activité principale durant la période embryonnaire, puis disparaissent lentement au cours du développement postnatal. Après la naissance de l'animal, les SPAs correspondent au motif d'activité de réseau principal entre P0 et P2, puis sont remplacés au fur et à mesure par les GDPs. **G.** Modèle de réseau des GDP. Les GDP sont initiés dans le réseau récurrent de CA3 (1) avec le soutien des interneurones GABAergiques (INs) (2) et sont ensuite transmis vers CA1 via les collatérales de Schaffer et les projections GABAergiques (3), ainsi que vers le gyrus denté via des projections GABAergiques. DG, gyrus denté. *Adapté de Cossart et Khazipov, 2022 ; Crépel et al., 2007 ; Crépel et al., 2010*

b. SPA - « Synchronous Plateau Assemblies »

Les assemblées de plateau synchrones (« Synchronous Plateau Assemblies », SPAs) apparaissent pendant la période périnatale et correspondent à la première forme d'activité spontanée coordonnée observée dans l'hippocampe postnatal (Crépel et al., 2007; Villette et al., 2016). Les SPAs sont des synchronisations locales enregistrées sur des tranches in vitro et représentent une étape générale dans l'évolution de l'activité neuronale spontanée puisque des motifs similaires sont rapportés dans le néocortex en développement et le striatum (Allène et al., 2008 ; Dehorter et al., 2011).

Les SPAs sont caractérisées par de longs plateaux calciques synchrones qui durent environ dix secondes pendant lesquels les neurones déchargent de façon récurrente (Crépel et al., 2007) (**Figure I.23C, D et E**). L'émergence de ces oscillations se fait par l'intermédiaire de synapses électriques, appelées « jonctions gap », reliant et synchronisant des petits groupes de neurones proches entre eux et fonctionnellement corrélés (formant une « assemblée de neurones »). Ces oscillations sont dépendantes du voltage puisqu'elles reposent sur l'activation des canaux Ih et calciques de type L (Crépel et al., 2007). En effet, cette synchronisation est indépendante de la transmission synaptique chimique, car lorsque celle-ci est bloquée pharmacologiquement, on observe toujours la présence de SPAs dans le réseau (Allene et al., 2012; Crépel et al., 2007).

Quelques jours après la naissance, les SPAs sont progressivement arrêtées par l'émergence des synapses chimiques, et notamment GABAergiques aboutissant à l'apparition d'un nouveau motif d'activité de réseau que nous présenterons plus loin : les potentiels dépolarisants géants ou GDPs (« Giant Depolarizing Potentials ») (Allène et al. 2012). Pendant une période restreinte, ces deux patterns d'activité, SPA et GDP, coexistent (**Figure I.23F**) et il est probable que pour chaque neurone individuel, le déroulement temporel de son recrutement dans les SPAs puis dans les GDPs soit intrinsèquement déterminé par sa date de naissance (Allène et al. 2012). Ainsi, plus un neurone est généré tôt, plus son recrutement dans les GDPs serait précoce. De plus, les neurones GABAergiques sont davantage impliqués dans les GDPs et moins dans les SPAs. A mesure que le réseau mature, des changements développementaux dans les propriétés morpho-physiologiques des neurones GABAergiques se produisent, marquant l'émergence des oscillations de réseau induites par une transmission synaptique chimique. La transition entre les SPAs et les GDPs apparaît comme un point de contrôle critique du développement des neurones de CA1 (Crépel et al., 2007).

De plus, pendant la période où les SPAs sont observées, un autre patron d'activité est également décrit (Garaschuk et al., 2000 ; Allene et al., 2008). Ces oscillations neuronales précoces (ENOs), générées par transmission synaptique, peuvent être détectées dans presque tous les neurones même ceux impliqués dans les SPAs qui ont tendance à se synchroniser dans les ENOs.

c. ENOs – « Oscillations précoces du réseau »

Les oscillations précoces du réseau (ENOs) sont des ondes oscillatoires de calcium à basse fréquence (0,01 Hz) présentant une cinétique lente à grande échelle impliquant progressivement l'ensemble du réseau. Ces oscillations calciques sont induites par les synapses glutamatergiques médiées par l'activation des récepteurs NMDA. Durant la période périnatale, les ENOs sont observées grâce à des techniques d'imagerie et des approches électrophysiologiques dans le néocortex et l'hippocampe in vitro ainsi qu'in vivo (Garaschuk et al. 2000 ; Allene et al., 2008, 2010 ; Adelsberger et al., 2005).

Comme les SPAs, les ENOs sont suivies par l'émergence d'un autre modèle d'activité spontanée, les potentiels dépolarisants géants (GDPs), qui diffèrent des ENOs par leur occurrence plus élevée, leur cinétique plus rapide et leur induction par transmission dépolarisante médiée par les synapses GABAergiques (Allene et al., 2008 ; Luhmann et al., 2016). Pendant une période restreinte, ces trois patrons d'activité coexistent dans les réseaux corticaux et sous corticaux immatures. Cette transition entre ENOs/SPAs et GDPs reflète des changements dans la connectivité des réseaux immatures.

Toutefois, il est important de noter que la génération de ENOs est facilitée dans des conditions spécifiques telles que l'anoxie légère ce qui soulève des questions sur la pertinence physiologique des ENOs (Allene et al., 2008, 2010).

d. GDP - « Giant Depolarizing Potentials »

Historiquement, les potentiels dépolarisants géants (« Giant Depolarizing Potentials », GDPs) correspondent aux premiers patrons d'activité de réseau observés. Ils ont été d'abord décrits in-vitro, dans des tranches d'hippocampe de rongeurs durant la période néonatale (Ben-Ari et al., 1989). Ces activités sont caractérisées par la décharge synchrone d'un grand nombre de cellules pyramidales et de neurones GABAergiques (~85 % de la population neuronale) ainsi que d'une élévation du calcium intracellulaire durant plusieurs centaines de millisecondes (~500ms) se produisant à une fréquence de ~10/min (Ben-Ari et al., 1989; Leinekugel et al., 1997) (**Figure I.23C,D et E**). Depuis, ces activités ont été observées dans plusieurs structures corticales et sous-corticales (Allène et al., 2008; Dehorter et al., 2011; Mòdol et al., 2017).

Dans la région de CA1, les GDPs sont observés en fin de première semaine de vie postnatale autour de P5-P7. L'émergence de ces activités spontanées de réseau est soutenue par deux phénomènes développementaux : (1) la polarité de la transmission GABAergique et (2) l'émergence des synapses chimiques GABAergiques et glutamatergiques. Comme décrit précédemment, le GABA exerce une action dépolarisante et excitatrice au cours de la première semaine de vie postnatale liée à une concentration du Cl- intracellulaire supérieure à celle extracellulaire (Ben-Ari et al., 1989; Yamada et al., 2004). L'application d'un antagoniste de NKCC1, la bumétanide, en réduisant la concentration de chlore intracellulaire, supprime les effets dépolarisants et excitateurs du GABA et provoque la suppression des GDPs (Dzhala et al., 2005; Valeeva et al., 2010). De plus, l'apparition des GDPs est également médiée par le développement des synapses chimiques GABAergiques et glutamatergiques. En effet, l'application d'antagonistes des récepteurs ionotropiques du GABA et du glutamate restaure l'activité de type SPAs aux dépens des GDPs (Crépel et al., 2007). Ainsi, la transmission GABAergique est essentielle dans la génération des GDPs en raison de ses actions excitatrices précoces et de sa maturation

avancée par rapport aux synapses glutamatergiques (Ben-Ari et al. 2007). Par conséquent, la participation des neurones aux GDPs décroît à mesure que diminue le nombre de neurones excités par le GABA (Khazipov et al. 2004 ; Garaschuk et al. 1998 ; Tyzio et al. 2007). Cette transition d'un effet excitateur vers un effet inhibiteur du GABA annonce la fin des GDPs durant la deuxième semaine postnatale. Il est également possible que le changement développemental de l'action excitatrice à inhibitrice du GABA soit déterminé par la date de naissance des neurones, comme le montre le cas de cellules GABA nées précocement (Villette et al. 2016). Ainsi, les dates d'entrée et de sortie des circuits GDP pourraient être déterminées individuellement pour chaque neurone en fonction de son âge.

Par ailleurs, avec près de 85 % des cellules actives simultanément, il est très probable que les GDPs soient le reflet d'une période importante pour la mise en place des connexions et leur renforcement. Il a été suggéré que le GDPs seraient essentiels pour la formation des circuits intra-hippocampiques via des phénomènes de plasticité synaptique. Ces activités spontanées de réseau permettraient la transition de synapses silencieuses médiées par les récepteurs NMDA à des synapses fonctionnelles médiées par les récepteurs AMPA/NMDA, et la maturation des synapses GABAergiques (Kasyanov et al., 2004; Mohajerani et al., 2007).

Dans l'hippocampe, les GDPs se propagent principalement de la région de CA3 vers CA1 par les collatérales de Schaffer (**Figure I.23G**). Ainsi près de 80% des GDPs enregistrés dans CA1 sont déclenchés par ceux de CA3 (de la Prida et al., 1998). La région de CA3 constitue une zone favorable à la génération de GDPs en raison de : (1) la quantité relativement élevée de connexions glutamatergiques excitatrices récurrentes entre les cellules pyramidales de CA3, (2) le déclenchement spontané de salves de potentiels d'action chez de nombreux neurones pyramidaux de CA3, soutenu par une conductance sodique persistante et une faible expression des canaux potassiques impliqués dans le courant Im (Sipilä et al., 2005, 2006; Valeeva et al., 2010) et (3) la présence de neurones GABAergiques hautement connectés appelés « hub » (Bonifazi et al., 2009). Cependant, 20% des GDPs sont également générés localement dans la région de CA1, indépendamment de la région de CA3, et se propagent vers CA3 (de la Prida et al., 1998 ; Sipilä et al., 2005 ; Valeeva et al., 2010). Cette rétropropagation des GDPs peut être soutenue par l'activation des cellules « hub » GABAergiques de CA1 qui présentent une morphologie axonale étendue (Bocchio et al. 2020).

Ces neurones GABAergiques hub semblent jouer un rôle clé dans la coordination de la dynamique des réseaux hippocampiques in vitro à la fin de la première semaine postnatale chez les rongeurs (Bonifazi et al., 2009). Ces cellules sont caractérisées par : (1) une connectivité fonctionnelle efférente élevée, ce qui se traduit par une activation avant la plupart des cellules du réseau, (2) une connectivité effective élevée puisque leur stimulation affecte de manière significative la dynamique du réseau, (3) une forte connectivité anatomique, avec une arborisation axonale étendue se projetant dans l'ensemble de la région hippocampique, (4) une connectivité afférente élevée car elles reçoivent plus de potentiels postsynaptiques excitateurs et présentent un seuil de génération de potentiels d'action plus bas que les autres neurones GABAergiques (Bonifazi et al., 2009) (**Figure I.24**). Les cellules hub sont spontanément actives au début des GDPs, ont de nombreuses cibles postsynaptiques et leur stimulation entraîne le plus souvent une diminution de la fréquence des GDPs (**Figure I.24C, D et E**). De plus, des expériences de cartographie génétique ont montré que les neurones GABAergiques générés tôt de la région de CA1 et CA3 faisaient partie de la sous-population de neurones « hub » (Picardo et al., 2011; Villette et al., 2016; Bocchio et al., 2020).

Ainsi, l'ensemble de ces travaux montre que les GDPs correspondent à une activité de réseau spontanée qui est déclenchée et modulée par des cellules locales au sein de la région CA3. Cependant, ces activités de réseau (tout comme les SPAs et ENOs) ont été décrites sur des tranches in vitro, c'est-à-dire dans des conditions artificielles où le réseau hippocampique est privé de l'influence des afférences externes. Par conséquent, il est impossible de connaître l'éventuelle implication de structures extra-hippocampiques dans la modulation des GDPs de CA1 et qui pourrait ainsi participer au développement de la dynamique hippocampique. Il est donc

essentiel de savoir si un schéma homologue impliquant des circuits et des dynamiques similaires peut être observé in vivo.

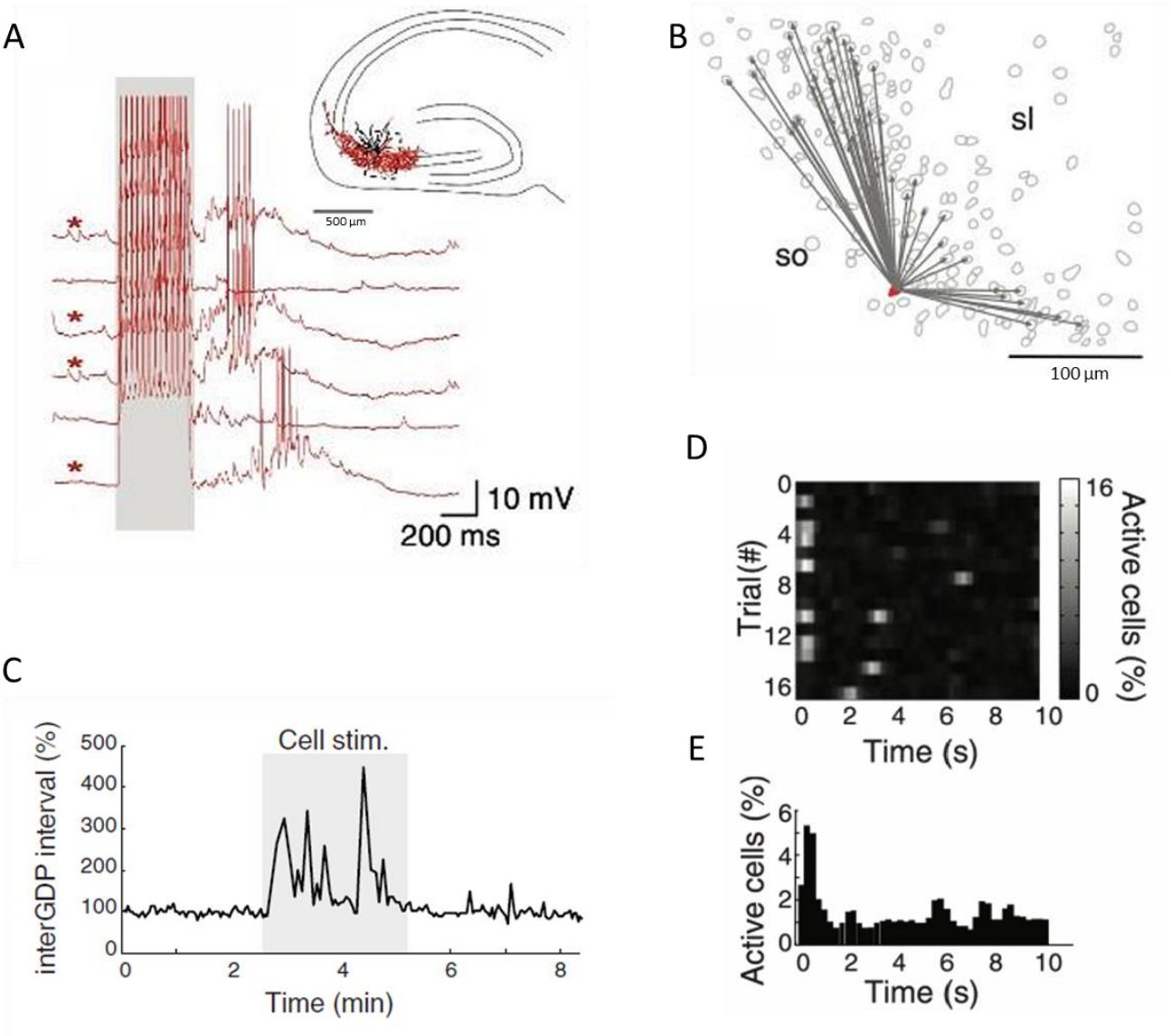


Figure I.24 : Contribution des neurones GABAergiques « hub » dans la modulation de l'activité neuronale in vitro.

A. En haut à droite, reconstruction d'un neurone « hub » GABAergique (axone en rouge et dendrites en noir) sur une représentation schématique de l'hippocampe. À gauche, enregistrements des potentiels d'action émis par un neurone hub suite à la stimulation de cette cellule (en gris). Quatre essais sur six ont déclenché des GDPs (*). **B.** Cartographie des neurones (cercles gris) présents dans le champ d'imagerie calcique de la région de CA3 montrant les connexions efférentes fonctionnelles (lignes grises) entre un neurone à forte connectivité fonctionnelle (en rouge) avec les autres neurones du réseau. **C.** Stimulation des neurones « hub » GABAergiques (zone grise) modulant la fréquence des GDPs. Le graphique représente l'intervalle de temps entre les GDPs normalisé en fonction du temps. Les valeurs sont exprimées par rapport à l'intervalle de temps moyen entre les GDPs calculé avant la période de stimulation. Dans cet exemple, la stimulation d'un neurone « hub » entraine une augmentation de l'intervalle entre les GDPs et donc ralentit leur fréquence. **D.** Stimulation des neurones « hub » GABAergiques déclenche les GDPs. La fraction de cellules actives au cours du temps après chaque stimulation (stimulation : t=0) montre que 7 fois sur 16, la stimulation d'un neurone « hub » GABAergique déclenche un GDP. Chaque ligne représente un essai. **E.** Histogramme du pourcentage moyen de cellules actives après la stimulation d'un neurone « hub » GABAergique. Le pourcentage de cellules actives est plus élevé après la stimulation. *sl : stratum lucidum ; so : stratum oriens. Adapté de Bonifazi et al., 2009*

2) Activités des réseaux immature in-vivo

En adaptant les techniques traditionnelles d'enregistrement in vitro sur des animaux néonataux vivants, il a été possible d'observer l'activité neuronale précoce dans des conditions in vivo. Ainsi, durant les deux premières semaines postnatales, des activités de réseau, similaires aux GDPs in vitro, ont pu être observées dans les structures corticales en développement. Ces activités spontanées néonatales, caractéristiques des réseaux neuronaux immatures, synchronisent la décharge d'une large population de neurones. Avec la maturation de la connectivité de CA1, ces activités néonatales laissent place à l'émergence des oscillations hippocampiques, conférant à la région de CA1 la capacité d'intégrer et de traiter des informations provenant de stimuli externes, notamment au cours de la période dite « critique ».

Ces activités spontanées néonatales, appelées « early Sharp Waves » (eSPWs), occupent une place centrale dans mon projet de thèse. C'est pourquoi je vais consacrer la première partie de cette section à la description de ces patrons d'activités ainsi qu'aux connaissances que nous avons actuellement concernant la contribution des neurones GABAergiques dans leur genèse et la synchronisation des réseaux. Nous verrons ensuite que l'émergence des oscillations rythmiques de la région de CA1 est étroitement liée à la maturation de la connectivité locale. Ainsi, le réseau hippocampique passe d'une activité discontinue, imposée par la périphérie, à un fonctionnement asynchrone, propice à l'émergence d'activités auto-générées nécessaires aux fonctions cognitives supérieures.

a. eSPWs - « early Sharp Waves »

Les ondes aiguës précoces (« early Sharp Waves », eSPW) sont les premières activités de réseau synchrone observées dans l'hippocampe in vivo (Leinekugel et al. 2002; Karlsson et al. 2006; Mohns et al. 2007; Mohns and Blumberg 2008; Marguet et al. 2015). Ces activités spontanées néonatales sont des événements récurrents non-périodiques enregistrés dans la région de CA1 durant les deux premières semaines postnatales.

Les eSPWs sont caractérisées par des ondes de forte amplitude associées le plus souvent à une activité rythmique de type delta (1-4Hz) - beta (8-20Hz) appelée "tails" durant lesquelles l'activité neuronale augmente. Les ondes associées aux eSPWs et tails s'inversent autour de la couche pyramidale et ont leur plus forte négativité dans la SLM (**Figure I.25A**). De plus, ces activités sont synchronisées entre les deux hippocampes et sont le plus souvent générées dans la partie antérieure. La vitesse de propagation des eSPWs est beaucoup plus rapide que celle des GDPs (250 mm/s pour les eSPWs contre 7-10 mm/s pour les GDPs) et légèrement inférieure à celle des SPWs adultes (350 mm/s).

De par leur ressemblance avec les SPWs adulte ainsi que leur présence à la même période que les GDPs in vitro, les eSPWs ont initialement été considérées comme étant à la fois l'équivalent in vivo des GPDs et l'équivalent immature des SPW-Rs. Cependant, au regard d'études récentes, de nombreux résultats remettent en cause ces équivalences. Tout d'abord, les eSPWs ne sont pas associées à des ripples (oscillations à haute fréquence) contrairement aux SPWs adultes (Leinekugel et al. 2002; Buhl and Buzsaki 2005; Mohns et al. 2007; Marguet et al. 2015). Ensuite, contrairement aux SPWs et aux GDPs, les eSPWs sont majoritairement précédées par des contractions myocloniques involontaires du nouveau-né. Enfin, les profils de densité de courants (CSDs) associés aux eSPWs de CA1 sont caractérisés par deux principaux foyers excitateurs activés simultanément : un provenant du EC dans le SLM, via la voie temporo-ammonique, et l'autre provenant de CA3 dans le stratum Radiatum, via les collatérales de Schaffer (Leinekugel et al. 2002; Mohns et al. 2007, Marguet et al. 2015 ; Valeeva et al., 2019) (**Figure I.25B**). Cette contribution excitatrice d'origine externe, plutôt qu'interne, associée aux eSPWs renforce l'idée que ces activités néonatales sont bien distinctes des GDPs et des SPWs adultes.

i) Origine extra-hippocampique des eSPWs

Chez les rongeurs nouveau-nés, les eSPWs ont une origine extra-hippocampique contrairement aux SPWs adultes et aux GDPs qui sont générés au sein du réseau hippocampique. En effet, des enregistrements simultanés de l'activité extracellulaire dans le EC et la région de CA1 ont permis de montrer que l'activité du EC et celle de l'hippocampe sont fortement corrélées à ces âges et que les bursts d'activité de l'hippocampe sont précédés par ceux du EC d'environ ~30ms et par les contractions myocloniques d'environ 140ms (Valeeva et al., 2019).

Cette idée que les activités entorhinales post-myoclonus atteignent l'hippocampe et qu'elles contribuent fortement aux eSPWs dans CA1 est renforcée par la présence très tôt au cours du développement (dès E16) des projections du EC vers cette région et que des lésions de ces entrées entraînent la suppression de la corrélation myoclonus/eSPWs (Super and Soriano 1994 ; Mohns and Blumberg 2010). Or, à la naissance, les premières synapses fonctionnelles glutamatergiques sont celles en provenance de l'EC qui innervent les neurones pyramidaux matures dont les dendrites apicales atteignent la SLM (Tyzio et al. 1999), mais aussi les neurones GABAergiques et les CRs. Etant donnée que les entrées des collatérales de Schaffer du CA3 vers CA1 apparaissent plus tard (à partir de P2), l'activation directe du EC, via la voie temporo-amonique, semble être essentielle pour la génération des eSPWs.

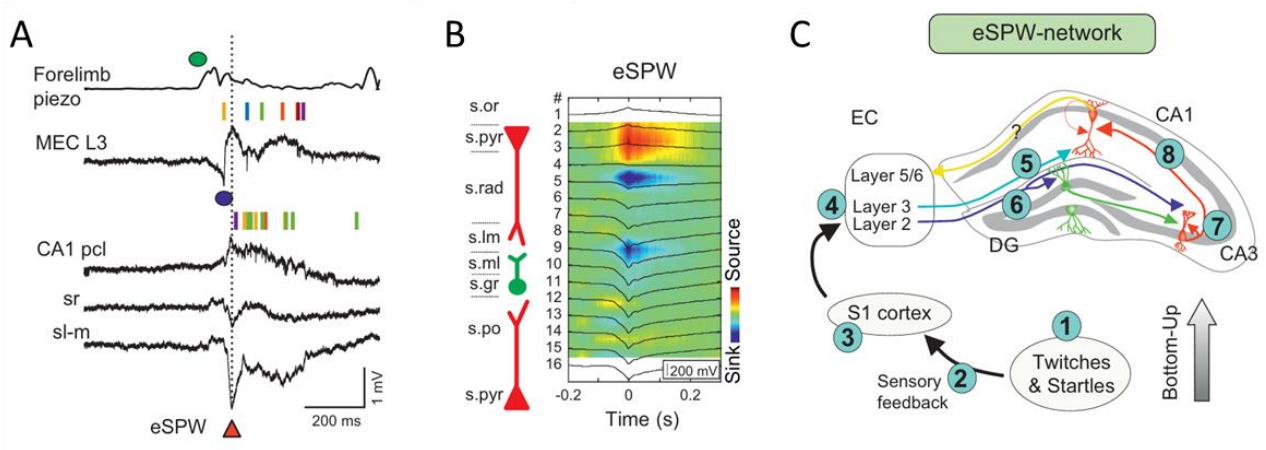


Figure I.25 : Les activités spontanées néonatales in vivo - eSPWs.

A. Signaux enregistrés lors d'un mouvement myoclonique (cercle vert), d'un burst dans le MEC-L3 (cercle bleu) et d'une eSPW (triangle rouge) enregistrée dans la couche de cellules pyramidales de CA1 (pcl), le stratum radiatum (sr ; s. rad) et le stratum lacunosum-moleculare (slm) chez un raton à P5. Les barres verticales colorées au-dessus des traces indiquent l'activité des neurones individuels. **B.** Profils de densité de courants (CSD) correspondant à une eSPW avec les puits les plus marqués dans le sr et autour de la fissure hippocampique. **C.** Représentation du modèle de réseau des eSPWs déclenchées par le mouvement de l'animal nouveau-né. Les mouvements spontanés néonataux (tels que les twitchs et les startles) (1) activent un retour sensoriel (2), qui déclenche des oscillations thalamo-corticales dans le cortex S1 (3). Ces informations sont ensuite transférées aux couches superficielles du EC, où elles déclenchent des bursts d'activité (4). Ces bursts dans l'EC sont ensuite transmis à l'hippocampe : (i) via la voie temporo-ammonique de la couche 3 de MEC vers les dendrites apicales distales des cellules pyramidales de CA1 (5) et (ii) via le chemin perforant de la couche 2 de MEC vers le gyrus denté (DG) (6) et CA3 (7). L'excitation des cellules pyramidales de CA3 active les collatérales de Schaffer (8). Notez que l'activation séquentielle des différentes structures dans ce schéma suit le transfert d'informations ascendant, de la moelle épinière à l'hippocampe. *s. pyr. : stratum pyramidale ; s. gr. : stratum granuleux ; st. or. : stratum oriens. D'après Valeeva et al. 2019*

Sur la base de ces observations, un modèle de réseau sous-tendant les eSPWs dans la région de CA1 a alors été proposé (Valeeva et al., 2019) (**Figure I.25C**). Tout d'abord, (1) les périodes de sommeil actif pendant les stades néonataux chez les rongeurs (et aux stades fœtaux chez l'humain) sont caractérisées par des mouvements myocloniques spontanés de l'animal qui sont soit généralisés à l'ensemble du corps (« startles ») soit confinés à un seul membre (« twitches »). Ces activités myocloniques ont pour origine une boucle somatosensorielle initiée par l'activation de motoneurones dans la moelle épinière induisant des contractions musculaires et, en retour, une activation des neurones sensoriels de la moelle dont l'activité va être transmise au système nerveux central (Blumberg and Lucas 1994 ; Tiriac et al. 2014 ; Inácio et al. 2016). Ainsi, les mouvements myocloniques spontanés induisent un retour sensoriel qui déclenche des bursts d'activité dans le cortex somatosensoriel primaire (S1) (Khazipov et al., 2004 ; Inácio et al. 2016 ; Mohns and Blumberg 2010). Cependant, tous les mouvements myocloniques n'induisent pas d'activité spontanée dans les structures corticales. Selon Bloomberg (Tiriac et al., 2014), il est nécessaire que les mouvements soient inattendus, c'est à dire non associés à une commande volontaire. Les spindles bursts enregistrés dans S1 semblent être principalement générés par le feed-back sensoriel des muscles après activation de la moelle épinière. Ensuite, (2) l'information sensorielle du S1 est conduite jusqu'au MEC où l'on peut enregistrer un burst d'activité constitué d'un potentiel aigu et d'une oscillation bêta-gamma dans cette structure. Cependant, la manière dont le S1 transmet le retour sensoriel des mouvements au EC est encore mal connu. En effet, il n'y a pas d'entrée directe de S1 vers le EC ce qui suggère que d'autres structures intermédiaires comme le cortex périrhinal doivent être impliquées dans cette transmission d'information (Burwell et al. 1998 ; Witter et al. 1989). (3) Les bursts d'activité de la couche 2 et 3 du MEC sont, ensuite, transmis jusqu'à la région de CA1 par deux voies différentes : la voie temporo-ammonique partant de la couche 3 du MEC vers les dendrites apicales distales des cellules pyramidales dans le SLM, et la voie perforante de la couche 2 du MEC vers le DG qui constitue la première synapse de la boucle trisynaptique. (4) Via la boucle trisynaptique, le DG active les neurones de CA3 dont l'excitation est amplifiée par un réseau excitateur récurrent de cette région, de manière similaire à ce qui se produit lors des SPWs adultes (Buzsáki et al. 2015 ; Csicsvari et al. 2000) et des GDPs in vitro (Leinekugel et al. 1997), et va activer à leur tour les neurones de CA1 via les collatérales de Schaffer.

Toutefois, même si les informations sensorielles sont conduites jusqu'à CA1 via le EC, cette région est probablement une station intermédiaire dans le réseau à grande échelle activé par le retour sensoriel des mouvements myocloniques. En effet, l'excitation des neurones de CA1 pendant les eSPWs est ensuite diffusée vers d'autres régions de la formation hippocampique ou encore vers d'autres structures externes.

En plus des projections du EC vers la région de CA1, d'autres entrées extra-hippocampiques pourraient être aussi impliquées dans le lien entre les mouvements et les eSPWs en participant au transfert de l'information sensorielle. C'est notamment le cas pour le VMT qui, comme nous l'avons vu précédemment, se projette également dans le SLM de CA1. En effet, Leprince et al. ont montré que les activités dynamiques précoces dans la région CA1 sont sous influence mixte des entrées entorhinales et thalamiques. In vivo, l'inhibition du VMT et du EC, au cours de la première semaine de vie postnatale, entraîne une diminution de l'activité de réseau dans la région de CA1. Cependant, les bursts de population liée aux mouvements myocloniques détectés in vivo sont exclusivement induits par le EC. Cette différence d'effet peut être expliquée par les différents circuits de CA1 mis en jeu lors de l'activation des afférences du VMT et du EC. Les auteurs ont montré que les entrées du EC ciblent directement les neurones pyramidaux de CA1 alors que le VMT exerce un effet modulateur indirect sur ces cellules par l'activation préférentielle des neurones GABAergiques du SLM de CA1 (Leprince et al. 2023). Ainsi, les afférences extra-hippocampiques provenant du VMT modulent la dynamique de CA1.

De nombreuses autres structures en développement ont leur activité qui est modulée par des activités spontanées induites dans la périphérie. C'est notamment le cas du cortex sensoriel (S1) dont l'activité entre P1 et P8 consiste en des activités de type "Spindle Bursts" (5-25Hz) précédé par des mouvements myocloniques spontanés (Blumberg and Lucas 1994; O'Donovan 1999; Petersson et al. 2003; Khazipov et al. 2004). Dans le

cortex visuel, l'activité néonatale est induite par des vagues d'activité spontanée de la rétine (Hanganu et al. 2006; Colonnese et al. 2010).

ii) Activité des neurones GABAergiques durant les eSPWs

À ces stades précoces du développement, l'activité des neurones de la région de CA1 est caractérisée par une activité dite « discontinue », c'est-à-dire que les neurones déchargent principalement pendant les périodes correspondant aux eSPWs et sont peu actifs le reste du temps (Leinekugel et al. 2002 ; Karlsson et al. 2006 ; Mohns et al. 2007) (**Figure I.26A, B et C**). Cependant, la majorité des études qui ont permis de décrire cette augmentation d'activité in vivo ont été réalisées à partir d'enregistrements électrophysiologiques extracellulaires où l'activité d'une population de neurones dans son ensemble est étudiée. Par conséquent, l'activité de chaque neurone ne peut pas être décrite individuellement lors des eSPWs. L'étude de l'activité d'un type cellulaire spécifique ainsi que la manipulation de leur activité tout en enregistrant celle du réseau dans des conditions in vivo représente un défi technique à des âges aussi précoces. Ainsi, bien que le rôle des neurones GABAergiques soit clairement établi dans la génération de GDPs in vitro, la contribution de ces neurones dans la régulation de l'activité au sein des circuits en développement reste encore aujourd'hui inconnue in vivo.

Toutefois, des études réalisées à partir d'enregistrements électrophysiologiques extracellulaires ont tenté de déterminer si les neurones GABAergiques contribuent à la synchronisation de l'activité neuronale, comme observé in vitro, en manipulant leur activité durant les premières semaines de vie. Cependant, les résultats obtenus n'ont pas été très concluants. En effet, utilisant une approche DREAD, Murata et al. ont montré qu'une diminution de l'excitabilité des neurones GABAergiques hippocampiques a réduit l'amplitude et la fréquence des eSPWs, tandis qu'une augmentation de leur excitabilité n'a pas affecté les eSPWs à P3. À P7, la manipulation de l'excitabilité des neurones GABAergiques dans les deux sens (augmentation et diminution) n'a pas eu d'effet significatif sur les eSPWs (Murata et Colonnese, 2020). En revanche, la manipulation des actions dépolarisantes du GABA via la suppression de NKCC1 dans les neurones glutamatergiques télencéphaliques a réduit les actions excitatrices du GABA in vitro et altéré les GDP dans des tranches d'hippocampe néonatal, mais a eu un impact mineur sur l'activité spontanée corrélée (eSPWs et HBOs) dans l'hippocampe de souris P3-4 in vivo (Graf et al. 2021). Ainsi, la contribution des neurones GABAergiques dans la genèse des eSPWs et leur effet sur les réseaux immatures reste encore mal comprise aujourd'hui.

Récemment, une étude utilisant l'imagerie calcique a permis de décrire l'activité des cellules pyramidales et des neurones GABAergiques de CA1 lors des mouvements myocloniques, qui précèdent les eSPWs enregistrés dans l'hippocampe. Dard et al. (Dard et al. 2022) ont montré que, pendant la première semaine de vie, ces deux types cellulaires augmentent fortement leur activité suite aux mouvements spontanés. Puis, au début de la deuxième semaine de vie, l'activité des cellules pyramidales est modulée négativement par les mouvements spontanés, tandis que l'activité des neurones GABAergiques ne change pas et reste positivement modulée (**Figure I.26 D et E**). Cette transition abrupte de l'activité neuronale de CA1 corrèle avec l'émergence de l'innervation péri-somatique par les neurones GABAergiques dans la couche pyramidale entre P8 et P10 (Marty et al., 2002; Tyzio et al., 1999). Ainsi, la maturation de l'innervation péri-somatique semble être à l'origine de la décorrélation de l'activité des cellules pyramidales et de leur inhibition suite à l'activation des neurones GABAergiques lors des activités spontanées. Cependant, la dynamique temporelle des indicateurs de fluorescence calcique est plus lente que celle des événements électrophysiologiques tels que les PAs. Cela peut être particulièrement problématique pour une activité inhibitrice rapide, qui peut ne pas être détectée lorsqu'elle est entourée d'un tir AP aussi intense que celui observé lors de contractions myocloniques et d'eSPWs. De plus, il existe encore des différences fonctionnelles entre l'activité neuronale enregistrée en électrophysiologie et celle observée en imagerie calcique (Siegle et al., 2021 ; Wei et al., 2020). Par conséquent,

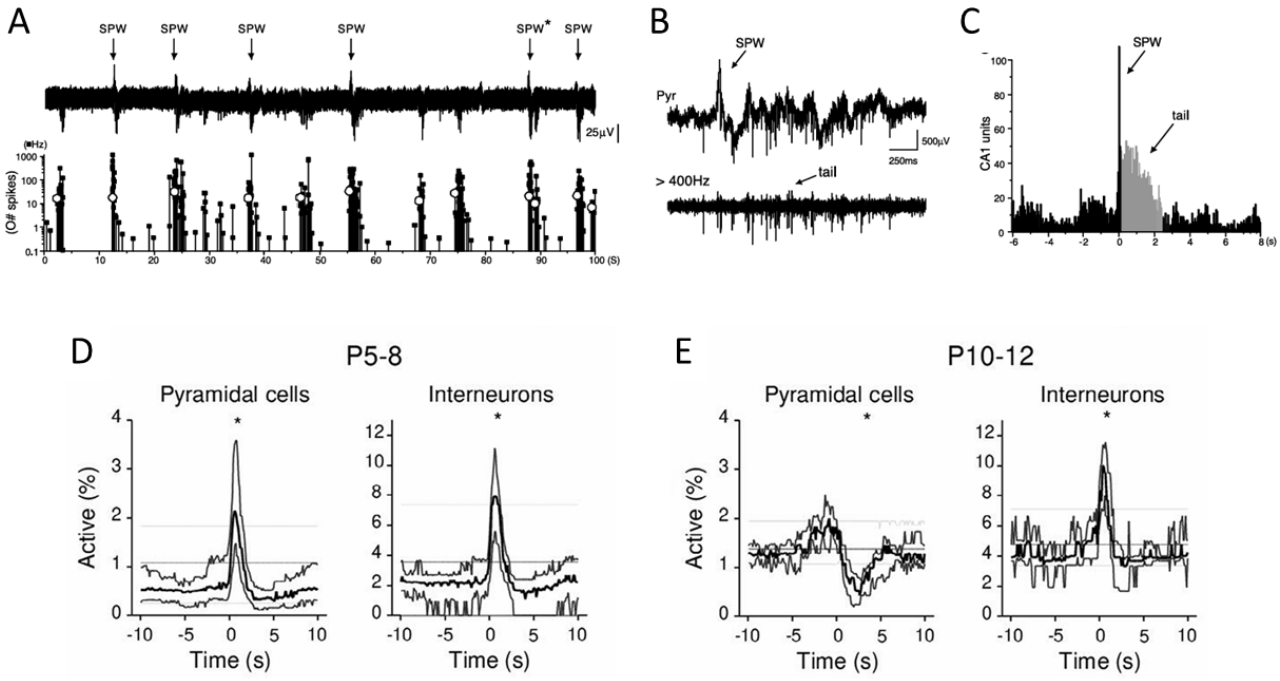


Figure I.26 : L'activité neuronale durant les eSPWs et les Twitchs

A. Signal filtré (à 200 Hz) de l'activité multiunitaire dans la couche pyramidale de la région de CA1. Les flèches indiquent les SPWs. Sous le signal se trouve l'activité multiunitaire au cours du temps. Chaque ligne verticale terminée par un carré noir représente le déclenchement d'un PA (sa hauteur est proportionnelle à la fréquence instantanée des PAs). Les lignes verticales terminées par un cercle blanc correspondent aux bursts multiunitaires (leurs hauteurs sont proportionnelles au nombre de PAs dans le burst). Notez que les SPWs (flèches) coïncident avec les bursts multiunitaires. La eSPW marquée d'un astérisque correspond au signal montré dans (B). **B.** Signaux filtrés (à 400 Hz) du SPW marqué par un astérisque dans (A). Notez la présence de PAs (traits noirs) pendant l'eSPW et la composante ''Tail''. **C.** Cross-correlogramme entre la décharge des neurones de CA1 durant les eSPWs (bin: 10ms). **D.** Recrutement différentiel des neurones glutamatergiques et GABAergiques de CA1 durant les mouvements de l'animal. Histogrammes de temps autour du mouvement (PMTHs) pour les cellules pyramidales et les interneurones de souris âgées de P5 à P8. La ligne sombre indique la valeur médiane, et les lignes grises épaisses représentent les 25e et 75e percentiles de la distribution construite à partir de toutes les valeurs médianes des PMTH obtenues dans les sessions incluses dans le groupe. Les lignes grises fines représentent les 5e, médiane et 95e percentiles de la distribution construite à partir de toutes les valeurs médianes des PMTH obtenues à partir des rasters de substitution des sessions incluses dans le groupe. Les astérisques noirs indiquent que la valeur médiane est au-dessus du 95e percentile ou en dessous du 5e percentile du jeu de données de substitution. (**E**) comme en D mais à partir de souris âgées de P10 à P12. *D'après Dard et al. 2022 ; Leinekugel et al. 2002 ; Mohns et al. 2007*

les données actuelles en imagerie calcique peuvent ne pas révéler le répertoire complet de l'activité des neurones GABAergiques immatures in vivo avec précision temporelle.

Enfin, il semblerait que tous les neurones ne déchargent pas de la même façon lors des activités spontanées, bien que la majorité augmentent leur fréquence de décharge, cela suggère l'existence d'une hétérogénéité de patrons d'activité suite à ces événements. (Mohns and Blumberg 2008).

Ainsi, l'activité des neurones GABAergiques durant les eSPWs et leur impact sur les réseaux hippocampiques immatures sont encore très mal compris à ce jour en raison des défis techniques que représente l'étude de l'activité neuronale à ces stades précoces in vivo. Comprendre le rôle fonctionnel de l'activité GABAergique à ces stades immatures est d'autant plus crucial compte tenu de son rôle essentiel dans la construction et la maturation des réseaux, comme nous le verrons plus loin dans ce manuscrit.

b. Emergence des rythmes oscillatoires

En parallèle des eSPWs, qui sont les événements les plus amples observés dans l'hippocampe néonatal, d'autres rythmes oscillatoires émergent dans la région de CA1 au cours des deux premières semaines de vie. L'activité enregistrée devient de plus en plus complexe au fil des âges, passant d'un signal ''plat'' entrecoupé d'eSPWs à un signal composé de nombreux rythmes oscillatoires (**Figure I.27**). Cette émergence des oscillations hippocampiques reflète la maturation des réseaux et leur capacité à intégrer, traiter et prédire des informations provenant de stimuli externes notamment au cours de la période dite ''critique'' (**Figure I.28**).

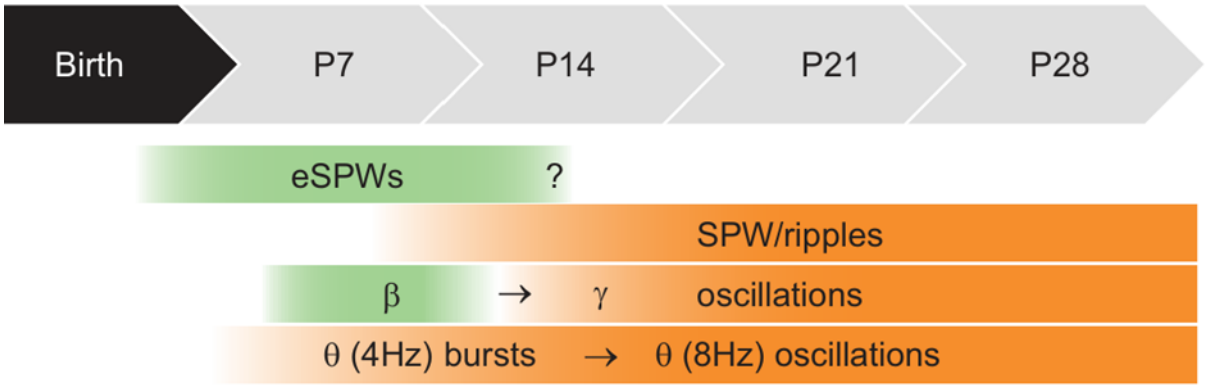


Figure I.27 : Chronologie de l'émergence des rythmes oscillatoires dans la région de CA1.

En vert est indiqué les patrons d'activités immatures transitoires et en orange les activités adultes émergentes. *D'après Cossart et Khazipov, 2021*

i) Emergence des ''tails'' : précurseurs des oscillations Gamma

Comme mentionné précédemment, les eSPWs sont souvent suivies d'oscillations de type beta-gamma (8-20Hz), appelées "tails" ou oscillations de réseau hippocampiques beta-gamma (hippocampal network oscillations - HNOs). Ces oscillations sont associées à des bursts de population pouvant durer plusieurs secondes (entre 1 à 5 s) (Marguet et al. 2015; Leinekugel et al. 2002) (**Figure I.26B**). Les HNOs commencent à être observées dès P5, et leur amplitude ainsi que leur fréquence augmentent (dans la gamme des fréquences gamma) avec l'âge. A partir de P8, elles commencent également à être modulées par les rythmes thêta (Mohns et al. 2008).

Comme pour les eSPWs, les HNOs coïncident avec les mouvements myocloniques de l'animal et ont des CSDs similaires, puisque deux foyers excitateurs sont activés simultanément dans la SLM et le stratum radiatum de CA1 (Marguet et al. 2015 ; Mohns et al. 2008). Cela suggère que ces oscillations sont induites par les entrées du EC. De plus, la présence d'un foyer excitateur dans le stratum radiatum ainsi que le développement en parallèle de l'activité oscillatoire Bêta dans CA3 et de la modulation par les rythmes thêta des HNOs laissent penser que le réseau récurrent intra-hippocampique de CA3 pourrait également être impliqué dans la génération des HNOs à partir de la fin de la première semaine postnatale (Lahtinen et al. 2002).

Ainsi, il est proposé que les HNOs seraient des précurseurs des oscillations gamma lentes/rapides matures, dont la génération implique à la fois le CA3 et l'EC chez les adultes, mais qui présente une fréquence fondamentale plus basse en raison des délais de conduction plus lents dans les circuits en développement et de l'inhibition immature.

ii) Emergence des oscillations Thêta

A partir de P8, les oscillations Thêta peuvent commencer à être observées dans les réseaux immatures de CA1 en même temps que les HNOs et lors du mouvement de l'animal (**Figure I.27**). L'amplitude des oscillations Thêta augmente avec l'âge et, à partir de P10, commencent à s'étendre au-delà des périodes de mouvements myocloniques et peuvent alors être observées, comme pour l'adulte, pendant les périodes de locomotion et de sommeil paradoxal (REM) (Mohns et al. 2008 ; Drieu et al. 2019 ; Wang et al. 2015). L'amplitude et la fréquence des oscillations Thêta continuent d'augmenter jusqu'à P23, passant de 4 à 7 Hz. Le septum médian semble jouer un rôle dès P12 dans la génération du rythme Thêta hippocampique puisque son inactivation pharmacologique entraine un blocage de ces oscillations dans la région de CA1 (Slomianka et al. 2011).

Bien que la maturation des connexions synaptiques entre la région de CA1 et les structures intra- et extra-hippocampiques semble être à l'origine de l'émergence des oscillations Thêta hippocampique et de leurs changements développementaux, les mécanismes sous-jacents restent encore mal connus (**Figure I.28**).

iii) Emergence des SWP-R

Durant les dernières semaines prénatales et les premières postnatales chez les rongeurs, l'activité neuronale apparaît indépendamment des informations externes. Durant ces périodes, l'animal est sourd et aveugle faute d'organes matures pour traiter l'information. À la fin de la deuxième semaine de vie, lorsque le système visuel et auditif est mature, l'activité neuronale est dominée par l'influence des informations externes qui jouent un rôle majeur dans l'établissement des fonctions sensori-motrices. Des privations sensorielles à cette période ont un impact irréversible sur ces fonctions. On parle alors d'une période dite « critique » ou « sensible » du développement cérébral durant laquelle les connexions neuronales sont modifiées sous l'influence des informations sensorielles et des stimuli externes. C'est notamment à cette période que l'animal va commencer à explorer son environnement.

À la fin de la deuxième semaine postnatale, les événements eSPWs sont progressivement remplacés par des événements générés localement dans la formation hippocampique sous forme de SPWs associés aux ripples (Buhl et al. 2005 ; Hanganu et al. 2023) (**Figure I.27**). L'émergence de ces activités rythmiques est liée à la maturation de la connectivité locale dans la région de CA1, impliquant le développement de l'inhibition péri-somatique ainsi que des entrées des collatérales de Schaffer provenant de CA3 (Buhl et al. 2005 ; Leinekugel et al. 2002) (**Figure I.28**). Les circuits de CA1 passent donc d'une activation principalement induite par des entrées sensorielles venant de l'EC à une dynamique interne récurrente soutenue par les réseaux intra-hippocampiques. À peu près à la même période, l'apparition de cellules de lieu modulées par des repères et des séquences stationnaires est observée, bien que la réactivation des trajets parcourus ne soit observée qu'une semaine plus tard, aux alentours de P23 (Farooq et al. 2019 ; Muessig et al. 2019 ; Wills et al. 2010 ; Langston et al. 2010).

Au début de la troisième semaine postnatale, des séquences neuronales ainsi que le phénomène de précession de phase commencent à être observés suggérant que la dynamique interne de la région CA1 commence à dépendre de l'expérience de l'animal (Muessig et al. 2019) (**Figure I.28**). Les séquences dépendantes de l'expérience seraient le dernier modèle hippocampique à mûrir pendant le développement. Ainsi, à partir de P20, l'activité de réseau observée dans la région de CA1 est très similaire à celle présente chez l'adulte.

Dans cette section, les réseaux neuronaux immatures sont caractérisés par des activités spontanées néonatales qui synchronisent une large population de neurones. Il est postulé que ces activités neuronales spontanées jouent un rôle important dans la mise en place des réseaux neuronaux et de leurs fonctions ultérieures.

Nous verrons dans la prochaine partie de quelle façon ces activités de réseau influencent le développement des réseaux neuronaux et les mécanismes sous-jacents à ces processus.

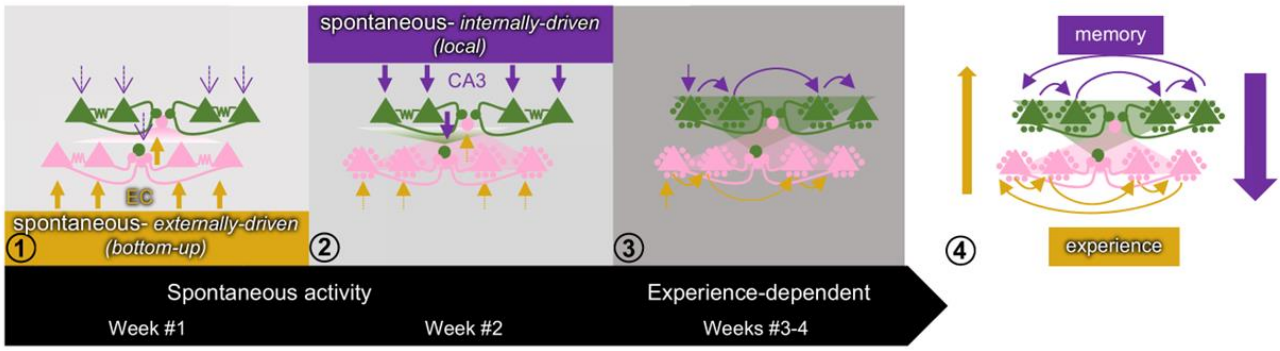


Figure I.28 : Les principales étapes du développement des dynamiques internes de la région de CA1.

Représentation schématique des trois phases principales menant au développement des dynamiques internes de CA1. Les phases 1 et 2 correspondent aux périodes où l'activité est générée spontanément, d'abord de manière ascendante (bottom-up) par l'activité sensorimotrice spontanée transmise à CA1 via les entrées du cortex entorhinal (EC). À ce moment, les circuits locaux sont probablement connectés par des jonctions gap et produisent des SPAs (Spontaneous Population Activities). Les entrées de l'EC sont plus susceptibles d'innerver les neurones pyramidaux générés tôt (en rose) ainsi que les interneurones générés tôt. Cette période se termine vers la fin de la première semaine postnatale (étape 1) avec l'apparition d'une inhibition péri-somatique (provenant certainement des neurones GABAergiques générés tôt et contactant les neurones pyramidaux générés tôt qui sont découplés de leurs synapses électriques) et des entrées collatérales de CA3. Après cette période, la région de CA1 est également alimentée par une activité spontanée générée à l'intérieur de l'hippocampe (d'origine interne et locale), très probablement via des entrées de CA3. Ces entrées ciblent plus probablement les neurones pyramidaux et les interneurones nés tardivement (en vert), qui peuvent encore être connectés par des synapses électriques. Cette période se termine vers la fin de la deuxième semaine postnatale avec (étape 2) l'apparition de représentations internes basées sur des repères, sous la forme de cellules de lieu. Durant les deux semaines qui suivent (étape 3), le modèle interne de CA1 est calibré aux entrées sensorielles par le biais de la plasticité dépendante de l'expérience. Cette période se termine avec l'émergence de séquences internes (étape 4) intégrant l'expérience dans les dynamiques internes. *D'après Cossart et Khazipov, 2021*

D- ROLE DE L'ACTIVITE NEURONALE DANS LE DEVELOPPEMENT DES RESEAUX

Pendant longtemps, la construction du cerveau durant la période embryonnaire et postnatale était considérée comme étant largement indépendante de l'activité électrique. Selon cette vision, les processus développementaux étaient entièrement régis par des programmes génétiques, et l'activité n'était importante que lors des stades plus tardifs pour le raffinement des connexions établies entre les neurones. Cependant, de nombreuses études, réalisées in vivo et in vitro, ont depuis montré que l'activité neuronale joue un rôle essentiel dans le développement précoce du système nerveux (Spitzer, 2006 ; Luhmann et al. 2016). En effet, ces activités spontanées sont impliquées dans les processus de maturation structurelle et fonctionnelle des réseaux et la perturbation de ces patrons d'activité précoce, par manipulation génétique ou pharmacologique,

a un impact dans l'établissement de réseaux fonctionnels (Kirkby et al., 2013 ; Luhmann et al. 2016 ; Kilb et al. 2011 ; Spitzer, 2006).

Dans cette partie, nous verrons de quelle manière les activités spontanées influencent les processus développementaux des neurones ainsi que l'importance de l'activité GABAergique excitatrice dans la maturation des réseaux à ces stades immatures.

1) Implication de l'activité neuronale dans la régulation des processus développementaux

De nombreuses études réalisées in vitro et in vivo ont permis de mettre en évidence l'importance des activités neuronales précoces dans la régulation de chacune des grandes étapes développementales du système nerveux (Spitzer, 2006 ; Luhmann et al. 2016). Par exemple, certaines de ces études rapportent que le blocage des activités spontanées a des conséquences sur le processus de mort cellulaire durant le développement. En effet, il a été montré que leur blocage entraine une augmentation du nombre de neurones entrant en apoptose dans des cultures néocorticales et de tranches organotypiques. Les neurones qui ont une faible fréquence de décharge ont plus de chances de rentrer en apoptose, tandis que ceux qui montrent des décharges à haute fréquence sont plus susceptibles de survivre ce qui témoigne du rôle crucial de l'activité des neurones dans la survie neuronale (Warm et al., 2022 ; Wong et al., 2018 ; Heck et al., 2008). Des observations similaires ont été faites pour d'autres processus développementaux qui sont aussi altérés quand ces activités sont bloquées (Bonetti et Surace, 2010 ; Allène et al.2008 ; Katz et Shatz, 1996 ; Spitzer, 2006 ; Luhmann et al. 2016 ; Kirkby et al., 2013). Ainsi, la dépolarisation des neurones durant la période périnatale influence leur développement et leur intégration au sein des réseaux.

L'influence que l'activité neuronale a sur les processus développementaux est étroitement liée à l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire suite à la dépolarisation des neurones (**Figure I.29**). Ces transients calciques, observés dès le stade embryonnaire (E16) bien avant la formation des premières synapses (Corlew et al., 2004), reposent principalement sur des mécanismes non synaptiques, où les effets paracrines du glutamate et du GABA activent les canaux Ca^{2+} dépendants du voltage (Demarque et al., 2002 ; Manent et al. 2005 ; Rivera et al. 2004). En effet, lors des épisodes d'activité spontanée de réseau, les neurones GABAergiques et glutamatergiques jouent un rôle fondamental dans la génération des transients calciques intracellulaires. Suite à leur dépolarisation, ces neurones libèrent du GABA ou du glutamate dans le milieu extracellulaire qui se fixent sur leurs récepteurs postsynaptiques respectifs. L'activation des récepteurs NMDA permet une entrée de Ca^{2+} dans le neurone, contribuant à l'augmentation du transient calcique et renforçant la dépolarisation membranaire. Cet effet est amplifié par le rôle dépolarisant du GABA à ces stades immatures, via l'activation des récepteurs GABA-A (Nguyen et al.2001 ; Owens et al. 2002 ; Demarque et al.2002). Cette activation conduit à une augmentation du potentiel de membrane, qui favorise l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants de type L (L-VSCC), renforçant ainsi le signal calcique intracellulaire (Ganguly et al., 2001). Par conséquent, l'altération de l'excitabilité neuronale, notamment par le blocage des récepteurs glutamatergiques ou GABAergiques, a des conséquences importantes sur les processus développementaux. Par exemple, l'inhibition du transient calcique par blocage des canaux CA^{2+} ou des récepteurs glutamatergiques et GABA-A entraîne une augmentation de la mort cellulaire (Ikonomidou et al., 1999; Heck et al., 2008), ou encore une altération de la migration neuronale. En effet, la signalisation du calcium via les récepteurs AMPA et NMDA joue un rôle important dans l'arrêt de la migration tangentielle des neurones GABAergiques en faveur de la migration radiale pour atteindre leur destination finale (Behar et al., 1999; Manent et al., 2006). Tandis que le blocage des récepteurs GABA-A impact celle des neurones glutamatergiques (Manent et al., 2005).

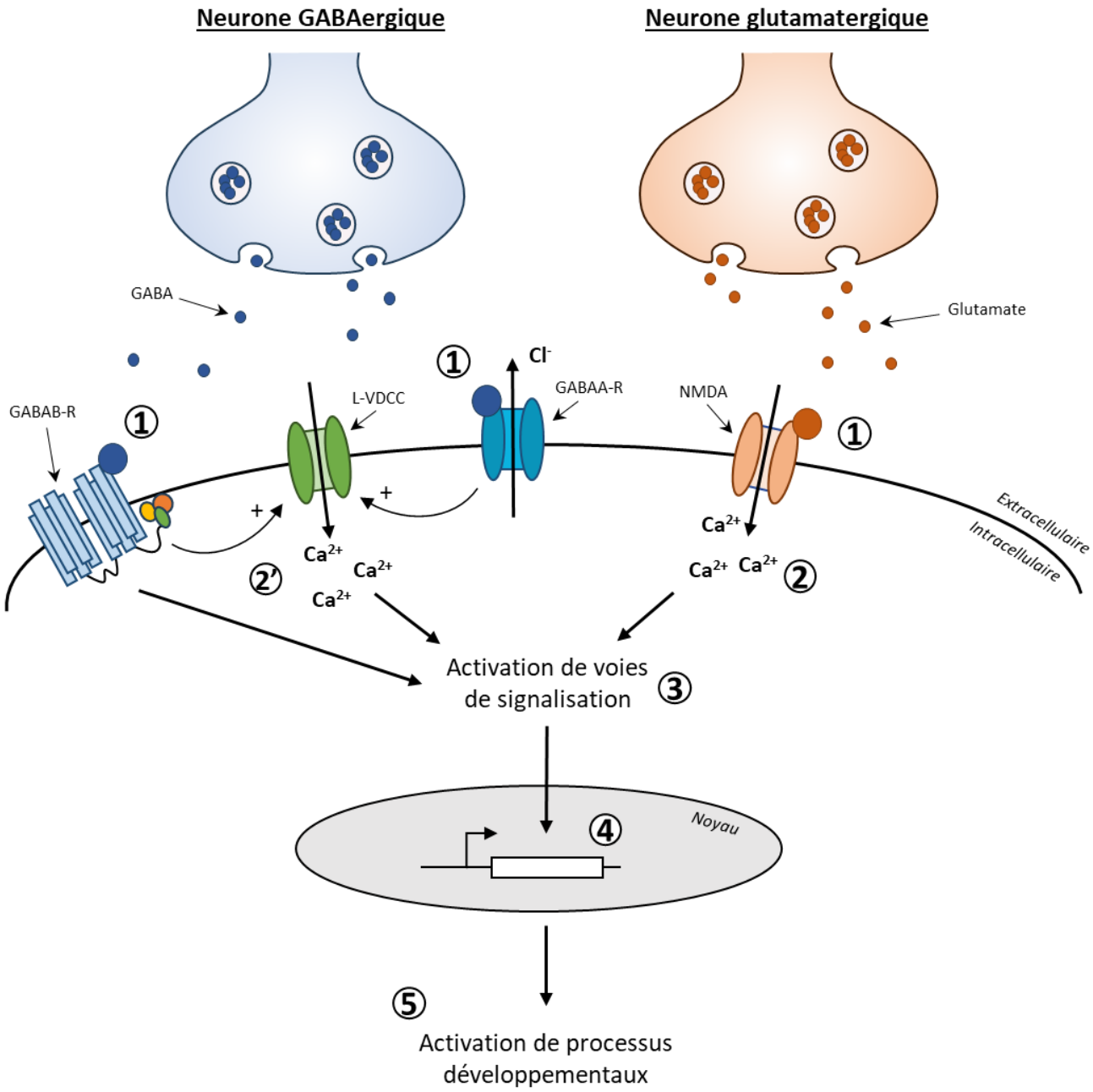


Figure I.29 : Représentation schématique des mécanismes sous-jacents aux processus développementaux induits suite à la dépolarisation du neurone.

Suite à leur dépolarisation les neurones GABAergiques et glutamatergiques libèrent du GABA ou du glutamate dans le milieu extracellulaire qui se fixent sur leurs récepteurs postsynaptiques respectifs (1). L'activation des récepteurs NMDA permet une entrée de Ca^{2+} dans le neurone, contribuant à l'augmentation du transient calcique et renforçant la dépolarisation membranaire (2). Cet effet est amplifié par le rôle dépolarisant du GABA à ces stades immatures, via l'activation des récepteurs GABAA. Cette activation conduit à une augmentation du potentiel de membrane, qui favorise l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants de type L (L-VSCC), renforçant ainsi le signal calcique intracellulaire (2'). L'augmentation de la concentration calciques intracellulaires induit l'activation de voies de signalisation (3) impliquées dans la régulation de la transcription de gènes (4) impliqués dans les processus développementaux des neurones (5). L'activation des récepteurs GABAB permet également l'activation de voies de signalisation.

De façon générale, la diminution de l'activité migratoire des neurones coïncide avec l'émergence des activités néonatales en bouffée de type eSPW ou spindle bursts. Dans le cas des neurones GABAergiques, il a été observé que seuls ceux qui ont terminé leur migration participent aux activités synchrones. L'application d'antagonistes des récepteurs GABA-A et glutamatergiques augmente le nombre de neurones GABAergiques en migration (De Lima et al., 2009). Ces observations suggèrent que les neurotransmetteurs libérés par l'activité précoce du réseau pourraient favoriser la fin de la migration neuronale, ce qui renforce l'idée que les activités de réseau jouent un rôle important dans le processus de migration notamment pour les neurones GABAergiques nés tardivement.

L'augmentation de la concentration calcique intracellulaire, suite à la dépolarisation des neurones, déclenche de nombreux programmes transcriptionnels (Tyssowski et al., 2018) et module des processus moléculaires clés pour le développement des réseaux (Miyasaka et Yamamoto, 2021 ; Greer et Greenberg, 2008). En effet, le calcium joue un rôle central en tant que second messager dans la transduction biochimique de l'activité synaptique en expression génique via l'activation de voies de signalisation. De nombreuses études ont permis de mettre en évidence plusieurs mécanismes qui contrôlent l'activité de régulateurs transcriptionnels impliqués dans la transcription génique dépendante de l'activité (West, 2002 ; Spitzer, 2006).

2) L'importance de l'effet excitateur du GABA sur les processus développementaux

La plupart des actions trophiques du GABA ont été attribuées à l'activation des récepteurs ionotropiques GABAA perméables au chlorure. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, le GABA exerce une action excitatrice sur les neurones corticaux immatures via une faible expression des cotransporteurs KCC2 et, à l'inverse, un taux élevé de cotransporteurs NKCC1 (Fukuda et al., 1998 ; Yamada et al., 2004 ; Ben-Ari, 2002). Ainsi, l'activation des récepteurs GABAA entraîne une augmentation de la concentration intracellulaire de Cl^-, provoquant la dépolarisation de la membrane et un afflux calcique dans les neurones immatures (Rivera et al., 1999 ; Ben-Ari et al., 1989, 2007 ; Ganguly et al., 2001 ; Owens et Kriegstein, 2002) (**Figure I.29**).

Le rôle des récepteurs GABAA ainsi que l'importance de l'effet excitateur du GABA dans le développement des réseaux a été mis en évidence dans de nombreuses études où la conversion dépolarisante/hyperpolarisante des réponses au GABA a été modifiée in vitro ou in vivo (Chudotvorova et al., 2005 ; Cancedda et al., 2007 ; Wang et Kriegstein, 2008). Ainsi, le passage de la transmission GABAergique excitatrice à inhibitrice, médiée par l'augmentation du taux du cotransporteur KCC2, rendant l'action du GABA hyperpolarisante et réduisant ainsi l'afflux de calcium, favorise l'arrêt de la migration radiale (Rivera et al., 1999; Bortone et Polleux, 2009). De plus, la suppression de l'action excitatrice du GABA aux stades précoces du développement entraîne une altération de la maturation morphologique des neurones GABAergiques. Par exemple, les neurones GABAergiques surexprimant KCC2 possèdent des dendrites plus courtes et moins nombreuses qu'en condition contrôle (Cancedda et al., 2007). Les mécanismes apoptotiques sont également influencés par l'effet excitateur du GABA dans certains types cellulaires. Au début de la deuxième semaine de vie, la forte mortalité observée chez les cellules Cajal-Retzius serait due à l'effet excitateur du GABA., et lorsqu'il devient inhibiteur, ces neurones ne rentrent plus en apoptose (Blanquie et al., 2016). Il est donc probable qu'une altération de la transition du GABA excitateur à inhibiteur durant le développement causerait une densité anormale de cellules Cajal-Retzius à l'âge adulte dans le cortex et l'hippocampe et aurait un impact sur le développement des réseaux.

L'effet excitateur du GABA est donc important dans divers processus développementaux tels que l'apoptose, la migration ou encore la maturation neuronale. Cependant, la transition de l'effet excitateur du GABA à un effet inhibiteur au cours de la période postnatale est également médiée par l'activation des récepteurs GABA-A. En effet, Ganguly et al. ont montré que cette transition est retardée par le blocage chronique des récepteurs GABA-A et accélérée par l'activation accrue des récepteurs GABAA mais qu'en revanche le blocage des récepteurs glutamatergiques n'a aucun effet (Ganguly et al., 2001). Les auteurs ont suggéré que l'activité GABAergique entraîne la modulation du niveau d'ARNm de KCC2 transcrit par les neurones. Ainsi, le GABA agit comme un facteur trophique auto-limitatif au cours du développement neuronal. Lors de la transition du GABA excitateur à inhibiteur via la régulation positive du co-transporteur KCC2, le potentiel de membrane diminue suite à l'activation des récepteurs GABA-A diminuant ainsi la fréquence des transients de calcium intracellulaires spontanés initiés par l'activation des canaux calciques voltage-dépendants de type L (VSCC).

Compte tenu du rôle fondamental qu'a l'activité GABAergique dépolarisante dans la construction des réseaux, il n'est pas surprenant qu'une transmission GABAergique défectueuse à ces stades précoces du développement soit impliquée dans un large éventail de troubles cérébraux allant de simples déficits cognitifs incluant des problèmes de mémoire, apprentissage et navigation spatiale à des neuropathologies sévères (Ben-Ari et al., 2007 ; Wang et Kriegstein, 2008 ; Sernagor et al., 2010).

Bien que la plupart des actions trophiques du GABA aient été attribuées à l'activation des récepteurs GABAA les récepteurs métabotropiques $GABA_B$ ($GABA_B$-R) joueraient aussi un rôle important dans la mise en place des réseaux (Gaiarsa et al., 2011; Porcher et al. 2013). En effet, les récepteurs GABAB sont présents et fonctionnels au stade embryonnaire, avant même que les synapses soient formées. Nous l'avons vu, contrairement aux récepteurs GABAA qui sont ioniques, les récepteurs GABAB agissent par l'intermédiaire de protéines G. Grâce à cette voie de signalisation, ils sont connus pour diminuer l'expression de canaux calciques voltage dépendants en présynaptique et pour activer les canaux potassiques rectifiant de type GIRK en post-synaptique. Ce mode d'action est, même lors de la période néonatale, inhibiteur. En plus de leur action synaptique, les récepteurs GABAB agissent aussi sur plusieurs protéines effectrices comme certains facteurs de croissance (BDNF, IGF-1R), et voies de signalisation (PLC/IP3, PKC) mais aussi sur les concentrations de calcium intracellulaires. Par ces mécanismes, le GABA, relâché lors des activités précoces, influence la motilité neuronale pendant la migration, la croissance axonale ou la maturation et la plasticité des synapses immatures.

Ainsi, l'effet dépolarisant de l'activité GABAergique aux stades immatures joue un rôle important dans la formation et la maturation des réseaux neuronaux. Il est donc essentiel de comprendre comment les neurones GABAergiques contribuent aux activités spontanées néonatales et influencent les mécanismes développementaux. Cependant, l'effet dépolarisant du GABA à ces stades précoces demeure un sujet très controversé, particulièrement dans des conditions in vivo. Par conséquent, l'influence de ces neurones sur l'activité des réseaux au cours des deux premières semaines de vie reste encore mal comprise.

Problématique

Nous venons de voir que les fonctions cognitives sous-tendues par l'hippocampe sont rendues possibles grâce à l'organisation morpho-fonctionnelle complexe de cette structure, et notamment de la région de CA1. En effet, ces processus dépendent essentiellement de la synchronisation de l'activité neuronale au sein des réseaux de cette région rendue possible par la connectivité complexe qui existe entre les neurones locaux, mais aussi avec les structures extra- et intra-hippocampiques. Ces réseaux se mettent en place pendant le développement à la fois sur le plan anatomique et fonctionnel, ces deux aspects étant étroitement liés et interdépendants. En effet, les activités neuronales néonatales jouent un rôle essentiel dans les processus développementaux derrière la construction des structures cérébrales et la maturation des réseaux.

Durant les deux premières semaines postnatales in vivo, les réseaux neuronaux immatures sont caractérisés par des activités spontanées néonatales, les eSPWs, qui synchronisent une large population de neurones. Cependant, si le rôle des neurones GABAergiques est clairement établi dans la synchronisation des neurones hippocampiques lors des activités spontanées in vitro, la contribution de ces neurones dans la régulation de l'activité au sein des circuits en développement in vivo reste encore inconnue aujourd'hui. Nous avons vu que les neurones GABAergiques jouent un rôle majeur dans la maturation des réseaux en raison de leur effet dépolarisant à ces stades immatures et que leur activation lors des épisodes d'activité spontanée néonatale semble cruciale pour l'établissement de réseaux fonctionnels. Cependant, l'effet dépolarisant du GABA est un sujet très controversé, notamment dans les conditions in vivo. Par conséquent, l'impact de ces neurones sur l'activité des réseaux durant les deux premières semaines de vie est encore mal compris.

Le but de ma thèse a donc été de caractériser l'implication des neurones GABAergiques lors des eSPWs in-vivo et de déterminer dans quelle mesure leur activité influence les réseaux hippocampiques immatures. Pour cela, nous avons dû, au préalable, mettre au point un protocole combinant la technique d'enregistrement électrophysiologie extracellulaire et d'optogénétique chez des souris néonatales transgéniques.

PARTIE II

MISE AU POINT DE METHODOLOGIES EXPERIMENTALES AUX STADES NEONATAUX

COMBINAISON DES TECHNIQUES D'ENREGISTREMENT EXTRACELLULAIRE ET D'OPTOGENETIQUE CHEZ LA SOURIS NEONATALE

''Une personne qui n'a jamais commis d'erreur n'a jamais tenté d'innover.''

Albert Einstein

Les travaux réalisés durant ma thèse ont pour but de comprendre comment s'organise l'activité des neurones GABAergiques de CA1 durant les deux premières semaines postnatales et d'étudier leur impact sur l'activité des réseaux immatures hippocampiques. Pour cela, j'ai réalisé des enregistrements électrophysiologiques extracellulaires in vivo chez des souris néonatales. Cependant, bien qu'il soit possible chez l'adulte de distinguer les interneurones des cellules pyramidales à partir des propriétés de décharge de ces neurones, ce n'est pas possible chez le nouveau-né.

Chez l'adulte, les neurones GABAergiques déchargent à plus haute fréquence (>5 Hz) que les cellules pyramidales (<5 Hz) et émettent des PAs plus courts qui présentent des profils d'hyperpolarisation post-AP plus grands que les cellules pyramidales (Csicsvari 1999). Contrairement aux cellules pyramidales, les interneurones ne déchargent majoritairement pas en bursts (à l'exception de certaines "bursty cells") (Czurko et al., 2011). Ces différences entre ces deux populations cellulaires peuvent être expliquées notamment par leur composition en canaux ioniques. Les interneurones, particulièrement les PV, possèdent une densité plus élevée de canaux permettant une repolarisation rapide du PA et une hyperpolarisation post-AP rapide (canaux sodiques voltage dépendants et divers canaux potassiques). Ceci aboutit à des PAs plus courts et à une capacité de décharger à des fréquences très élevées. Notons toutefois qu'il existe une très grande diversité d'interneurones (Klausberger and Somogyi, 2008) et par conséquent, de leurs patrons de décharge. Les cellules pyramidales, quant à elles, ont des canaux ioniques plus lents et plus variés qui prolongent ainsi la durée de dépolarisation et de repolarisation. De plus, la présence de canaux sodiques responsables du courant sodique persistant (INap), causant une dépolarisation post-AP ("after-depolarization" -ADP) (Fricker et Miles, 2000 ; Azouz et al., 1996), permettant elle-même une décharge en burst. Traditionnellement, la combinaison de trois propriétés de décharge détectées dans les signaux extracellulaires permet de réaliser une grossière ségrégation entre interneurones et cellules pyramidales. Les paramètres les plus courants sont : le taux de décharge, la largeur des PAs à la moitié du pic, et la décharge en bursts, identifiée par un pic dans les auto-correlogrammes de la cellule, entre 3 et 6ms pour les pyramidales et 12-20 ms chez les interneurones (**Figure II.1A-D**).

Durant les stades précoces du développement, les neurones ont une morphologie et une composition en canaux sodiques et potassiques différentes de celle à l'âge adulte, modifiant ainsi les propriétés de leurs PAs et de leur dynamique de décharge. Il est donc impossible de différencier les PAs des deux types cellulaires en se basant sur ces caractéristiques (Sánchez-Aguilera 2020) (**Figure II.1E-G**). De plus, nous verrons qu'à ces âges, les neurones déchargent à très faible fréquence, ce qui ne permet pas d'effectuer des auto-corrélogrammes de bonne qualité et de déterminer les valeurs de pics caractéristiques des interneurones ou cellules pyramidales. Face à ces difficultés, nous avons dû adapter les protocoles et les méthodes d'analyse traditionnellement utilisées chez les animaux adultes aux nouveaux-nés. Ne pouvant pas classer les types cellulaires en fonction des formes des PAs, nous avons développé une méthode directe d'identification basée sur l'optogénétique.

Cette technique, conceptualisée à la fin des années 1970, est très utilisée depuis plusieurs décennies en neurosciences notamment pour pouvoir étudier les réseaux neuronaux. L'optogénétique consiste à faire exprimer une protéine photosensible, appelée opsine, spécifiquement dans un type cellulaire cible, dans notre cas : les neurones GABAergiques (**Figure II.2A**). Elle est exprimée à la membrane du neurone et est activée lors de stimulations avec une lumière bleue (470 nm) entraînant l'entrée d'ion sodium (Na+) et causant la dépolarisation de la membrane et l'émission d'un PA par le neurone. Ainsi, les neurones qui expriment l'opsine vont systématiquement décharger un PA et vont libérer des neurotransmetteurs dans les fentes synaptiques quand on réalise les opto-stimulations. Cette technique est couramment utilisée dans l'étude des circuits neuronaux pour comprendre comment les neurones interagissent entre eux au sein d'un réseau. Dans le cadre de notre projet, nous avons profité de la particularité de cette technique à entrainer la décharge systématique des neurones lors des stimulations pour les identifier et les considérer comme neurones ''cibles'' en post-acquisition. Ils sont donc ''étiquetés'' ou ''opto-taggués'' et, par conséquent, identifiés comme étant des neurones GABAergiques (**Figure II.2B-C**).

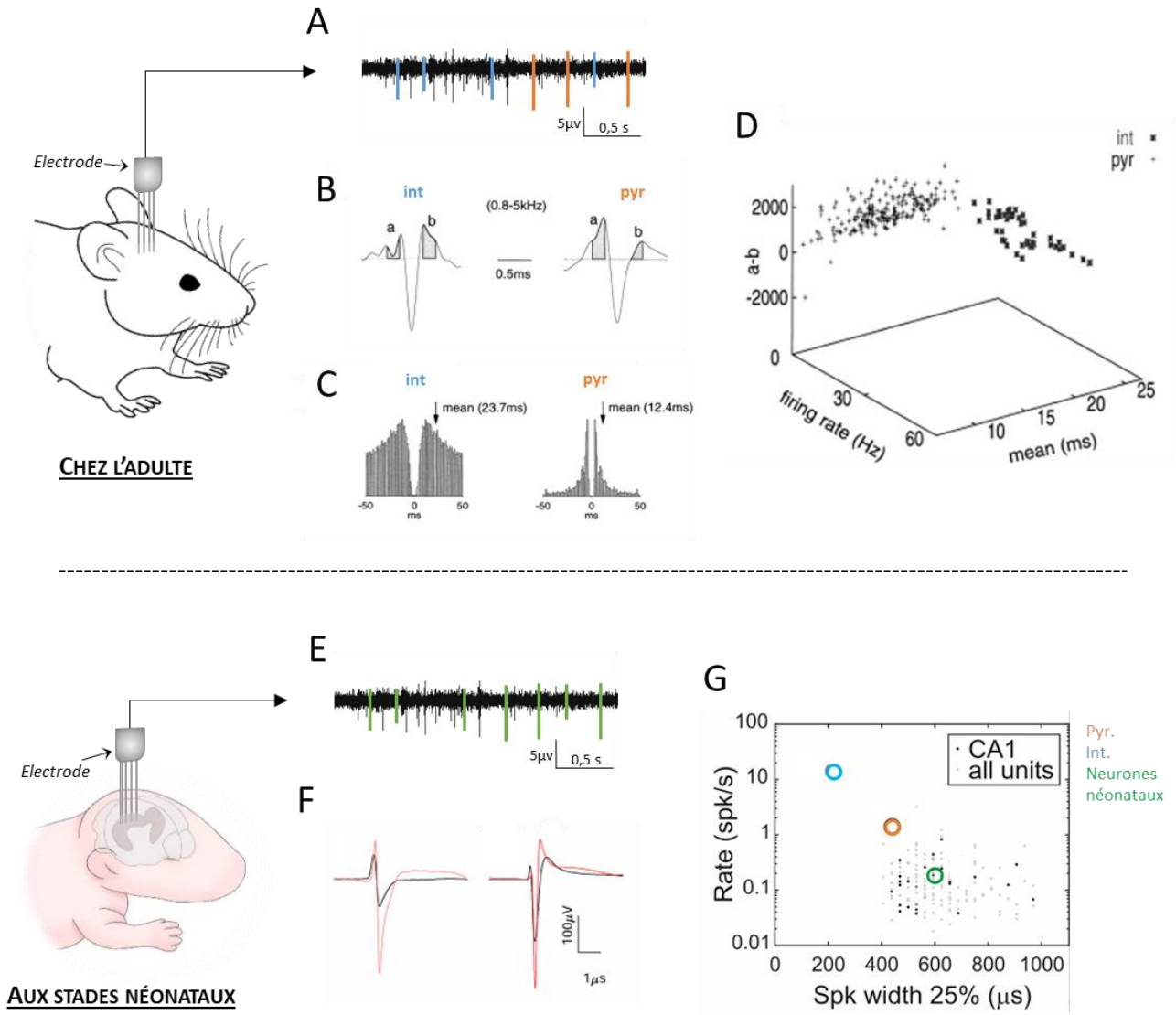


Figure II.1 : Identification physiologique des différents types cellulaires chez le rongeur adulte et néonatal

A. Trace enregistrée et filtrée (Low pass : 3000 hz et High Pass : 100 hz) montrant l'activité unitaire des neurones enregistrés. **B.** Moyennes des potentiels d'action extracellulaires filtrées d'un interneurone (int) et d'une cellule pyramidale du CA1 (pyr). Les zones ombrées (a et b) (largeur de 0,25 ms, à 0,18 ms du pic négatif) représentent les mesures d'amplitude utilisées pour le regroupement dans (D). Remarquez les différences dans la forme des ondes et la durée des pics entre les deux cellules. **C.** Autocorrélogrammes pour l'interneurone et la cellule pyramidale. Les flèches indiquent la moyenne des histogrammes. Remarquez la décroissance rapide de l'histogramme de la cellule pyramidale. **D.** Représentation tridimensionnelle du taux de décharge, de la symétrie des pics (a et b) et de la moyenne des histogrammes d'autocorrélation pour chaque neurone. Remarquez la séparation claire des cellules pyramidales des clusters d'interneurones. **E.** Trace enregistrée et filtrée (Low pass : 3000 hz et High Pass : 100 hz) montrant l'activité unitaire des neurones immatures. **F.** Comparaison de la forme moyennée de PAs émis par des neurones immatures (en noir) et émis par des neurones matures (en rouge). **G.** Représentation du taux de décharge et de la largeur des PAs de neurones néonataux (en vert), de neurones pyramidaux (en orange) et d'interneurones (en bleu) adultes. *Adapté de Csicsvari et al., 1998 ; Valeeva et al., 2019*

A ce jour, aucune étude combinant enregistrements électrophysiologiques extracellulaires in-vivo à la technique d'optogénétique sur des souris postnatales (âgées entre 3 et 12 jours) n'a encore été réalisée. La mise au point d'un protocole combinant ces deux techniques a donc occupé une grande partie de ma thèse. En effet, adapter et réaliser ces techniques à des stades précoces du développement représente déjà un défi considérable qui est rendu encore plus complexe par leur couplage comme il est requis dans mon projet. Par

conséquent, j'ai dû modifier de nombreuses fois notre protocole expérimental tout au long de ma thèse dans le but de trouver la meilleure façon d'opto-tagguer des neurones dans des enregistrements néonataux.

C'est pourquoi, avant d'exposer les résultats qui découlent de ces expériences, je vais d'abord présenter les différentes techniques et méthodes que j'ai mises au point, allant des procédures expérimentales aux méthodologies d'analyse des données. Dans chaque cas, je spécifierai les difficultés rencontrées et j'expliquerai les stratégies employées pour les surmonter.

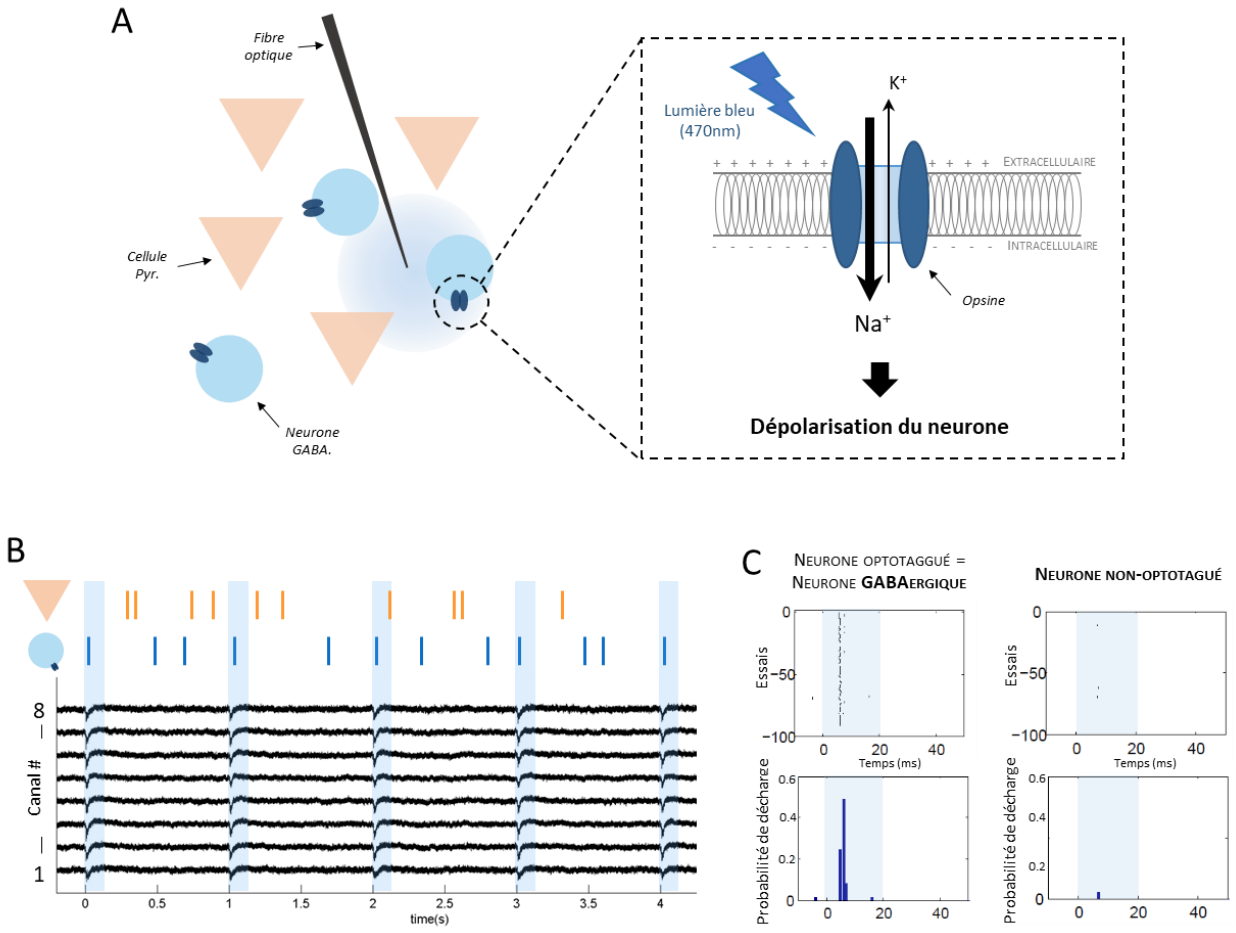


Figure II.2 : Principe de la technique de l'optogénétique et de l'opto-tagging

A. Représentation du principe de la technique de l'optogénétique. Ici, les neurones GABAergiques exprimant une opsine excitatrice s'activent suite à une stimulation lumineuse à 470 nm. L'activation de l'opsine entraîne une entrée d'ion sodium (Na+) qui cause la dépolarisation de la membrane et l'émission d'un PA par le neurone GABAergique (encadré en pointillé à droite). **B.** Signaux enregistrés par plusieurs canaux pendant une série de stimulations lumineuses (ligne bleue). Notez que l'on voit dans le signal la présence de PAs pendant les stimulations. (Au-dessus) représentation de l'activité d'un neurone qui exprime l'opsine et d'un autre qui ne l'exprime pas. Lors des stimulations, celui qui exprime l'opsine décharge systématiquement pendant les stimulations. **C.** Raster plots et PSTH d'un neurone qui décharge systématiquement immédiatement après les stimulations optiques et qui sera considéré comme étant opto-taggué (à gauche) et d'un neurone qui n'est pas impacté par les stimulations lumineuses (à droite). Notez que le neurone qui décharge systématiquement suite à une stimulation exprime l'opsine excitatrice.

I Procédures expérimentales

Pour pouvoir étudier l'activité des neurones GABAergiques de CA1 durant les deux premières semaines postnatales, il m'a fallu développer un protocole permettant d'enregistrer leur activité in-vivo et de les identifier en post-acquisition.

Nous avons alors choisi de réaliser des enregistrements électrophysiologiques en extracellulaire afin de capter et d'étudier l'activité unitaire d'un grand nombre de neurones ainsi que les potentiels de champs locaux (LFPs) avec une haute résolution temporelle. Ne pouvant pas utiliser les propriétés de décharge et les caractéristiques des PAs pour identifier les différents types cellulaires, comme expliqué précédemment, j'ai dû avoir recours à la technique de l'optogénétique pour identifier les neurones GABAergiques durant les enregistrements. Cette technique est appelée ''opto-tagging'' (ou ''étiquetage lumineux'' en français).

Pour cela, il a fallu tout d'abord trouver une méthode efficace pour faire exprimer des protéines photosensibles (opsines) spécifiquement dans les neurones GABAergiques de CA1 aux stades postnataux. Puis, il a fallu coupler mon système d'enregistrement électrophysiologique extracellulaire à un système de photostimulation et trouver les paramètres de stimulation optimales pour activer les opsines.

A- Expression de l'opsine dans les neurones GABAergiques

La première étape lorsqu'on fait de l'optogénétique consiste à générer des animaux qui expriment une protéine membranaire photosensible, appelée opsine, spécifiquement dans un type cellulaire d'intérêt, ici, les neurones GABAergiques. Pour cela, j'ai utilisé une stratégie d'expression conditionnelle de gènes utilisée au sein de l'équipe qui repose sur le système Cre-Lox.

Pour obtenir ces animaux, plusieurs choix se sont offerts à nous allant du mode d'induction de l'opsine dans les neurones GABAergiques aux choix de l'opsine à utiliser. Nous allons voir dans cette partie que certaines méthodes se sont avérées plus efficaces que d'autres pour faire de l'opto-tagging en postnatal.

1) Différentes méthodes d'expression de l'opsine via le système Cre-Lox

Brièvement, le système Cre-Lox consiste à placer le gène codant pour la Cre recombinase sous le contrôle spatio-temporel d'un promoteur spécifique (Prom. X) afin de permettre une expression restreinte de la Cre à un sous-type de neurones. Une fois transcrite, la protéine Cre cible les séquences LoxP encadrant une cassette « STOP » qui précède un gène rapporteur Y (gène d'intérêt que l'on souhaite faire exprimer) (**Figure II.3A**).

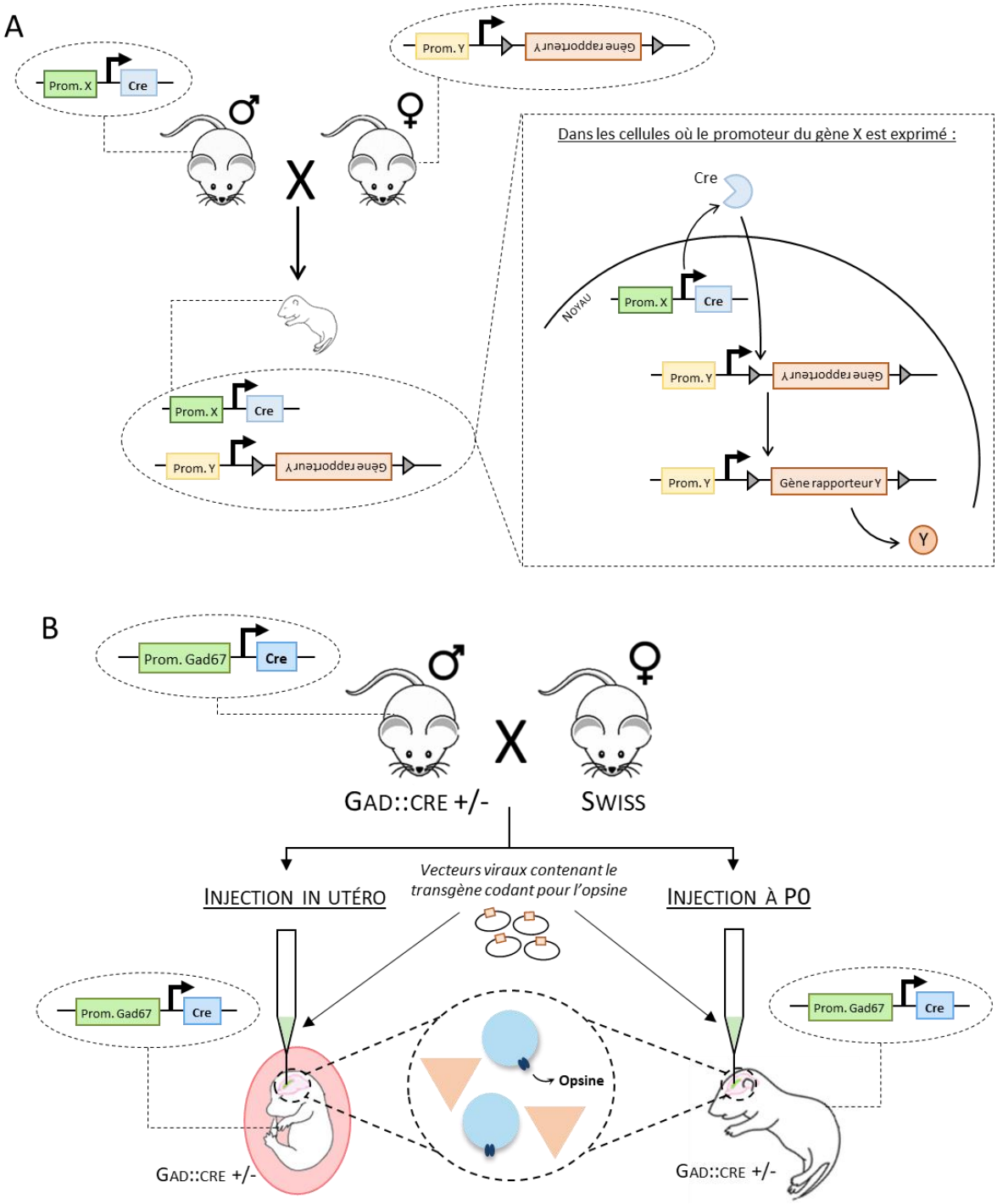


Figure II.3 : Principe du système de recombinaison Cre/Lox et méthode d'induction de l'opsine utilisée.

A. Schématisation du principe du système de recombinaison Cre/Lox. Croisement entre un mâle portant le transgène codant pour la Cre recombinase placée sous le contrôle du promoteur d'un gène spécifique (Prom.X) et une femelle portant le transgène codant pour le gène rapporteur Y en aval d'une cassette ''STOP'' entourée de séquences LoxP (triangles gris) sous le contrôle du promoteur du gène Y (Prom.Y). Les descendants de ce croisement expriment ces deux transgènes. (Encadré en pointillé) Dans ces animaux exprimant à la fois la Cre recombinase et le transgène d'intérêt (gène rapporteur Y) la Cre est exprimée et excise le codon STOP au niveau des sites LoxP de sorte à permettre l'expression du transgène d'intérêt dans la cellule. **B**. Croisement réalisé pour obtenir des souris Gad::cre hétérozygotes. Les souris Gad::cre+/- issues de ce croisement sont injectées dans le ventricule à P0 ou à E15 en in-utéro avec un vecteur viral cre-dépendant exprimant une opsine excitatrice de sorte à ce qu'elle soit exprimée spécifiquement dans les interneurones GABAergiques (cercles bleus, les triangles oranges représentent des cellules glutamatergiques).

a. Croisements de lignées

La première méthode pour obtenir des animaux qui expriment l'opsine dans les neurones GABAergiques consiste à croiser des animaux transgéniques exprimant la Cre avec ceux possédant le gène rapporteur floxé (**Figure II.3A**). L'avantage de cette méthode est que, chez les descendants de ce croisement, l'expression du gène rapporteur est constante dans le temps et ce dès le stade néonatal.

Dans le cadre de mon projet, on veut que le gène rapporteur codant pour l'opsine soit exprimé uniquement dans les neurones GABAergiques. Pour cela, Nous avons utilisé une lignée de souris transgéniques Gad-Cre+/- où la Cre est exprimée sous le contrôle du promoteur du gène GAD67 (glutamate décarboxylase) codant pour une enzyme qui permet la conversion du L-glutamate en GABA. Ces souris Gad-Cre sont croisées avec une lignée de souris homozygotes pour un transgène codant pour une opsine de façon conditionnelle afin d'obtenir une descendance dont 50% des animaux sont hétérozygotes à la fois pour la Cre et l'opsine. Nous avons testé deux lignées de souris exprimant toutes deux une opsine excitatrice (la ChR2 que je décrirai plus tard dans le manuscrit) mais associée à des protéines de fusion différentes. La lignée Ai27 a comme protéine de fusion la GFP tandis que la lignée Ai32 a la mCherry. La conformation qu'adoptent les opsines associées à mCherry leur permet un meilleur ancrage à la membrane des neurones, c'est pourquoi nous avons principalement utilisé la lignée Ai32.

Cependant, nous n'avons jamais réussi à entraîner la dépolarisation des neurones GABAergiques lors des stimulations optiques sur ces souris et ce peu importe le type d'opsine utilisée. Nous avons également réalisé des croisements entre des lignées Emx1-cre (où la cre est exprimée spécifiquement dans les cellules glutamatergiques) avec des souris Ai32 ou Ai27 dans le but d'identifier les cellules pyramidales dans nos enregistrements et d'étudier leur activité. Cependant, comme pour les croisements précédents, nous n'avons pu faire décharger aucun neurone.

Il est possible que cette incapacité d'induire une décharge neuronale soit due au fait que le promoteur sous lequel était placé le gène Ai32 ou Ai27 n'était pas assez efficace pour permettre une expression d'opsine suffisante à la membrane des neurones. Nous nous sommes alors tournés vers une autre méthode consistant à apporter le transgène codant pour l'opsine via une injection de vecteurs viraux.

b. Injection de vecteurs viraux chez des souris exprimant la Cre

Cette méthode consiste à croiser des souris Gad::Cre hétérozygotes avec des souris swiss de sorte à obtenir une descendance Gad ::Cre +/-. Pour pouvoir compléter le système Cre-LoxP, le transgène portant la séquence codante pour l'opsine est apporté par injection de vecteurs viraux de type « Adeno Associated Virus » (AAV) dans les descendants Cre+ (**Figure II.3B**).

Les vecteurs viraux sont des outils couramment utilisés en biologie moléculaire pour faire exprimer un gène d'intérêt par des cellules. Une fois injecté dans le tissu cérébral, ces vecteurs viraux transfèrent dans les neurones leur matériel génétique contenant notamment le transgène codant pour l'opsine. Dans notre cas, ce transgène ne va pouvoir être transcrit que dans les neurones qui expriment la Cre, c'est-à-dire les neurones GABAergiques.

i) Dans le ventricule de souriceau nouveau-né (P0)

Au début de ma thèse, j'avais commencé par faire les injections de vecteurs viraux le jour de la naissance des souriceaux (jour postnatal (P)0).

Après avoir identifié les animaux qui expriment la Cre par PCR, ces derniers ont été au préalable anesthésié par hypothermie avant de recevoir une injection intra-ventriculaire d'une solution contenant les vecteurs viraux. Quelques jours plus tard (au minimum 3 jours) nous avons procédé aux enregistrements de ces souriceaux.

Contrairement à la méthode précédente, il nous a été ici possible d'induire la décharge de nombreux neurones par stimulation lumineuse. Cependant, il nous a toujours été difficile d'activer des neurones à des âges précoces (avant P6). A ces âges, nous avons réalisé que l'effet induit par la stimulation sur le LFP était très faible. De même, l'expression du gène rapporteur était faible. Ceci s'explique par le fait qu'il faille au moins 7 jours pour que les neurones infectés expriment suffisamment d'opsines à la membrane pour pouvoir être dépolarisés lors des stimulations lumineuses.

Pour exprimer de façon efficace l'opsine lors de la première semaine postnatale, il m'a donc fallu réaliser les injections avant la naissance, par injections in-utéro.

ii) Dans le ventricule In-utéro à E15

Pour qu'il y ait un maximum de neurones GABAergiques infectés par les vecteurs viraux lors des injections tout en limitant les risques d'avortements ou de complications lors de la mise bas de la mère gestante, j'ai décidé de faire les injections au 15ème jour de gestation (E15). A ce stade du développement embryonnaire, une grande partie des neurones GABAergiques ont été générés par les éminences ganglionnaires et sont en cours de migration vers le cortex et l'hippocampe où certains peuvent être déjà observés dans la Corne d'Ammon (Manent et al., 2006 ; Ang et al., 2003).

Des mères gestantes sont donc anesthésiées à E15 avant d'être incisées de sorte à accéder aux cornes utérines contenant les embryons (entre 8 et 10 embryons chacune). Les vecteurs viraux en solution sont injectés dans le ventricule cérébral de chaque embryon, via une pipette en verre et un pico spritzer. Ne pouvant pas savoir quels embryons expriment la Cre, j'ai été contrainte de les injecter de façon aléatoire. A la naissance, je pouvais obtenir quatre cas de figure d'animaux (Tableau 1). Dans seulement un cas sur les quatre l'opsine était exprimée par les neurones GABAergiques. Les souriceaux étant dépourvus de poils à la naissance, il est possible de voir par transparence et sous lumière fluorescente, la présence d'un marquage rouge à travers le crâne des animaux qui expriment l'opsine et ainsi pouvoir les identifier. Ces derniers sont enregistrés pendant la première semaine postnatale dès P3.

Tableau 1 : Les différents cas de figure obtenus à la naissance suite à la procédure d'injection in utéro

Génotypage des souriceaux	Injection des vecteurs viraux en in utéro	Expression de l'opsine dans les neurones GABAergiques à la naissance
Cre -	Oui	Non
Cre -	Non	Non
Cre +	Oui	**OUI** → marquage rouge
Cre +	Non	Non

Les injections in-utéro permettent une expression suffisante de l'opsine à la membrane des neurones GABAergiques pour qu'ils puissent être dépolarisés suite à une stimulation lumineuse dès les premiers jours de vie. Cependant, cette technique est complexe et nécessite l'utilisation d'un nombre important d'animaux et de solutions virales. C'est pourquoi je n'ai eu recours à cette technique que pour les enregistrements entre P3 et P5 inclus.

En conclusion, la méthode la plus efficace pour exprimer une opsine excitatrice dans les neurones GABAergiques de l'hippocampe néonatal consiste à injecter un vecteur viral contenant le transgène codant pour l'opsine dans des souris Gad::cre +/-. Bien que les injections à la naissance (P0) soient suffisantes pour induire une expression efficace de l'opsine durant la deuxième semaine de vie, cela n'est pas le cas pour des âges plus précoces. Il faut donc procéder à des injections in utero (à E15) pour obtenir une stimulation efficace lors de la première semaine postnatale.

En parallèle de l'élaboration de la méthode d'expression de l'opsine dans les neurones cibles, il a également été nécessaire de déterminer quel type de protéine photosensible était la mieux adaptée à la technique de ''l'opto-tagging''.

A noter :

- L'utilisation de ces animaux dans le cadre de mon projet de thèse suit les règles des protocoles expérimentaux décrits dans le projet APAFIS #28.506 #46290-2023121410536843 v5 et S #38060-2022072115429698 v9

2) Les différents types d'opsines et vecteurs viraux

Pour rappel, les opsines sont des canaux ioniques photosensibles qui s'activent suite à une stimulation lumineuse entrainant un échange ionique entre le milieu intra- et extra-cellulaire. En fonction du type d'opsine qui est exprimée à la membrane, cet échange ionique a pour conséquence une dépolarisation (entrée d'ions sodium) ou une hyperpolarisation (entrée d'ions chlore) de la cellule.

Les vecteurs viraux de type « Adeno Associated Virus » (AAV) sont des outils couramment utilisés en biologie moléculaire pour faire exprimer un gène d'intérêt, inséré au sein d'une construction génétique, à des cellules. En effet, les AAVs incorporent leur génome à l'intérieur des cellules qu'ils infectent via un mécanisme appelé transduction. Ce processus est d'autant plus efficace en fonction du sérotype des AAVs choisis pour infecter des types cellulaires en particulier. En effet, chaque sérotype d'AAV a une affinité pour différents types de cellules et tissus comme par exemple l'AAV9 qui confère une excellente pénétration de la barrière hémato-encéphalique et qui est donc plus adapté pour des études réalisées dans le système nerveux.

De nos jours, il existe donc une grande variété d'AAVs possédant des constructions génétiques différentes dans lesquelles sont insérés un transgène codant pour des opsines excitatrices. Selon les séquences présentes dans la construction génomique, les opsines vont avoir des caractéristiques différentes et leurs conditions d'expression par les cellules infectées ne seront pas les mêmes. Nous avons alors cherché à déterminer quelle était la construction virale la plus adaptée pour faire de l'opto-tagging chez les nouveau-nés.

Tout d'abord, nous avons testé le vecteur viral '*pAAV-EF1a-double floxed-hChR2(H134R)-mCherry-WPRE-HGHpA*' qui contient le transgène codant pour l'opsine excitatrice Channelrhodopsine (ChR2), photo-activable à une longueur d'onde de 470nm (**Figure II.4A et B**). Cette opsine est couramment utilisée dans les protocoles d'optogénétique in-vivo pour sa capacité à activer les neurones avec une précision temporelle élevée. Ici, le gène codant pour la ChR2 a été muté (l'histidine 134 est remplacée par une argine) afin d'optimiser l'efficacité de l'opsine et est couplé à une protéine de fusion mCherry (**Figure II.4B**). Dans cette construction génétique, l'expression de l'opsine est Cre dépendante de sorte à ce que seuls les neurones exprimant la cre (dans notre cas les neurones GABAergiques) puissent l'exprimer. De plus, le gène codant pour ChR2 est placé sous le contrôle d'un promoteur fort (EF1) de sorte à garantir une expression forte et stable de l'opsine dans la cellule infectée par l'AAV. Cet effet est également renforcé par l'insertion d'une séquence WPRE permettant d'augmenter l'expression des gènes. Une fois transcrite par les neurones exprimant la Cre, la ChR2 s'intègre aux membranes de l'ensemble du neurone (au niveau des axones, dendrites, somas, …) (**Figure II.4C et D**).

L'activation de la ChR2 via des stimulations lumineuses a permis de dépolariser de nombreux neurones. Cependant, bien qu'il ait été possible d'opto-tagger certains neurones, l'omniprésence de ChR2 sur l'ensemble de la membrane des neurones présente des désavantages pour l'opto-tagging. En effet, l'amplitude et la forme des PAs captés par les sites d'enregistrement sur les électrodes varient en fonction de leur localisation par rapport au soma des neurones. Plus ils sont proches du soma, plus les PAs émis sont de grande amplitude et vont pouvoir être détectés. Ainsi, si on stimule un neurone au niveau de ses terminaisons axonales, les PAs émis par ce dernier ne pourront pas être enregistrés par les sites d'enregistrement (qui sont colocalisés avec les fibres optiques) et par conséquent ce neurone ne pourra pas être opto-taggué. Nous avons donc voulu tester une opsine qui s'exprime exclusivement au niveau du soma pour augmenter nos chances d'opto-tagguer des neurones mais aussi pour limiter les effets de réseau en stimulant qu'un petit nombre de neurones (**Figure II.4C et E**).

Nous avons alors utilisé le vecteur viral '*pAAV-CAG-DIO-ChroME-ST-P2A-H2B-mRuby3*' qui contient le transgène codant pour une opsine CHroME (**Figure II.4A'**). Les opsines CHroME sont des versions optimisées des ChR2 qui sont ultra-rapides et très puissantes avec des photo-courants 3 à 5 fois plus grands. Comme pour le vecteur viral précédent, l'expression de l'opsine est Cre dépendante et se fait sous le contrôle d'un promoteur fort (CAG). Une des particularités de la construction génétique de ce vecteur est qu'il contient une séquence codante pour la composante P2A. Ainsi, après la traduction de l'opsine CHroME dans le cytoplasme, la protéine de fusion (mRuby3) qui lui est associée est clivée et retourne dans le noyau (**Figure II.4B' et C'**). Le fait que la protéine de fusion ne soit pas liée à l'opsine lui permet d'adopter une meilleure conformation pour s'intégrer à la membrane et d'être plus fonctionnel. De plus, cela permet une meilleure identification des neurones exprimant l'opsine puisque seuls les corps cellulaires sont marqués. La deuxième particularité de la construction génétique de ce vecteur viral est qu'il contient une séquence codante ST (''somato-targetted'') (**Figure II.4D'**). Ainsi, les opsines CHroME s'intègrent uniquement au niveau de la membrane du soma et des dendrites proximales des neurones permettant ainsi de limiter les effets sur le réseau lié à la libération de GABA dans le milieu extérieur lors de la stimulation. Les stimulations lumineuses à 470 nm ont permis de dépolariser et d'opto-tagguer de nombreux neurones GABAergiques tout en limitant les effets de réseau.

En vue de l'efficacité des vecteurs viraux '*pAAV-CAG-DIO-ChroME-ST-P2A-H2B-mRuby3'* et des avantages d'une telle construction, nous avons donc décidé de les utiliser pour notre projet. Ces vecteurs seront donc injectés chez des souris Gad::Cre, soit à la naissance pour des enregistrements après P5, soit in-utero, pour une expression efficace dès P3.

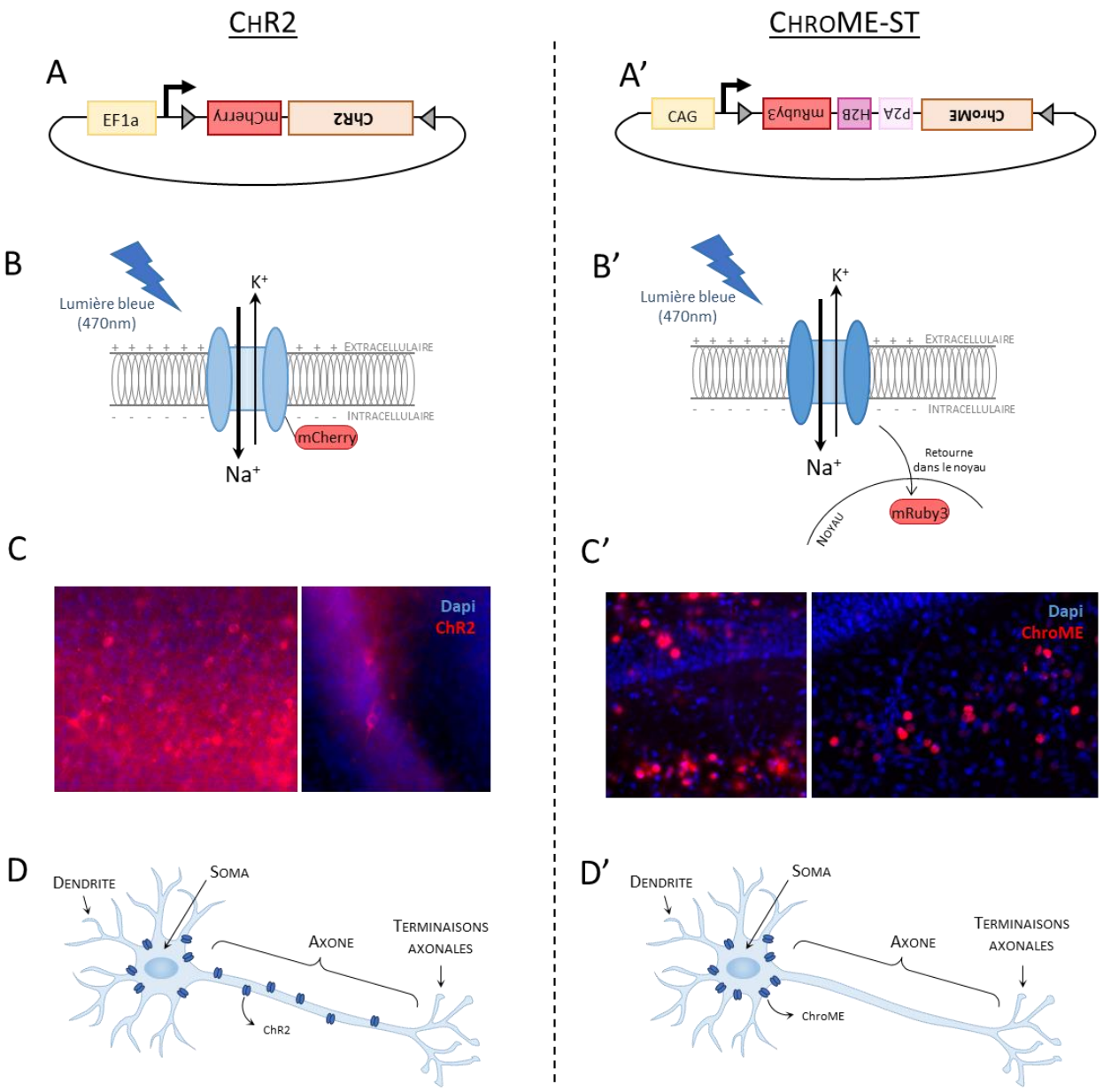


Figure II.4 : Les différences entre l'opsine ChR2 et ChroME

A. Construction génétique des vecteurs viraux dans lesquels se trouve le transgène codant pour l'opsine Chr2 ou (**A'**) ChroME. Ces transgènes (rectangles oranges) sont associés à une protéine de fusion mCherry ou mRuby3 (rectangles rouges) qui sont flanquées par des séquences LoxP (triangles gris) et qui sont sous le contrôle d'un promoteur fort EF1 ou CAG (rectangles jaunes). La construction génétique permettant l'expression de l'opsine ChroME contient une séquence codant pour P2A (rectangle rose) qui permet de cliver la protéine de fusion pour qu'elle puisse retourner dans le noyau et une séquence H2B (rectangle violet). **B.** Activation de l'opsine ChR2 et (**B'**) ChroME avec une source lumineuse de 470nm entrainant leur ouverture permettant l'entrée des ions Na+ et la sortie des ions K+ induisant la dépolarisation du neurone. La protéine de fusion est associée à la ChR2 tandis que pour ChroME elle est clivée et retourne dans le noyau. **C.** Marquage de l'opsine ChR2 et (**C'**) ChroME dans les neurones de CA1 (DAPI en bleu qui marque les noyaux). **D.** Représentation de l'intégration des opsines à la membrane des neurones. Chr2 est localisé sur l'ensemble de la membrane des neurones tandis que ChroME est localisé spécifiquement au niveau du corps cellulaire (**D'**).

B- Enregistrement de l'activite neuronale et photostimulation aux stades neonataux

En parallèle de la génération des souris transgéniques exprimant l'opsine, il a fallu coupler mon système d'enregistrement électrophysiologique extracellulaire à un système d'opto-stimulation efficace et élaborer un protocole de stimulation lumineuse approprié à l'opto-tagging.

Dans cette partie, je vais décrire le système d'enregistrement combiné au système de stimulation lumineuse que j'ai utilisé ainsi que les paramètres de stimulation utilisés pour opto-tagguer des neurones.

1) Système d'enregistrement électrophysiologique extracellulaire in-vivo

Cette technique permet d'enregistrer l'activité neuronale à différentes échelles à l'aide d'électrodes placées dans le milieu extracellulaire. Ainsi, les potentiels de champ locaux (Local Field Potential - LFPs) produits par la somme des contacts synaptiques au niveau des sites d'enregistrement mais aussi l'activité unitaire d'un grand nombre de neurones peuvent être enregistrés simultanément permettant une meilleure compréhension du fonctionnement des circuits neuronaux. De plus, ce type d'enregistrement offre une excellente résolution temporelle souvent de l'ordre de quelques microsecondes permettant de capturer des événements neuronaux rapides, tels que les PAs et leur synchronisation au sein de groupes neuronaux.

Cependant, avant de réaliser ces enregistrements, les souriceaux, âgés entre 3 et 12 jours, doivent au préalable subir une chirurgie.

a. Chirurgie à des stades postnataux

Les chirurgies chez les nouveau-nés sont des procédures compliquées notamment à cause des difficultés rencontrées pour les anesthésier.

La procédure chirurgicale que je réalise sur les souriceaux juste avant l'enregistrement a pour but de fixer la barre de tête au sommet du crâne de l'animal de sorte à pouvoir le maintenir durant l'enregistrement et de réaliser deux craniotomies dans chaque hémisphère au-dessus de l'emplacement des hippocampes pour y insérer les électrodes par la suite. En même temps, deux fils en chlorure d'argent sont placés entre le crâne et la dure-mère au niveau du cortex servant de masse et de référence lors des enregistrements. Cette procédure étant invasive et douloureuse, elle doit par conséquent se faire sur animaux analgésiés et anesthésiés. Il est possible de faire une anesthésie gazeuse sur les souris âgées de plus de 5 jours. Cependant, il faut avoir recours à une concentration plus élevée en gaz que celle qui est habituellement utilisée chez l'adulte. Chez les animaux plus jeunes, l'anesthésie est extrêmement difficile à induire et, lorsque cela est atteint sous des concentrations très fortes, 90% des individus meurent. J'ai donc dû avoir recours à une anesthésie par hypothermie. Celle-ci n'est induite que pendant la première phase de la procédure qui est la plus invasive pour les animaux. Ne pouvant pas garder les animaux plus de 15 minutes en hypothermie, les souriceaux sont ensuite réchauffés et placés sous anesthésie gazeuse qui les maintient dans un état semi-inconscient pendant le reste de la procédure. Ainsi j'ai pu diminuer le taux de mortalité qui passe à 5% avec une anesthésie par le froid.

Une trentaine de minutes après la chirurgie, une fois que l'anesthésie n'est plus active, les souriceaux sont fixés au set up d'enregistrement par la barre de tête. Le reste de leur corps est placé sur des capteurs de mouvement (piezzo sensor) et leur température est maintenue à 37°C.

b. Composition du système d'électrophysiologie extracellulaire

Une fois l'animal placé sur le système d'électrophysiologie, nous procédons à l'enregistrement des potentiels de champs locaux (LFPs) et de l'activité neuronale extracellulaire (**Figure II.5A**). Les électrodes multicontactes, appelées "sillicon probes", sont placées le long de CA1 dans l'axe radial de l'hippocampe dorsal. J'ai utilisé deux types d'électrode : une silicon probe linéaire avec des canaux placés sur un seul axe, et une électrode avec des canaux placés côte à côte (Buszaki 32 ou une Assy-77 P1). Les électrodes linéaires sont idéales pour enregistrer les LFP au travers des couches corticales tandis que les électrodes en rangée sont idéales pour le tri des PAs en post-acquisition. Chaque type d'électrode est placé dans un seul hippocampe (dans la région de CA1), en controlatéral de l'autre. Elles sont recouvertes au préalable d'un marqueur fluorescent rouge (DiI, Sigma), permettant de retrouver leur emplacement par examen histologique. Je reviendrai plus en détail sur les caractéristiques de ces électrodes dans la partie suivante. Les électrodes sont descendues grâce à un micromanipulateur (Scientifica) jusqu'à la couche pyramidale (900-1200 µm de profondeur en fonction de l'âge) pour les électrodes en rangées et jusqu'au stratum Lacunosum Moleculare pour les électrodes linéaires.

Le signal électrophysiologique qu'elles détectent est digitalisé, échantillonné (Fréquence d'échantillonnage : 30KHz) multiplexé et filtré (entre 0.1Hz- 6000Hz) par un préamplificateur placé directement sur l'adaptateur de l'électrode. Le signal est ensuite envoyé sur un système d'acquisition (RHD2000_evaluation_system, INTAN technologies) qui reçoit également en parallèle le signal analogique provenant des capteurs piezzo-électriques (placés sous les souriceaux). Le système d'acquisition transmet et stocke les données sur l'ordinateur et est contrôlé via l'interface utilisateur graphique Open-Ephys. J'ai réalisé 2 à 6 sessions d'enregistrements de 25 minutes par souriceaux. Entre chaque session, les électrodes sont descendues de 50 à 100 µm pour enregistrer l'activité neuronale dans différentes profondeurs de CA1.

Ce qui fait la particularité du système d'enregistrement que j'ai utilisé est le type d'électrodes utilisées. En effet, certaines ont spécialement été conçues pour l'optogénétique puisqu'elles possèdent une fibre optique positionnée à proximité des sites d'enregistrement de sorte à ce que la stimulation lumineuse reste très locale et n'induise pas de phénomènes de réseau importants. Durant ma thèse, j'ai eu l'occasion de tester plusieurs électrodes dont je vais présenter les spécificités et les avantages dans la partie suivante.

c. Les différents types d'électrodes

Pour enregistrer l'activité neuronale de CA1 en in-vivo, j'ai eu recours à des silicon probes qui sont très utilisés de nos jours en électrophysiologie pour leur faible impédance permettant de faire des enregistrements de très bon rapport signal sur bruit mais aussi pour la multitude de sites d'enregistrement qu'elles ont à leur surface.

Selon le type de silicon probe, les sites d'enregistrement peuvent être regroupés en rangées sur une petite surface de sorte à enregistrer l'activité neuronale d'une région bien précise du cerveau ou ils peuvent être répartis de façon plus éparse pour pouvoir enregistrer l'activité sur plusieurs profondeurs. J'ai eu recours à deux types de silicon probes dont certaines ont spécialement été pensées pour l'optogénétique comme nous allons le voir dans cette partie.

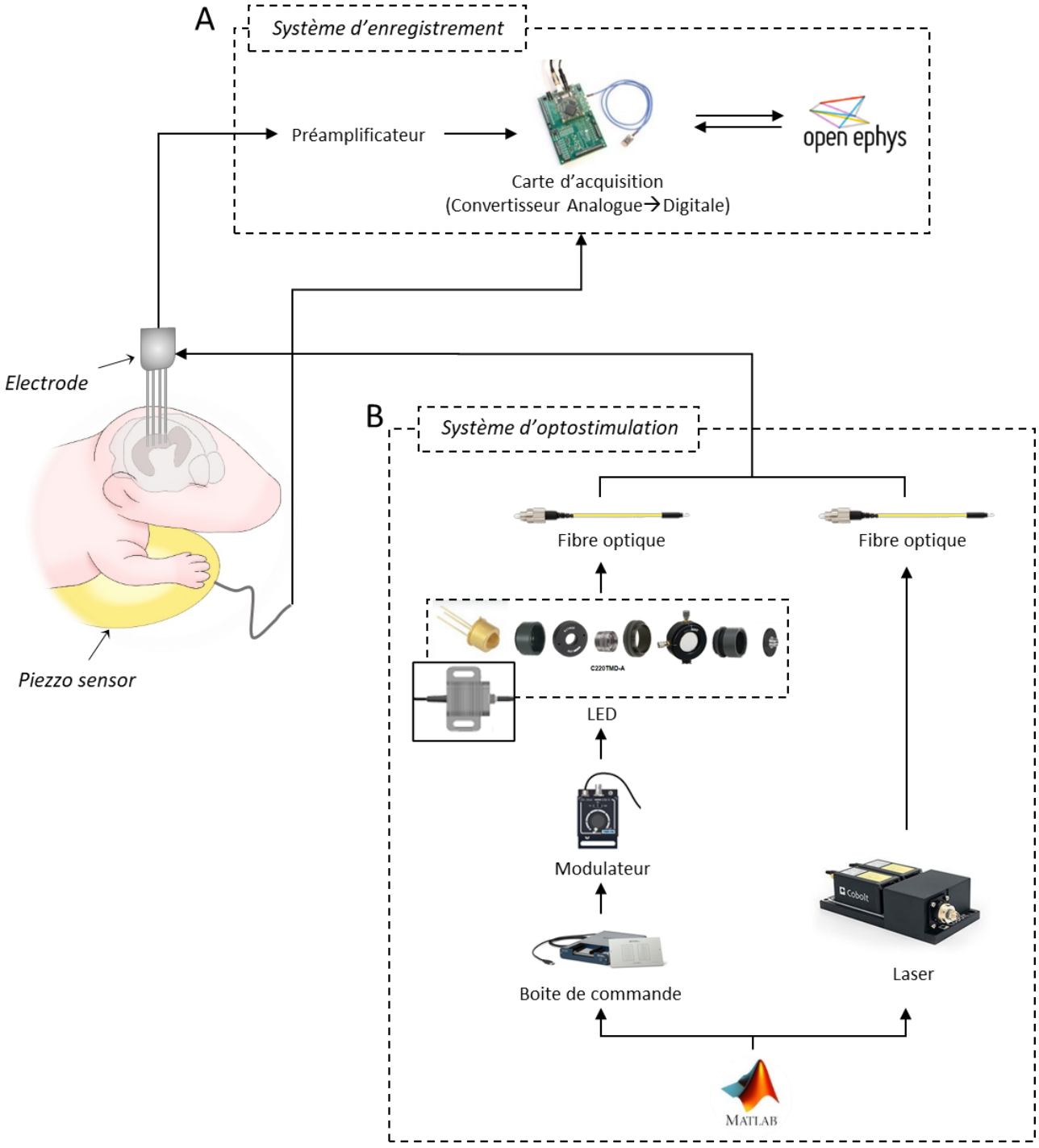


Figure II.5 : Le set up d'enregistrement électrophysiologique extracellulaire couplé au système d'opto-stimulation

A. Représentation du système d'enregistrement électrophysiologique extracellulaire. Le signal détecté par l'électrode est digitalisé, filtré et multiplexé directement par le préamplificateur, le signal est ensuite transmis par la carte d'acquisition à l'ordinateur. Le programme d'acquisition Open-ephys permet de contrôler cette carte afin de régler les paramètres du signal comme l'amplification ou la fréquence des filtres. **B.** Représentation du système de stimulation optogénétique. La stimulation est induite via Matlab qui contrôle la boite de commande d'entrées-sorties afin d'envoyer des pulses lumineux avec quatre LED connectées à des fibres placées sur chaque bras de l'électrode Buszaki 32. Lorsqu'on utilise le laser comme source lumineuse, Matlab le contrôle directement.

i) Buzsaki32 (Neuronexus)

Ces électrodes sont constituées de 4 ‘’tiges’’ (‘’shanks’’ en anglais) chacune contenant 8 sites (ou canaux) d’enregistrements disposés ici en “V” à un intervalle de 20 µm les uns des autres (**Figure II.6A**). Cette conformation et le faible espace qui sépare les canaux entre eux confèrent à cette électrode un avantage lors de la réalisation du processus de spike sorting à partir des activités unitaires : les PAs de la même cellule apparaissent sur plusieurs contacts à la fois, mais avec une forme différente. Cela permet de réaliser une sorte de triangulation qui permettra le tri des potentiels d’action comme nous le verrons plus loin dans ce manuscrit.

De plus, les Buzsaki32 que nous avons utilisées sont spécialement conçues pour l’optogénétique puisqu’une fibre optique est collée sur chaque shank permettant ainsi de réaliser des stimulations locales. Lorsqu’on fait de l’opto-tagging, il est préférable que les stimulations lumineuses se fassent à proximité des sites d’enregistrement pour que seuls les neurones se trouvant à proximité puissent être dépolarisés. Les effets de réseau liés à l’activation simultanée d’un trop grand nombre de neurones peuvent en effet compromettre la détection des neurones opto-taggués (Royer et al,2010) (**Figure II.6C et D**).

ii) Assy-77 P1 (Cambridge Neurotech)

Ces électrodes sont constituées de 4 shanks chacun contenant 16 canaux d’enregistrements disposés en rangées parallèles à un intervalle de 12,5 µm les uns des autres (**Figure II.6A**).

Cette électrode est encore plus performante que les Buzsaki32 du fait de la densité plus forte de contacts recouvrant une plus grande zone à enregistrer. Ainsi, je peux enregistrer l’activité neuronale dans plusieurs couches de CA1 en même temps. De plus, les Assy-77 P1 que nous utilisons ont une fibre optique qui est placée juste en face des 4 shanks faisant que la stimulation lumineuse reste localisée au niveau des sites d’enregistrement mais est toutefois plus étendue que pour les Buzsaki32 (**Figure II.6E**). Ces électrodes étant apparues plus tard que les Buzsaki32, nous ne les avons utilisées qu’à partir de 2022.

iii) Les électrodes linéaires : Ai32 ou Edge (Neuronexus)

Ces électrodes sont toutes deux constituées d’un seul shank contenant de 32 canaux d’enregistrement répartis linéairement. L’avantage de cette disposition linéaire des sites d’enregistrement est qu’elle permet de détecter les signaux électrophysiologiques simultanément dans toutes les couches de l’hippocampe (**Figure II.6B**). Nous le verrons, cela nous permet d’étudier les différentes composantes électrophysiologiques (voltage, courants) associées au même phénomène, ici les eSPWs.

Les électrodes de type Edge ou Ai32 possèdent toutes deux 32 canaux mais diffèrent par l’espacement qui sépare les contacts. Il est de 60µm pour l’électrode Edge et de 50µm pour l’Ai32. Il en résulte une résolution spatiale plus importante pour l’Ai32 mais une étendue au sein des couches de CA1 moins grande (1550µm d’empan contre 1860µm chez la Edge). Enfin, l’Ai32 possède une référence déjà intégrée, proche de la surface du cerveau, ce qui limite les artefacts électromagnétiques.

Ces électrodes ne sont pas idéales lorsqu’on veut faire du spike sorting à cause du trop grand espace entre les canaux mais sont idéales pour enregistrer le LFP dans plusieurs couches simultanément.

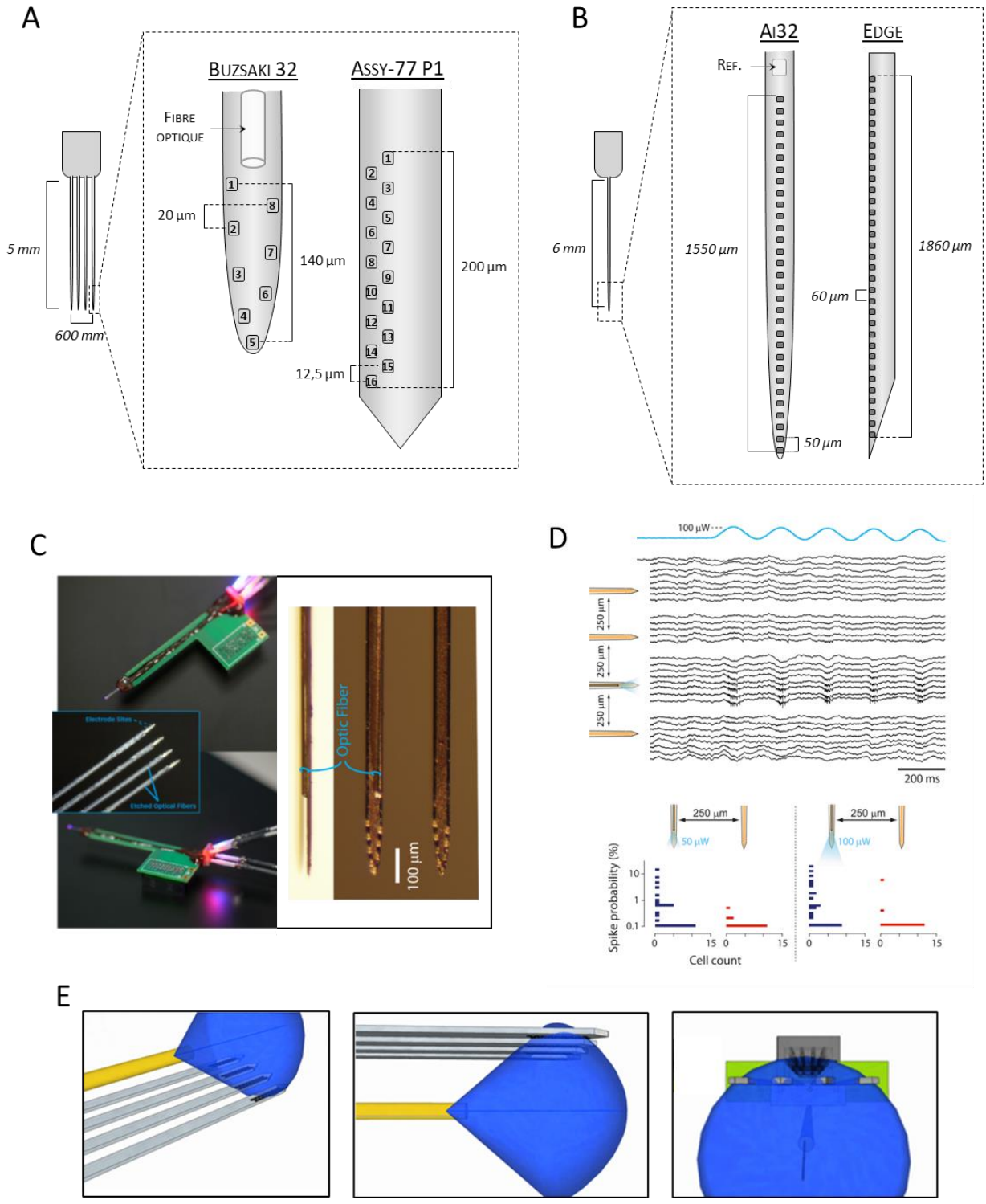


Figure II.6 : Les différents types d'électrodes utilisées

A. Représentation de l'électrode Buzsaki 32 et Assy-77 P1. **B.** Représentation des électrodes linéaires Ai32 et Edge. **C.** Photos d'une électrode Buszaki 32 observée au microscope binoculaire. **D.** Résolution spatiale des stimulations lumineuses avec une électrode Buzsaki 32. (en haut) Signaux enregistrés sur tous les shanks. Les tracés sont regroupés et alignés sur leur shank correspondante (schéma à gauche). Notez l'apparition d'une activité neuronale de manière sélective sur le shank équipé d'une fibre optique lorsque la stimulation lumineuse (trace bleue en haut) est activée. (en bas) Histogrammes des amplitudes de réponses des neurones enregistrés sur le shank équipé d'une fibre optique (barres bleues) et sur le shank voisin (barres rouges), pour deux niveaux d'intensité lumineuse. L'axe des y indique la probabilité qu'un stimulus évoque un PA (potentiel d'action). **E.** Représentation du positionnement de la fibre optique sur la Assy-77 P1. *Ref : référence ; Adapté de Royer et al., 2010*

Tableau 2 : Caractéristiques des différents types d'électrodes

Electrode	Configuration des canaux	Nombre de shank	Nombre de canaux	Espace entre les canaux	Profondeur de recouvrement	Fibre optique	Utilisation	
							LFP rec.	SUA
Buzsaki32	En V	4	8*4=32	20µm	140µm	oui	**	***
Assy-77 P1			16*4=64	12,5µm	200µm		***	****
Edge	Linéaire	1	1*32	60µm	1860µm	non	***	*
Ai32				50µm	1550µm		***	*

*NB : *Peu adapté - ****Très adapté*

Pour enregistrer l'activité neuronale dans CA1, j'utilise systématiquement une électrode linéaire et une électrode à rangées couplée à une ou plusieurs fibres optiques. Cela me permet d'enregistrer l'activité unitaire des neurones et les LFP associés aux eSPWs tout en réalisant des stimulations lumineuses localement.

Au départ, j'utilisais les Buzsaki32 qui ont pour avantage de libérer la lumière lors des stimulations uniquement au niveau d'un seul shank. Cependant, devant la fragilité de ces électrodes rendant très compliqué leur entretien régulier, j'ai fini par utiliser les Assy-77. Ces dernières se sont avérées être encore plus efficaces que les précédentes que ce soit pour induire la décharge des neurones ou pour leur capacité à enregistrer l'activité de deux fois plus de neurones répartis sur une plus grande surface.

2) Système de photostimulation in-vivo

Ce système de stimulation lumineuse est un système "fait maison", mis en place au laboratoire en collaboration avec Sophie Burstlein, ingénieure Centuri à l'époque (**Figure II.5B**). Pendant les sessions d'enregistrement, les stimulations lumineuses sont générées via un code Matlab (MathWorks, USA) réalisé par mon superviseur, Pierre-Pascal Lenck-Santini. Ce code permet de contrôler une carte contrôleur (National Instruments) qui envoie des trains de stimulation (TTL) aux modules de stimulation LED ou Laser. Les signaux lumineux produits sont dirigés vers une fibre optique (50µm NA 0,22) qui est connectée à celle se trouvant sur les électrodes.

Pour synchroniser les stimulations avec le signal électrophysiologique, un TTL est envoyé, en même temps depuis la carte de stimulation au système d'acquisition des EEG. Ce signal est enregistré en parallèle des signaux électrophysiologiques et peut donc être retrouvé à posteriori dans les fichiers d'enregistrement pour réaliser les analyses.

J'ai testé différents modules de sources lumineuses ainsi que différents paramètres de stimulation dans le but de trouver la façon la plus optimale pour activer et opto-tagguer des neurones GABAergiques immatures sans léser le tissu cérébral.

a. Les différentes sources lumineuses

Dans un premier temps, j'ai utilisé un système de LED comme source lumineuse afin d'avoir des stimulations plus localisées et de faible puissance pour ne pas endommager le tissu et empêcher la décharge d'un grand nombre de neurones simultanément (éviter un chevauchement des PAs).

Pour cela, le signal lumineux provenant de la LED (puissance optique : 170 mW at 350mA, 470 nm) a été aligné avec un système de lentilles pour le diriger vers la fibre optique. Nous avons ajusté l'alignement des lentilles de sorte à obtenir le maximum de lumière à la sortie de la fibre, c'est-à-dire entre 30 et 38µW à 350mA. Cependant,

une fois cette fibre connectée à celle se trouvant sur l'électrode, la puissance obtenue à la sortie de cette dernière est de ~16µW. Avec cette puissance, seuls les neurones exprimant l'opsine et se trouvant très proches de la sortie de la fibre pouvaient être excités pendant les stimulations. Par conséquent, il nous était très difficile d'obtenir des cellules opto-tagguées dans nos enregistrements.

Pour augmenter nos chances d'induire la décharge de neurones, nous avons augmenté le courant maximal de stimulation des LEDs au-delà de la limite fixée par le constructeur à 700mA mais ça n'a pas été suffisant. C'est pourquoi nous nous sommes tournés vers une autre source lumineuse plus puissante et plus couramment utilisée en optogénétique : le laser.

Avec le laser comme source lumineuse, la surface de stimulation autour de l'électrode est plus large et la puissance à la sortie de la fibre se trouvant sur l'électrode est plus forte (>100µw). Lors des stimulations, un plus grand nombre de neurones exprimant l'opsine sont alors excités ce qui augmente nos chances d'en avoir des opto-taggués dans nos enregistrements.

Cependant, les stimulations au laser peuvent avoir de nombreux inconvénients si la puissance utilisée est trop forte comme l'apparition d'artefacts de stimulation, des dommages du tissu, le chevauchement de PAs lié à l'excitation massive d'un grand nombre de neurones simultanément rendant impossible leur détection individuelle. Dans mon cas, j'excite seulement un petit nombre de neurones (les interneurones représentent seulement 10% des neurones de CA1) ce qui me permet d'éviter les phénomènes de chevauchement des PAs. Cependant, si on avait voulu opto-tagguer les neurones glutamatergiques, la stimulation au laser aurait créé des chevauchements de PAs rendant leur détection et différentiation impossible.

Pour s'assurer que la stimulation laser seule n'avait pas d'impact sur l'activité neuronale, j'ai réalisé des enregistrements contrôle sur des animaux qui n'exprimaient pas l'opsine. En effet, des stimulations lumineuses au laser ont été réalisées chez des souris qui n'exprimaient pas le Cre et injectées ou non avec les vecteurs viraux. Chez ces animaux, les stimulations n'induisaient aucun effet sur l'activité neuronale de CA1.

Malgré les inconvénients rencontrés avec le laser, cette source lumineuse est la plus efficace lorsqu'on veut faire de l'optogénétique à condition de veiller à ne pas faire de stimulation trop longue et trop puissante pour ne pas endommager les cellules nerveuses.

b. Paramètres de stimulation lumineuse

Afin de permettre une ségrégation efficace des PAs lors du processus de "spike sorting", il est indispensable d'éviter leur chevauchement lors des stimulations. Cependant, des stimulations courtes de type ''on/off'' (brief pulse ou square pulse), traditionnellement utilisées en optogénétique, ne le permettent pas. Tous les neurones présents au voisinage de la fibre déchargent au même instant, émettant des PAs simultanément, rendant impossible leur détection en post-acquisition (**Figure II.7A-C**).

Pour empêcher ce phénomène, je me suis inspirée d'une publication de S. Royer qui montre qu'une stimulation en rampe progressive, comme celle produite par une sinusoïde, permet une décharge décalée des neurones. Ceci rend alors possible la détection des PAs émis et leur discrimination ultérieure (**Figure II.7C**) (Royer 2010).

De plus, après plusieurs essais, nous avons établi que le meilleur patron de stimulation pour faire de l'opto-tagging était des trains de 10 à 12 courtes stimulations lumineuses de 20ms à 1Hz. J'ai choisi de réaliser de brèves stimulations pour ne pas léser le tissu mais aussi pour ne pas endommager les LEDs, quand je les ai utilisées comme source lumineuse, dont la puissance a été augmentée au-delà des limites fixées par le constructeur (**Figure II.7D et E**). Ce patron de stimulation est appliqué une dizaine de fois par session d'enregistrement.

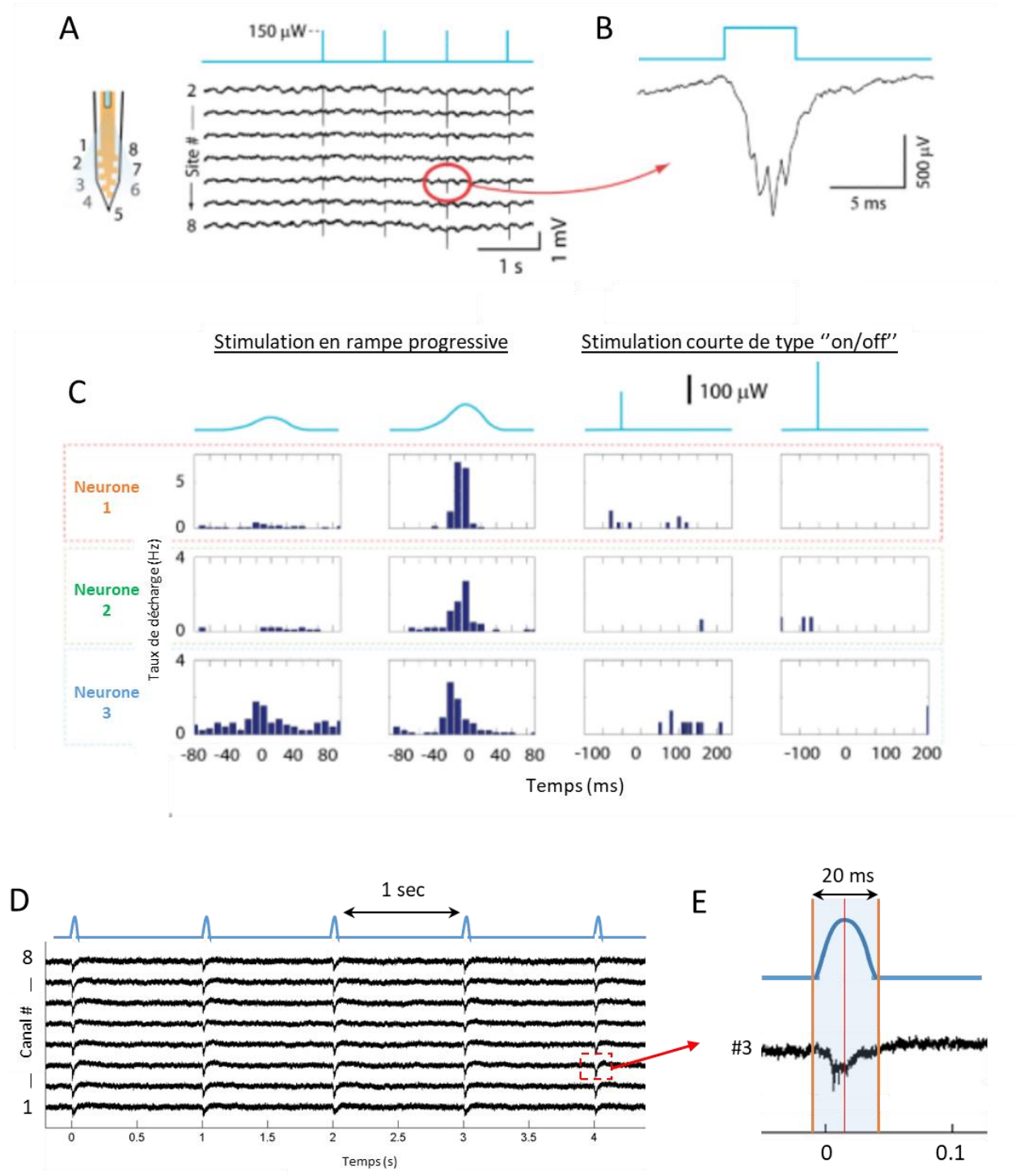


Figure II.7 : Comparaison entre des stimulations de type onde sinusoïdale et impulsion courte de type ''on/off''.

A. Signaux enregistrés à partir d'un shank équipé d'une fibre optique, avant et pendant un schéma de stimulation à 1 Hz utilisant des impulsions courtes de type ''on/off'' d'une durée de 5 ms (ligne bleue en haut). Le schéma à gauche montre les positions des sites d'enregistrement correspondant aux numéros des traces. **B.** Vue agrandie de la réponse d'un canal à l'impulsion lumineuse. **C.** Péri-stimulus histogrammes du taux de décharge de 3 neurones pendant des stimulations en rampe progressive (de type onde sinusoïdale) ou courtes de type ''on/off''. Les traces bleues en haut représentent la forme de l'onde des stimulations lumineuses. Le temps zéro correspond au sommet des ondes sinusoïdales ou au début des impulsions courtes ''on/off''. *Adapté de Royer et al., 2010.* **D.** Comme en A, mais ici les signaux sont obtenus à partir de nos enregistrements réalisés avec le même type d'électrode que dans la publication *Royer et al., 2010.* Les paramètres de stimulation utilisés ici sont un schéma d'une dizaine de stimulations à 1 Hz utilisant des impulsions en rampe progressive d'une durée de 20 ms (ligne bleue en haut). **E.** Comme en B.

3) Système d'induction de la photostimulation par détection des eSPWs

Bien que nous ayons eu recours à la technique de l'optogénétique dans le but d'identifier les neurones GABAergiques, nous l'avons également utilisée pour étudier l'effet de ces neurones dans les réseaux immatures. A ces stades précoces du développement l'effet dépolarisant du GABA est un sujet très controversé in vivo (cf. Introduction). Le faible taux de décharge des neurones à ces âges rend compliqué les études portant sur l'effet du GABA notamment pour observer un potentiel effet inhibiteur. En effet, si les neurones déchargent très peu il est impossible de savoir la libération du GABA dans le milieu extracellulaire à un temps donné entraine une inhibition de ces neurones qui sont déjà ''silencieux''.

Pour pallier à ce problème, nous avons tiré parti de la forte activité neuronale qui est présente durant les eSPWs afin de voir l'impact qu'a l'activation des neurones GABAergiques sur les neurones immatures. Pour cela, les eSPWs sont détectées durant les enregistrements via notre système d'acquisition OpenEphys grâce à un module permettant de fixer un seuil sur un canal d'enregistrement souhaité (-80µV à -120µV en fonction de l'amplitude des oscillations présentes). Lorsque le signal présent sur ce canal dépasse le seuil, un signal est envoyé à un code Python qui permet de déclencher un train de stimulations lumineuses selon des paramètres préalablement établis (stimulation en square pulse à 30 Hz ; durée 1ms ; duty 0.1) (**Figure II.8**). Les enregistrements ont été faits uniquement avec l'électrode Assy-77 et avec le laser comme source lumineuse pour recouvrir une plus grande surface et ainsi enregistrer et dépolariser une grande population de neurones.

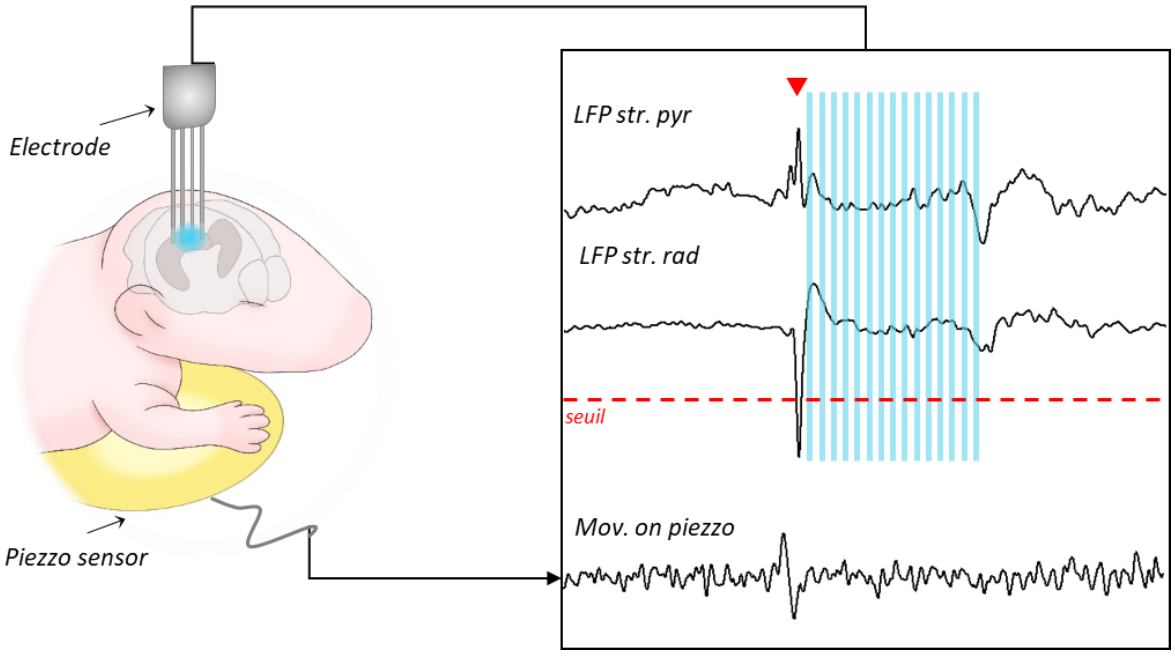


Figure II.8 : Principe du système d'induction de la photostimulation par détection des eSPWs

Lorsque le signal dépasse le seuil (ligne en pointillés rouges) suite à la présence d'une eSPW (triangle rouge), un signal est transmis à un code Python qui permet de déclencher un train de stimulations lumineuses (traits bleus).

4) Acquisition d'image en post-enregistrement

A la fin des enregistrements, les cerveaux des souris sont prélevés pour vérifier la localisation des sites d'insertion des électrodes. Après avoir été fixés dans du paraformaldéhyde, les cerveaux sont coupés au vibratome en coupes de 100-120 µm dans le plan coronal. Les coupes contenant les hippocampes sont sélectionnées et montées sur lames avant d'être scellées avec un milieu de montage contenant du DAPI (pour marquer le noyau des cellules).

Ces coupes sont ensuite observées à l'apotome (Zeiss), un microscope optique, afin de réaliser des acquisitions d'images de chaque bras d'électrodes (marqués avec du DiI) dans les hippocampes. A partir de ces images, la localisation dans l'axe proximo-distal des électrodes ainsi que l'épaisseur des couches de CA1 sont déterminées en post-acquisition comme nous le verrons plus loin dans ce manuscrit.

De plus, ces images fournissent des indications sur l'intensité d'expression des opsines par les neurones GABAergiques de la région CA1. Plus l'intensité du marquage mRuby/mCherry est élevée plus le nombre de neurones infectés par les vecteurs viraux et exprimant l'opsine est important. Des immunohistochimies ont été également réalisées sur certaines coupes de cerveaux pour vérifier que l'expression de l'opsine est bien spécifique aux interneurones GABAergiques.

II Pré-traitement des données brutes

Cette étape consiste à préparer les données brutes obtenues à partir des enregistrements réalisés chez les souris néonatales avant de faire les analyses visant à décrire et comprendre l'activité neuronale de CA1 et l'effet du GABA sur le réseau immature.

En fonction du filtrage appliqué sur les signaux électrophysiologiques enregistrés, il est possible de faire des analyses à différentes échelles allant de l'étude de la somme des courants synaptiques (LFPs) à l'étude de l'activité unitaire d'un ensemble de neurones permettant ainsi une compréhension complète de l'activité neuronale (**Figure II.9**).

Lors du pré-traitement des signaux enregistrés par les électrodes, j'ai effectué un processus de "spike sorting" permettant d'identifier les PAs générés par les neurones, de les classifier et de les associer à des neurones spécifiques. J'ai ensuite identifié les neurones qui ont été opto-taggués pour savoir lesquels d'entre eux sont des neurones GABAergiques. En parallèle, j'ai également identifié les moments dans les enregistrements où se produisent les eSPWs et j'ai estimé la localisation des neurones dans CA1. Pour cela, j'ai utilisé de nombreux programmes dont les paramètres ont dû être adaptés pour être applicables à l'activité enregistrée chez des nouveau-nés, ainsi que de nombreux codes dont certains ont été écrits par moi-même.

A- Analyse de l'activite unitaire des neurones de CA1 (SUA)

L'analyse de l'activité unitaire (Single Units Analysis - SUA) consiste à étudier l'activité des neurones de façon individuelle contrairement aux analyses multi-unitaires (MUA) où l'on étudie l'activité d'une population de neurones dans son ensemble (**Figure II.9B**). En faisant ce type d'analyses, il est donc possible de suivre l'activité d'un neurone en particulier au cours du temps et ainsi d'étudier ses caractéristiques de décharge.

Dans le cadre de mon projet, je cherche à caractériser l'activité des neurones, en particulier celle des neurones GABAergiques, durant les eSPWs. Il est donc crucial pour mes études de travailler à l'échelle ''unitaire''.

L'activité de plusieurs neurones adjacents aux électrodes étant captée simultanément durant les enregistrements, un processus de ''spike sorting'' est donc nécessaire pour identifier l'activité des cellules individuellement avant d'être ensuite déterminée comme étant opto-tagguée ou non.

1) Principe du processus de ''Spike sorting''

Le processus de ''spike sorting'' permet d'extraire d'un enregistrement électrophysiologique extracellulaire tous les PAs émis par les neurones à proximité des électrodes et de les trier en fonction des caractéristiques de leur forme d'onde. En effet, les PAs émis par les neurones se distinguent essentiellement par leur forme qui est différente d'un neurone à l'autre. Cette différence peut s'expliquer par la dynamique de génération des PAs qui

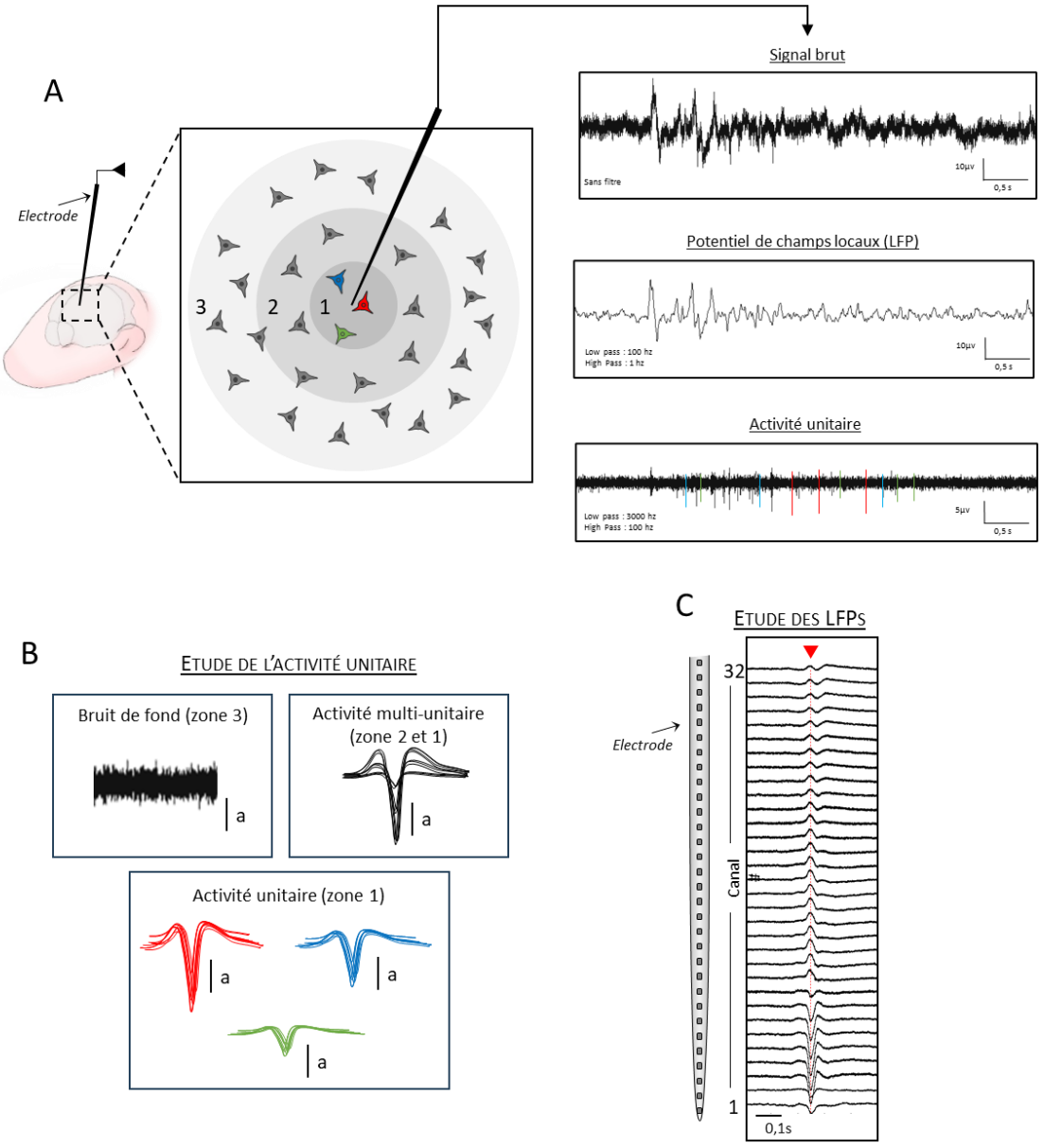


Figure II.9 : Principe des enregistrements extracellulaires in-vivo

A. Représentation schématique du principe d'un enregistrement extracellulaire in vivo. L'électrode détecte le signal émis dans le milieu extracellulaire par plusieurs neurones alentour (à gauche). Le signal brut (trace en haut à droite) contient un mélange de bruit de fond correspondant à l'activité de neurones très éloignés de l'électrode (zone 3, gris clair) et à l'activité unitaire correspondant aux PAs émis par des neurones plus proches de l'électrode (zone 1 et 2, gris foncé). Selon le filtrage appliqué sur le signal brut, la somme de ces courants synaptiques (LFPs), correspondant aux signaux à basse fréquence (<300Hz), peut être observée (trace au milieu à droite). L'activité unitaire des neurones peut également être observée lorsqu'on filtre de sorte à supprimer les signaux de basse fréquence (trace en bas à droite). Le fait de supprimer les basses fréquences permet de faciliter la détection des PAs par dépassement d'un seuil au-dessus du bruit de fond. **B.** Représentation de la forme des PAs émis par les neurones et leur discrimination selon leur localisation par rapport à l'électrode. L'activité des neurones se trouvant dans la zone la plus éloignée de l'électrode (zone 3, gris clair) n'est pas captée par l'électrode et correspond à du bruit de fond. Les PAs émis par les neurones à proximité de l'électrode (zone 1 et 2, gris foncé) sont captés et vont pouvoir être détectés par la suite. Cependant, les neurones de la zone 2 ne sont pas assez proches de l'électrode pour que leurs PAs puissent être triés en fonction de leur forme et de leur amplitude (a) par le processus de ''spike sorting''. Seuls les PAs émis par les neurones se trouvant dans la zone 1, c'est-à-dire très proches de l'électrode, vont pouvoir être discriminés par ce processus comme on peut le voir avec l'exemple des neurones bleu, vert et rouge. **C.** Ensemble des signaux captés par les sites d'enregistrement d'une électrode placée dans l'axe radial de CA1. Le signal est filtré de sorte à pouvoir étudier la somme des courants synaptiques (LFPs). Ici, on voit le LFP enregistré au moment d'une eSPW (triangle et pointillés rouges). *a : amplitude arbitraire.*

n'est pas la même en fonction du type cellulaire mais aussi par la distance qu'il y a entre les sites d'enregistrement et le neurone enregistré (**Figure II.10A**). Ainsi, les PAs issus d'un même neurone sont très similaires (à condition que l'électrode reste immobile).

Le processus de ''spike sorting'' utilise donc cette caractéristique pour classifier les PAs en plusieurs groupes appelés clusters correspondant aux différents neurones présents à proximité de l'électrode. L'efficacité et la précision de ce processus dépendent en grande partie de la géométrie des électrodes. Plus il y a de sites d'enregistrement proches les uns des autres (pouvant parfois aller jusqu'à une centaine séparés par une dizaine de micron) plus les enregistrements auront une résolution élevée. C'est pourquoi, nous avons utilisé les signaux obtenus à partir des électrodes Buszaki32 et Assy-77 P1 pour étudier l'activité unitaire.

Cependant, les programmes de ''spike sorting'' sont développés pour être réalisés sur des enregistrements faits chez l'adulte. Aux stades néonataux, les neurones déchargent très peu et les PAs, en plus d'être de petite amplitude, ont des propriétés différentes de celles émises par les neurones matures (Weir et al. 2015). Par conséquent, la réalisation de processus de ''spike sorting'' est difficile à ces stades précoces, faisant qu'à ce jour, très peu de publications ont étudié l'activité unitaire durant les deux premières semaines postnatales.

Pour pallier à ces difficultés et faire du ''spike sorting'' sur nos enregistrements, nous avons utilisé un programme développé par Pierre Yger et ses collaborateurs, appelé SpyKING CIRCUS (Yger et al., 2018), dans lequel j'ai dû modifier certains paramètres pour adapter ce programme à l'activité des neurones immatures.

2) Programme de spike sorting : SpyKING CIRCUS

Comme pour tous les programmes de ''spike sorting'', SpyKING CIRCUS permet de détecter et de classer les PAs en cluster en suivant 3 étapes principales : (1) détection des PAs et extraction de leurs caractéristiques, (2) classification des PAs en clusters en fonction de caractéristiques similaires et (3) vérification et ajustement manuels des clusters.

Ce programme a également pour particularité de faire un spike sorting semi-automatique sur un grand nombre de neurones enregistrés simultanément en extracellulaire via une approche "d'appariement à un modèle » (en anglais ''template matching'') qui consiste à trouver un motif dans un signal par rapport à un motif modèle. Ainsi, grâce à cette approche, des PAs qui se chevauchent peuvent être détectés par l'algorithme et intégrés dans les clusters.

Quand des PAs se chevauchent, leur détection conduit à des valeurs aberrantes de clusters et ils vont être automatiquement éliminés par les algorithmes classiques de ''spike sorting''. Par conséquent, les PAs en collision qui ont été émis par deux neurones distincts vont être ignorés et ne vont pas être intégrés dans un cluster, ce qui est problématique quand on veut connaitre l'interaction temporelle précise entre des neurones. Ces phénomènes de chevauchement de PAs sont d'autant plus fréquents lors d'événements qui entrainent une activation synchrone d'un grand nombre de neurones, comme c'est le cas pour les activités spontanées néonatales et les stimulations optiques. C'est pourquoi, il était crucial de trouver un algorithme capable de détecter les PAs qui sont entrés en collision.

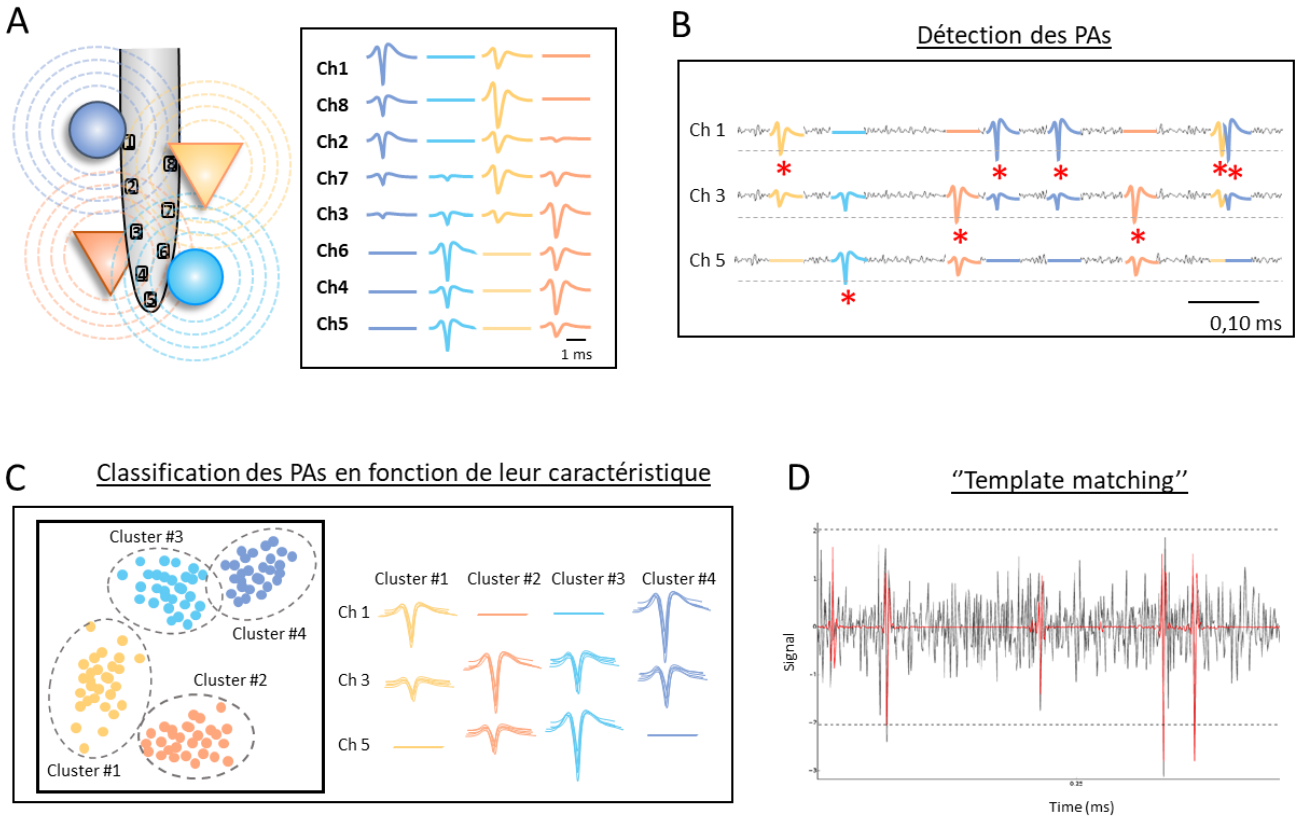


Figure II.10 : Principe du programme de spike sorting "SpyKING CIRCUS"

A. Représentation schématique de l'enregistrement de quatre neurones répartis à des distances différentes des canaux d'enregistrement (ch) d'une électrode de type Buszaki32 (à droite). Représentation de la forme et de l'amplitude des PAs émis par les neurones qui sont détectés par chaque canal d'enregistrement. Notons que plus un neurone est éloigné d'un canal, plus l'amplitude du PA capté est faible. **B.** Détection des PAs dans le signal après filtrage. Les PAs sont détectés dans le signal (étoiles rouges) lorsqu'ils dépassent le seuil (lignes en pointillés). **C**. Classification des PAs en groupes (clusters) à caractéristiques similaires. **D.** Trace brute sur un canal et modèles (correspondant aux formes des PAs moyennées) superposés en rouge. Chaque fois que le seuil de détection (ligne en pointillés) est franchi, le code recherche dans le dictionnaire des modèles si une correspondance peut être trouvée.

Etape 1 : Détection des potentiels d'action

Dans un premier temps, les signaux de tous les canaux sont d'abord filtrés entre 300-5000 Hz (filtre analogue de type Butterworth de troisième ordre). De plus, les artefacts pouvant être présents sur l'ensemble des canaux sont supprimés via un calcul de matrice spatiale réalisé à partir de périodes temporelles sans aucun PA.

Une fois le signal filtré et nettoyé, les PAs sont détectés dans l'enregistrement grâce à un seuil avant d'être séparés en clusters en fonction des caractéristiques de leur forme (**Figure II.10B**).

Etape 2 : Classification des PAs en groupes à caractéristiques similaires

L'étape dite de clustering consiste à séparer chaque PA en fonction de leur forme pour former ce que l'on appelle des clusters de cellules (**Figure II.10C**). Pour cela, ce processus prend en compte la géométrie des électrodes, permettant aux PAs détectés en même temps mais sur des sites d'enregistrement spatialement

séparés (un situé dans l'oriens et l'autre dans la couche pyramidale par exemple) d'être considérés comme des entités différentes.

Pour la plupart des algorithmes de spike sorting, le clustering se fait en réalignant les PAs sur leur pic négatif et en réalisant une analyse en composantes principales (PCA) sur l'ensemble des PAs détectés sur chaque canal. Chaque PA obtient des caractéristiques sommaires constituées des scores de la PCA de leur forme pour les trois principales composantes majeures. SpyKING CIRCUS, quant à lui, adopte une autre stratégie pour faire le clustering, via une procédure d'ajustement (fitting), en utilisant un algorithme basé sur le ''template matching'' pour détecter les PAs. Le signal est reconstruit comme une somme linéaire des modèles (correspondant aux formes des PAs moyennées). Ainsi, à chaque fois que le seuil de détection est franchi, l'algorithme recherche dans le dictionnaire des modèles de PAs si une correspondance peut être trouvée (**Figure II.10D**). Cette approche est entièrement automatisée de sorte à ne pas être biaisée par les densités de pics (density peak) et permet de résoudre le problème des PAs qui se chevauchent comme expliqué précédemment.

A l'issue de toutes ces étapes, on obtient des clusters de cellules qu'il nous reste plus qu'à classer en différentes catégories en fonction de leurs qualités.

Etape 3 : Ajustement manuel de la classification des clusters

Les clusters générés par SpyKING CIRCUS sont vérifiés un à un et ajustés manuellement quand cela est nécessaire. Chaque cluster va ensuite être classifié par moi-même en trois catégories : ''CORRECT'', ''MUA'' ou ''BRUIT'' (les caractéristiques de ces clusters sont similaires à ceux représentés dans la **Figure II.9B**).

Les clusters ''CORRECT'' sont ceux qui ont des PAs détectés sur au moins 2 canaux de l'électrode avec une amplitude supérieure à 20µV. La période réfractaire, phase pendant laquelle le neurone ne peut pas générer un nouveau PA, doit être supérieure à 2ms et le cluster doit contenir plus de 50 PAs au cours d'une session de 10 minutes. Ces clusters sont considérés comme étant de bonne qualité et seront inclus dans les analyses futures visant à décrire l'activité unitaire des neurones. Notons que ces clusters correspondent aux neurones se trouvant à proximité des sites d'enregistrement.

Les clusters ''MUA'' correspondent à ceux présentant des PAs détectés sur au moins 3 sites d'électrodes et d'amplitude supérieure à 20µV mais dont la période réfractaire a été violée (inférieure à 2ms) et/ou avec un nombre de PAs inférieur à 50 pour 10 minutes d'enregistrement. Ces clusters sont le résultat d'une mauvaise classification des PAs par le programme de spike sorting qui a regroupé des PAs émis par différents neurones dans un même cluster et qui, par conséquent, n'ont pas pu être différenciés ou bien qui n'a pas su attribuer certains PAs à des clusters déjà formés. En vue de la mauvaise qualité de ces clusters, ils ne seront pas inclus dans nos analyses portant sur l'activité unitaire mais pourront être utilisés dans les analyses en MUA (où les clusters ''CORRECT'' y sont également inclus).

Les clusters ''BRUIT'', quant à eux, correspondent à un bruit de fond de PAs d'amplitudes inférieures à 20µV provenant des cellules plus lointaines et non différenciées.

Le programme SpyKING CIRCUS nous a donc permis de faire du spike sorting sur des enregistrements réalisés sur des souris néonatales. Cependant, pour les animaux âgés de moins de 7 jours, les clusters utilisés dans les analyses ne représentent que 5 à 10 % de l'ensemble des clusters générés par le programme tandis que pour ceux âgés de plus de 7 jours, ils en représentent 10 à 20 %. Cette faible proportion de neurones est due au fait qu'il est difficile d'obtenir des clusters de bonne qualité et que les neurones déchargent très peu à ces âges précoces. C'est pourquoi nous avons dû enregistrer beaucoup d'animaux pour avoir un nombre suffisant de cellules à chaque âge pour mener nos études.

3) Déterminer si les neurones ont bougé durant l'enregistrement

Un des problèmes les plus récurrents en électrophysiologie extracellulaire est que l'électrode peut bouger au cours de l'enregistrement, ce qui fait que la forme des PAs captés par les canaux d'enregistrement change, rendant compliqué le processus de ''spike sorting''. Il arrive également que des cellules soient perdues ou que de nouvelles apparaissent au cours de l'enregistrement.

Pour pallier à ce problème, j'ai identifié les sessions dans lesquelles il y a des neurones qui ont bougé au cours de l'enregistrement afin de les scinder en deux sessions distinctes. Pour cela, je me suis basée sur deux caractéristiques : l'amplitude des PAs émis par les neurones et leur fréquence de décharge.

Evolution de l'amplitude des PAs au cours de l'enregistrement :

Les PAs émis par un même neurone auront toujours la même amplitude sur le même canal. Si l'électrode bouge, la distance qui sépare les neurones des canaux change et donc l'amplitude enregistrée sera différente entre le début et la fin de la session d'enregistrement. J'ai alors déterminé, pour chaque cluster ''Correct'', l'amplitude moyenne des PAs émis pendant la première et la deuxième partie de l'enregistrement. En parallèle, j'ai réalisé un test-t entre les valeurs des amplitudes des PAs de ces deux parties.

S'il y a une différence significative et que l'amplitude moyenne des PAs diffère de plus de 15 % entre la première et la deuxième partie, je considère que le neurone a changé de position par rapport aux canaux au cours de la session d'enregistrement.

Evolution de la fréquence de décharge des clusters au cours de l'enregistrement :

Sur le même principe que précédemment, si l'électrode bouge, les PAs peuvent ne plus être détectés par les canaux d'enregistrement ou des PAs de nouvelles cellules peuvent apparaître. C'est pourquoi j'ai comparé le nombre de PAs détectés pour un neurone durant la première et la deuxième partie de l'enregistrement.

S'il y a une différence de plus de 30 % du taux de décharge du neurone entre ces deux parties, je considère qu'il a bougé durant la session d'enregistrement.

Je considère qu'un neurone a bougé lorsqu'il y a une différence concernant l'amplitude des PAs ou leur taux de décharge entre la première et la deuxième partie de la session d'enregistrement.

Si plus de 40 % des clusters d'une session ont bougé, celle-ci sera divisée en deux lors de mes analyses et considérée comme deux sessions distinctes.

B- IDENTIFICATION DES NEURONES OPTO-TAGGUES

Après avoir réalisé le processus de ''spike sorting'', il a fallu déterminer quelles cellules étaient des neurones GABAergiques. Pour rappel, seuls les neurones GABAergiques ont la possibilité de décharger suite à une stimulation lumineuse étant donné qu'ils expriment une opsine excitatrice à leur membrane. Pour les identifier parmi l'ensemble des neurones que nous avons enregistrés, nous avons cherché les cellules qui déchargent

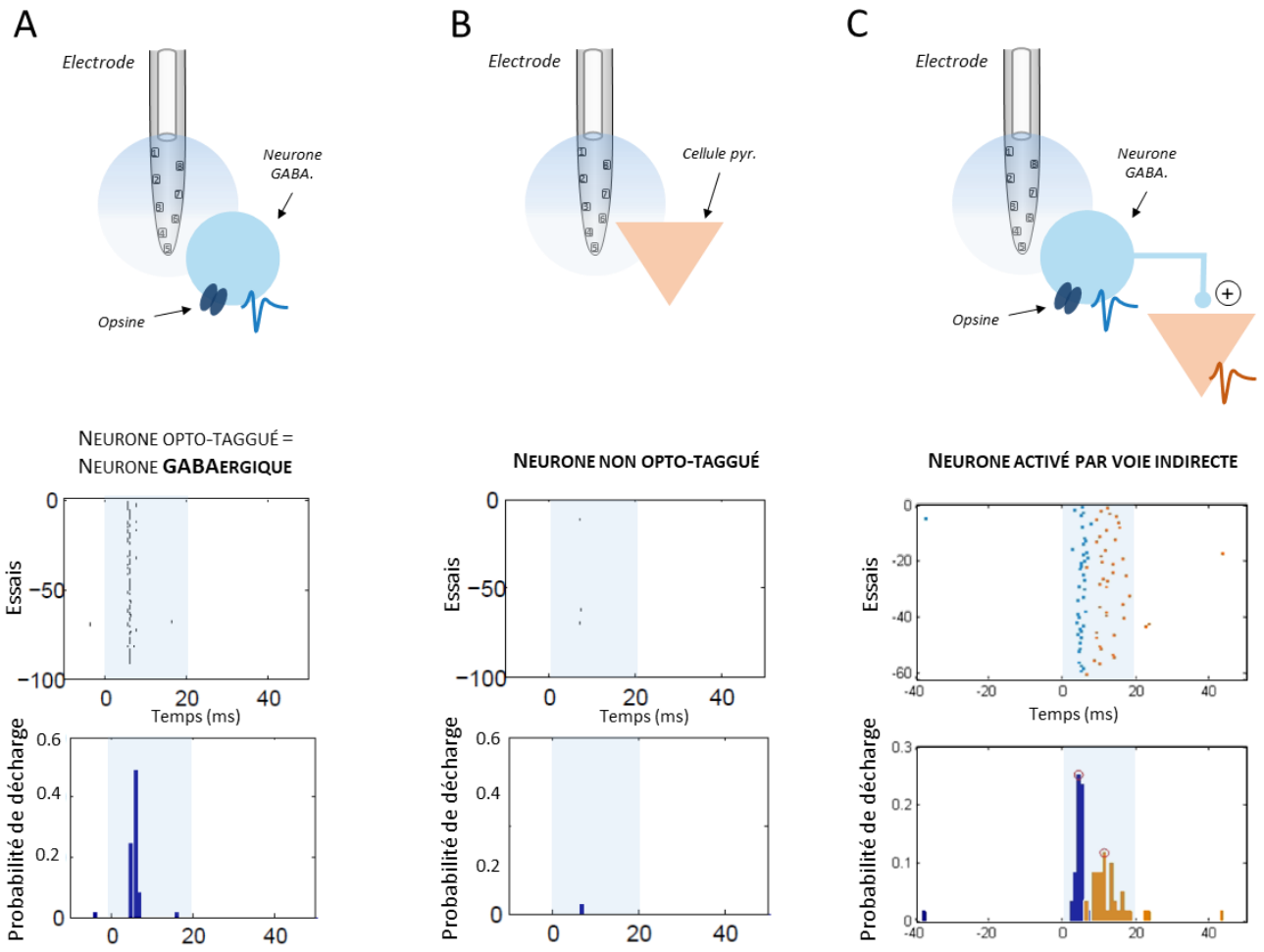


Figure II.11 : Identification des neurones opto-taggués

A. Représentation schématique de la décharge immédiate d'un neurone exprimant l'opsine suite à une stimulation lumineuse (au-dessus). Raster plot et PSTH de ce neurone (en dessous). Notons la présence de PAs à un délai inférieur à 8 ms suite à une stimulation lumineuse (rectangle bleu). **B.** Représentation schématique d'un neurone qui est non modulé par les stimulations lumineuses (au-dessus). Raster plot et PSTH de ce neurone (en dessous). **C.** Représentation schématique de la décharge d'un neurone par voie synaptique (voie indirecte) suite à une stimulation lumineuse (au-dessus). Raster plot et PSTH combiné d'un neurone opto-taggué (en bleu) et d'un neurone activé par voie indirecte (en orange) (en dessous). Notons que le neurone modulé par voie synaptique (indirecte) décharge plus tardivement que le neurone opto-taggué.

systématiquement un PA immédiatement après une stimulation. Ces neurones seront, par conséquent, considérés comme opto-taggués.

Pour chaque neurone, j'ai alors comparé leur taux de décharge pendant les 200ms précédent la stimulation (correspondant à la référence de décharge du neurone) avec celui observé durant la stimulation lumineuse. J'ai ensuite réalisé un t-test pour déterminer s'il existait une différence significative d'activité entre ces deux périodes afin de voir si la stimulation induit la décharge systématique du neurone.

Ainsi, nous avons observé différents types de réponses aux stimulations lumineuses (voir Tableau 3). Les neurones qui déchargent immédiatement (lors du premier tiers de la stimulation) dans plus de 10% des cas et dont le taux de décharge augmente significativement pendant les stimulations sont considérés comme des neurones opto-taggués et donc des neurones GABAergiques (**Figure II.11A**). Cependant, on observe certains neurones qui déchargent plus tardivement au cours des stimulations. Cela suggère qu'ils sont probablement

activés de manière indirecte, c'est-à dire par voie synaptique, en réponse à l'activation directe d'un neurone exprimant l'opsine lors des stimulations (**Figure II.11C**).

Tableau 3 : Les différents types de réponse suite aux stimulations lumineuses

T-test	Pourcentage de stimulation où le neurone décharge	Temps où le neurone décharge après la stimulation	Type de réponse
Significatif	> 10%	< Premier tier	Excitation direct = **Opto-taggué**
Significatif	> 10%	> Premier tier	Excitation indirect
Significatif	< 10%	< Premier tier	Non modulé
Non Significatif	< 10% ou > 10%	< Premier tier ou > Premier tier	

Ainsi, parmi les 1079 neurones enregistrés chez 43 animaux âgés entre P3 et P12 (où l'opto-tagging a fonctionné), nous avons pu identifier 101 neurones comme étant GABAergiques.

Estimation du délai de stimulation :

Il existe un délai entre le moment où l'on déclenche la stimulation et celui où la lumière est libérée à l'extrémité de la fibre optique. Il est important de prendre en compte ce délai pour déterminer si les neurones sont opto-taggués étant donné que le moment où ils déchargent pendant les stimulations constitue un critère essentiel pour leur identification.

A l'aide d'un oscilloscope, j'ai pu mesurer le délai existant. Nous avons constaté que ce délai variait en fonction de la source lumineuse utilisée (laser ou LED, voir tableau) (**Figure II.12A et B**). Avec la LED, le délai est de 2 ms, tandis qu'avec le laser il est plus important (variant entre 6 et 8,5 ms) et dépend également de la valeur du voltage auquel on réalise les stimulations (**Figure II.12C et D**). Cette variation observée avec le laser s'explique par sa capacité à libérer de la lumière uniquement à partir d'un certain seuil de puissance. Ainsi, il n'a pas été possible de réaliser des stimulations de type "SineWave" avec le laser, mais uniquement des stimulations de type ''SquarePulse'' dont la durée dépend du voltage. Plus le voltage est élevé, plus la stimulation est longue et le délai réduit.

Tableau 4 : Mesure du délai de stimulation

Source lumineuse	Durée d'un pulse	Voltage du pulse	1/3 de la durée de la stimulation	Temps entre le TTL et la libération de lumière (Délai)	Période où une cellule opto-tagguée doit décharger (1/3 stim + délai)
Led	10 ms	5 v	~ 3,5 ms	2 ms	< 6 ms
Led	20 ms	5 v	~ 7 ms	2 ms	< 9 ms
Laser	20 ms	0,7 v	~ 7 ms	8, 5 ms	< 15,5 ms
		0,8 v	~ 7 ms	7 ms	< 14 ms
		0,9 v	~ 7 ms	6,5 ms	< 13,5 ms
		1 v	~ 7 ms	6 ms	< 13 ms

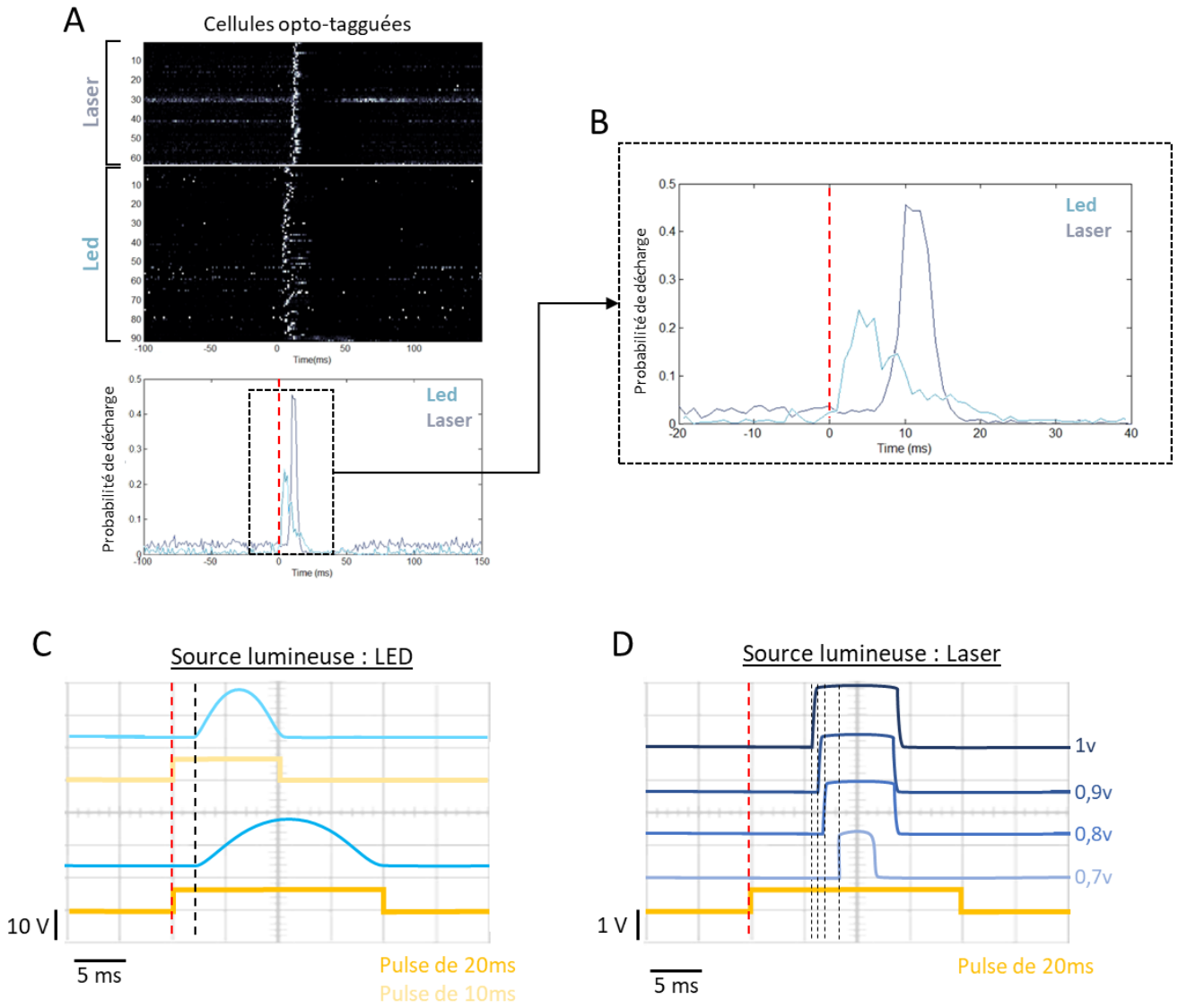


Figure II.12 : Estimation du délai entre TTL et de la libération la lumière par la fibre optique

A. Raster plots et PSTH des neurones opto-taggués suite à des stimulations lumineuses réalisées avec un laser ou une LED. **B.** Vue agrandie de la décharge des neurones après le déclenchement d'une stimulation (ligne en pointillés rouges). Notons que les neurones stimulés avec un laser sont activés plus tardivement que ceux stimulés avec une LED. **C.** Représentation des mesures réalisées avec un oscilloscope pour déterminer le délai existant entre le déclenchement d'un pulse de stimulation (TTL) (ligne en pointillés rouges) et la libération de la lumière par la fibre optique (ligne en pointillés noirs) dans le cas où la source lumineuse est une LED ou un laser (**D**). Notons que, dans le cas de la LED, la durée du pulse n'a pas d'impact sur le délai. Avec le laser, la durée du délai dépend de la valeur du voltage à laquelle on réalise les stimulations. De plus, le laser ne permet pas de faire des pulses en forme d'onde en raison de la relation non linéaire entre la commande de tension du laser et la sortie d'intensité.

C- DETECTION DES ESPWS

Pour étudier l'activité des neurones de la région de CA1 durant les activités spontanées néonatales, il a fallu que je détecte les eSPWs à partir des potentiels de champs locaux (Local Field Potentiels - LFPs). Les analyses des LFPs permettent d'étudier les circuits neuronaux par le biais de l'activité neuronale corrélée. Contrairement aux PAs générés par des neurones individuels, les LFPs représentent principalement l'activité collective et synchrone d'un groupe de neurones à proximité des sites d'enregistrement et sont étroitement liés à l'activité synaptique. Ainsi, durant les deux premières semaines de vie, les activités des réseaux neuronaux néonatals, appelées eSPWs, peuvent être observées à partir des LFPs enregistrés dans la région CA1 de l'hippocampe.

Les eSPWs sont décrites comme étant des activités qui prennent la forme de pointes-ondes suivies d'oscillations béta (10-15Hz) séparées de périodes de silence présentant une inversion au niveau de la couche pyramidale (les LFPs enregistrés lors de ces événements sont positifs en amont du site d'inversion et négatifs en aval) (Valeeva et al. 2019). En me basant sur cette description, j'ai pu déterminer les temps correspondant à des eSPWs à partir du LFP.

Pour rappel, les enregistrements sont réalisés avec deux électrodes (une électrode linéaire et une Buszaki 32 ou Assy-77 P1) chacune placée dans les hippocampes controlatéraux. Il a été montré que les eSPWs sont fortement synchronisées bilatéralement avec un décalage temporel quasi nul entre les deux hippocampes controlatérales (Valeeva et al. 2019). Par conséquent, les eSPWs détectées sur l'une ou l'autre de ces deux électrodes pourront être utilisées pour étudier l'activité neuronale dans un hippocampe en particulier.

J'ai alors, dans un premier temps, détecté les événements qui pouvaient correspondre à d'éventuelle eSPWs à partir des signaux enregistrés simultanément par les deux électrodes. Pour cela, les signaux sont sous-échantillonnés (1 000 Hz) et filtrés (1–100 Hz, Chebyshev Type 2 Filter) à l'aide d'un code MATLAB pour faire ressortir les activités spontanées néonatales. Tous les événements atteignant une valeur supérieure à ~10-15 µV ont d'abord été considérés comme étant d'éventuelles eSPWs (**Figure II.13A**). Tous ces temps sont ensuite vérifiés manuellement un à un pour conserver uniquement ceux correspondant à des eSPWs et supprimer les artefacts de mouvement. Pour cela, le signal est filtré (entre 0,1-3000 Hz) et est visualisé dans une fenêtre de 0,5 sec autour des temps précédemment détectés. Seuls les temps où le LFP présente une inversion (caractéristique des eSPWs) sont conservés et sont ensuite alignés au niveau de la négativité maximale des eSPWs (**Figure II.13B**).

En parallèle, les mouvements myocloniques spontanés des membres et du corps (twitchs) des souriceaux ont été enregistrés par les capteurs piezzo. Pour les détecter en post-acquisition, nous avons procédé de la même façon que pour les eSPWs. Après filtrage du signal (1-100 Hz, filtre de type 2 de Chebyshev), tous les événements dépassant une valeur seuil (entre 1e-06 - 2e-06 µV) sont considérés comme étant d'éventuels twitchs. Ensuite, lors de la vérification manuelle de chacun de ces temps, seuls ceux correspondant à un événement isolé et bref sont gardés. En effet, contrairement aux mouvements volontaires de l'animal qui durent plusieurs secondes, les twitchs correspondent à des sursauts de l'animal de seulement quelques millisecondes. Les temps correspondant aux twitchs sont ensuite alignés au premier temps maximal du signal négatif/positif de l'événement (**Figure II.13C**).

Pour nos études, j'ai choisi d'étudier l'activité neuronale à partir des temps des eSPWs. Il est important de noter que la majorité des eSPWs sont associées à des mouvements myocloniques bien qu'il y en ait certaines qui sont non associées à des twitchs. A partir de P8, la détection des eSPWs est plus complexe en raison de l'apparition des rythmes Thêta et Gamma. Pour garantir que les temps conservés correspondent bien à des eSPWs, j'ai sélectionné uniquement ceux associés à des twitchs.

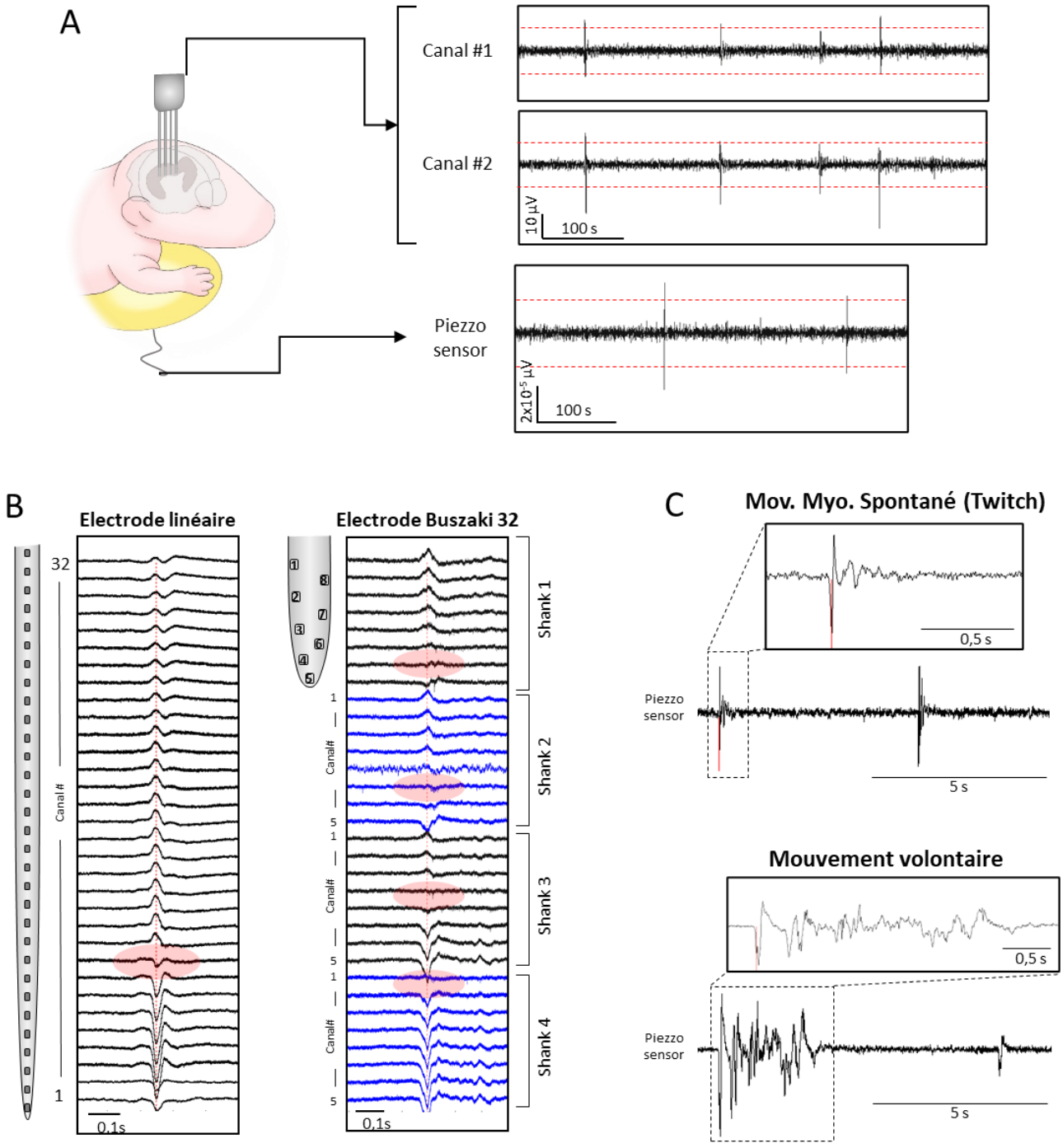


Figure II.13 : Détection des eSPWs et des Twitchs

A. Signaux enregistrés à partir de canaux présents sur une électrode de type Buszaki 32 et d'un piezzo sensor. Les signaux enregistrés par l'électrode sont filtrés entre 1-100 Hz et le seuil est fixé entre 8-20 µV (lignes pointillés rouges) pour détecter les eSPWs. Le signal enregistré par le piezzo sensor est filtré entre 1-50 Hz et un seuil est fixé entre 1e-06 - 2e-06 µV pour détecter les mouvements myocloniques. **B.** Ensemble des signaux enregistrés par les canaux d'une électrode linéaire et des 4 shanks d'une électrode de type Buszaki 32. Le signal est filtré de sorte à pouvoir observer les LFPs au moment d'une eSPW, les canaux où l'on détecte une inversion sont marqués en rouge. Les schémas à gauche des traces montrent les positions des canaux correspondant aux numéros des traces. **C.** Signaux enregistrés par un piezzo sensor lors d'un mouvement myoclonique spontané et lors d'un mouvement volontaire de l'animal. Notons que les twitchs sont des événements isolés durant seulement une centaine de millisecondes.

D- ESTIMATION DE LA LOCALISATION DES NEURONES DANS CA1

Nos enregistrements électrophysiologiques en extracellulaires nous ont permis d'enregistrer l'activité de milliers de neurones dans la région de CA1 de l'hippocampe. Étant donné les différences de connectivité, de période de genèse et de composition cellulaire entre les différentes couches et la partie proximo-distale de CA1, il m'a semblé important de prendre en considération la localisation des cellules enregistrées. En effet, on peut s'attendre à ce que l'activité des neurones lors des eSPWs ne soit pas la même selon leur position dans la région de CA1.

Pour cela, j'ai conçu un protocole combinant des mesures obtenues à partir de données histologiques et l'analyse des LFPs au moment des eSPWs pour estimer la localisation précise de chaque neurone enregistré dans la région CA1.

1) Localisation dans l'axe radial

Pour rappel, les LFPs enregistrés dans la région de CA1 lors des eSPWs présentent un profil caractéristique. Pendant ces événements, on observe une inversion du signal au niveau de la couche pyramidale, ce qui entraîne une amplitude du LFP quasi nulle à cet endroit. J'ai donc utilisé cette particularité pour déterminer la localisation des neurones par rapport à la couche pyramidale, en me basant sur le site d'enregistrement où cette inversion du signal se produit.

a. Identification du site d'inversion à partir du signal

Pour chaque shank de chaque session d'enregistrement, j'ai identifié le canal où l'inversion du signal a été enregistrée et l'ai désigné comme étant le canal de référence. Afin de faciliter la visualisation de cette inversion, les signaux correspondant aux moments des eSPWs enregistrés par les électrodes Buzsaki 32 ou Assy-77 ont été moyennés, permettant ainsi d'obtenir une trace moyenne des LFPs à ces instants précis. Par conséquent, la localisation des cellules dans l'axe radial ne peut se faire que dans les enregistrements où il est possible d'identifier le site où se produit l'inversion du signal (**Figure II.14A**).

Une fois le canal de référence identifié pour chaque shank, la distance qui le sépare des autres canaux est déterminée à partir de la géométrie des électrodes. Par conséquent, en connaissant la localisation des canaux par rapport au site d'inversion du signal, on connait celle des neurones enregistrés sur ces derniers. Cette corrélation est possible car, pour chaque neurone, on sait sur quel canal les PAs qu'il a émis ont été détectés avec la plus grande amplitude ce qui reflète leur proximité. Ainsi, on peut estimer que ce canal et la cellule sont colocalisés au même endroit.

b. Estimation de la localisation du site d'inversion dans l'axe radial de CA1

Pour savoir plus précisément où a lieu l'inversion du signal dans la couche pyramidale durant les eSPWs, j'ai corrélé ce signal à l'activité neuronale.

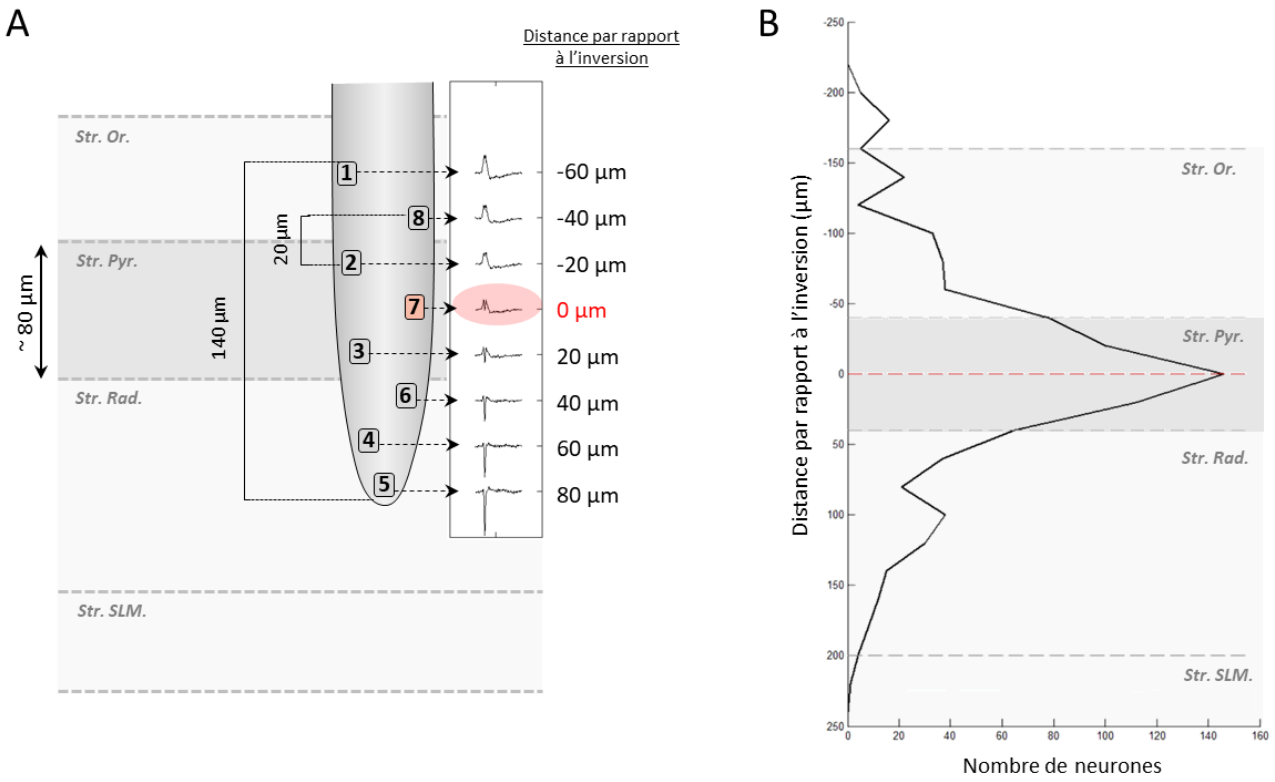


Figure II.14 : Identification du site d'inversion et sa localisation dans les couches de CA1.

A. Signaux enregistrés par une électrode de type Buzsaki 32 dans les différentes couches de la région de CA1. Le canal marqué en rouge est celui où l'inversion du signal a été enregistrée. La distance qui le sépare des autres canaux du site d'enregistrement où a été enregistrée l'inversion est déterminée à partir de l'espace qui sépare les canaux sur l'électrode. **B.** Nombre de neurones enregistrés par les canaux en fonction de la profondeur à laquelle ils se trouvent dans la région de CA1. Les lignes en pointillés rouges représentent le site d'inversion qui se trouve au milieu de la couche pyramidale. Les lignes en pointillés noirs représentent la délimitation entre les différentes couches (établie à partir des mesures faites dans le brain atlas chez une souris à P6). *Str.Or : stratum oriens ; Str.Pyr: stratum pyramidale ; Str.Rad : stratum radiatum ; Str.SLM : stratum lacunosum moleculare*

Des études antérieures montrent que le site où se produit l'inversion se situe dans la couche pyramidale de CA1. Cette couche a pour caractéristique de contenir toutes les cellules pyramidales de l'hippocampe représentant 80% de la population neuronale de CA1. Par conséquent, lorsque les sites d'enregistrement se trouvent dans cette couche, la probabilité qu'ils soient situés à proximité du soma d'un neurone et qu'ils captent les PAs émis par ces cellules est très élevée. Pour chaque session, j'ai donc regardé le nombre de cellules qui ont été enregistrées par les canaux en fonction de leur profondeur.

J'ai alors constaté que les canaux ayant enregistrés le plus de cellules par session sont ceux qui se trouvent à environ 50µm autour du canal de référence où l'inversion du signal avait été détectée, ce qui suggère que l'inversion du signal a lieu au milieu de la couche pyramidale (**Figure II.14B**).

Ainsi, sachant que la couche pyramidale mesure environ 80µm, on estime que les neurones, se trouvant à plus de 40µm sous le site d'inversion, sont dans le stratum radiatum ou le SLM, ceux situés au-dessus sont dans le stratum oriens et ceux localisés entre sont dans la couche pyramidale.

Tableau 5 : Estimation de la localisation des sites d'enregistrement dans CA1 par rapport au site d'inversion durant les eSPWs

Dans l'oriens	Dans la couche pyramidale	Dans le Radiatum ou la SLM
loc<-40 µm	-40 µm< loc <40µm	loc >40 µm

c. Normalisation de la localisation dans l'axe radial

Cependant, pour une même valeur de profondeur déterminée à partir du site d'inversion, deux neurones peuvent se situer dans des couches différentes de CA1 en raison de la variation de taille des couches d'un animal à l'autre. C'est pourquoi il serait préférable de normaliser les profondeurs estimées à partir du site d'inversion avec la taille des couches de CA1 de chaque animal, afin d'assurer l'homogénéité des valeurs de profondeur entre les animaux. Pour cela, j'ai mesuré la taille des couches de CA1 traversées par l'électrode à l'aide du logiciel ImageJ.

Une fois ces mesures effectuées, la profondeur des neurones est normalisée en fonction de la taille des couches. Par exemple, si la couche pyramidale mesure 80 µm et qu'un neurone a été enregistré à 60 µm sous le site d'inversion (localisé au milieu de la couche pyramidale), ce neurone sera estimé comme étant situé dans la couche radiatum. En revanche, si la couche pyramidale avait fait 100µm, si la couche pyramidale mesurait 100 µm, le neurone serait localisé dans le radiatum, mais plus proche de la couche pyramidale que le neurone de l'exemple précédent (**Figure14.A**).

2) Localisation dans l'axe proximo-distal

Pour déterminer la localisation des électrodes dans l'axe proximo-distal, j'ai utilisé le logiciel ImageJ pour réaliser des mesures sur les coupes de CA1 préalablement observées à l'apotome.

Dans un premier temps, j'ai réalisé des lignes de repère qui me permettent de faire les mesures de la même façon d'une coupe de cerveau à l'autre. Un des repères part de l'extrémité du gyrus denté (côté subiculum) et coupe perpendiculairement la couche pyramidale et le deuxième part de l'autre extrémité du gyrus denté (côté CA1) et coupe la région de CA3 au niveau du ''creux'' (**Figure II.15A et B**).

Une fois ces repères établis, j'ai fait une première mesure qui va d'une ligne de repère à une autre en longeant la couche pyramidale (Xall), puis une deuxième qui part du repère en distal et qui va jusqu'à la trace laissée par l'électrode (Xprobe) (**Figure II.15C**).

Le calcul suivant est ensuite réalisé : LocProxDist$= \frac{Xprobe}{Xall}$

En regardant l'anatomie de l'hippocampe aux âges néonataux dans le Brain Atlas, je me suis aperçue que la région de CA1 recouvre les deux tiers de la surface qui se trouve entre mes repères. En me basant sur ces observations, j'ai pu établir dans quelle partie de CA1 étaient implantés les shank des électrodes (**Figure II.15D**).

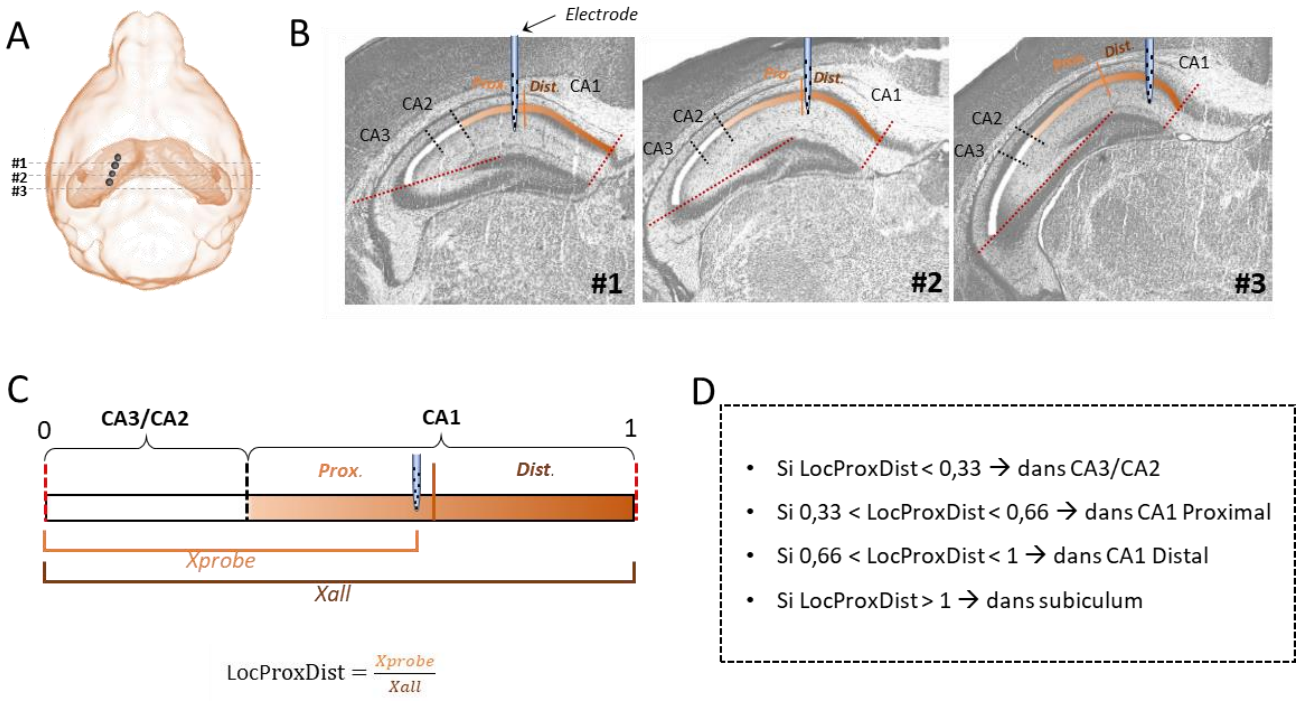


Figure II.15 : Méthode d'estimation de la localisation des neurones en proximo-distal.

A. Représentation de l'implantation des 4 shanks (les points noirs) d'une électrode dans l'hippocampe de souris. **B.** Coupes coronales d'hippocampe à P6. Les différentes régions sont délimitées par des lignes en pointillés noirs et la région de CA1 est en orange (la partie proximale est en orange clair et la partie distale en orange foncé). L'emplacement des différentes sections est représenté en A par les lignes en pointillés. Les lignes en pointillés rouges sont les repères utilisés pour prendre les mesures pour réaliser le calcul décrit en C. Notons que la région de CA1 recouvre les deux tiers de la surface qui se trouve entre les repères. D'après le Brain Atlas. **C.** Calcul réalisé pour déterminer la position de l'électrode en proximo-distal. Xall correspond à la mesure entre les deux lignes de repères et Xprobe correspond à la mesure entre la ligne de repère se trouvant du côté de CA3 et la trace laissée par l'électrode. **D.** Estimation de la localisation de l'électrode dans l'axe proximo-distal selon la valeur de LocProxDist.

III Analyse des données

Après le pré-traitement des données brutes, nous avons cherché à étudier comment les neurones de CA1 déchargent durant les activités spontanées et notamment quel est l'impact des neurones GABAergiques sur les réseaux immatures.

Pour cela, nous avons examiné si le taux de décharge des neurones variait (de manière positive ou négative) pendant les eSPWs ou les stimulations lumineuses, et si cette variation était significative par rapport aux périodes situées en dehors de ces événements. Cependant, à cause de la faible activité des neurones à ces stades précoces, il a été difficile de trouver un test fiable permettant de déterminer la significativité des variations observées. Nous avons donc testé plusieurs méthodes afin de trouver celle qui était la plus adaptée à nos données.

Dans cette partie, je vais expliquer la démarche utilisée pour déterminer si l'activité neuronale est modulée pendant les eSPWs, puis, dans un second temps, lors des stimulations lumineuses. Je décrirai également les différentes méthodes testées pour déterminer si la variation d'activité à ces temps est significative, en mettant en lumière les difficultés rencontrées et les limites de ces tests lorsqu'ils sont appliqués à des enregistrements postnataux.

A- Déterminer si les eSPWs ont un impact sur l'activite neuronale

De nombreuses études rapportent une augmentation de l'activité neuronale de CA1 lors des eSPWs, cependant il existerait une certaine hétérogénéité d'activité (Leinekugel et al. 2002 ; Mohns and Blumberg 2008).

Nous avons alors cherché à voir comment les neurones déchargent durant ces événements et notamment durant les différentes composantes qui constituent les eSPWs. Pour cela, on compare le taux de décharge de chaque neurone durant ces événements avec celui durant le reste du temps.

1) Etude de la variation de la fréquence de décharge des neurones

Lorsqu'on observe l'activité neuronale durant les eSPWs, on constate qu'une grande majorité des neurones augmentent leur fréquence de décharge entre -100ms et 1500ms autour du pic négatif des eSPWs (**Figure II.16A**).

Pour chaque neurone, nous avons déterminé leur taux de décharge durant ce laps de temps (**eSPWRte**) et nous l'avons comparé avec celui durant l'ensemble de l'enregistrement (**SessRte**) (en veillant à exclure les périodes de stimulation lumineuse). Cette valeur est exprimée sous forme d'Index :

$$\textbf{Index} = \frac{\text{ESPWRte} - \text{SessRte}}{\text{SessRte}}$$

Si la valeur de l'index est égale à 0, cela signifie que le taux de décharge durant l'ensemble de l'enregistrement est identique à celui durant les eSPWs. Par conséquent, l'activité du neurone n'est pas modulée par ces événements. Si l'index est plus grand que 0, le taux de décharge du neurone pendant les eSPWs est plus élevé que pendant l'ensemble de l'enregistrement ce qui signifie que pendant les activités spontanées le neurone augmente sa fréquence de décharge. A l'inverse, si l'index est plus petit que 0, le neurone diminue sa fréquence de décharge pendant les eSPWs.

Cependant, lorsqu'on observe l'activité générale durant les eSPWs on s'aperçoit que l'augmentation de la fréquence de décharge des neurones ne se fait pas de façon homogène durant cette période. En effet, on remarque qu'il y a une première augmentation massive de l'activité durant la composante ''Sharp'' (entre -100ms et 100ms autour du pic négatif) suivie par une seconde moins forte durant la composante ''Tail'' (entre -100ms et 1500ms autour du pic négatif) des eSPWs **Figure II.16A'**).

On a alors également calculé l'index dans ces deux composantes en déterminant le taux de décharge des neurones durant ces périodes (**SharpRte** et **TailRte**) que nous avons comparé avec celui durant l'ensemble de l'enregistrement, comme précédemment.

2) Déterminer si les neurones augmentent leur fréquence de décharge de façon significative

Un des principaux enjeux de ce projet a été de trouver une méthode permettant de déterminer si l'augmentation de l'activité neuronale observée pendant les eSPWs est significative. Cependant, durant les deux premières semaines postnatales, les neurones déchargent très peu. Par conséquent, les tests et méthodes statistiques généralement utilisés chez l'adulte, pour savoir si un neurone augmente sa fréquence de décharge de façon significative, ne sont pas adaptés aux âges auxquels nous travaillons.

Nous avons donc testé différentes approches afin de trouver une méthode fiable pour déterminer d'éventuels changements dans l'activité des neurones lors des eSPWs aux stades précoces du développement postnatal.

Méthode 1 : Z-score

Le Z-score est une mesure statistique qui indique combien d'écarts-types une valeur individuelle (x) se situe au-dessus ou en dessous de la moyenne (μ) d'un ensemble de données. Chez l'adulte, le Z-score est couramment utilisé pour voir s'il y a un changement d'activité significatif lors d'un événement/stimuli.

Pour cela, les enregistrements sont tout d'abord divisés en intervalles temporels (ou "bins") pour analyser les tendances. Chaque bin contient les PAs présents dans un intervalle de temps donné et la valeur de fréquence de décharge dans ce laps de temps (x) est déterminée individuellement dans les bins. Ensuite, la moyenne (μ) et l'écart-type (σ) des fréquences de décharge sont calculés pour l'ensemble des bins. La formule du Z-score ($z=(x-\mu)/\sigma$) est appliquée aux valeurs contenues dans chaque bin afin de mesurer à quel point la valeur du taux de décharge contenu dans un bin particulier s'écarte de la moyenne des bins. Les Z-scores obtenus sont normalisés dans chaque bin, ce qui permet de comparer les valeurs indépendamment des différences globales entre bins. Si un neurone augmente significativement son taux de décharge durant les eSPWs, le Z-score sera élevé.

Cependant, les Z-score obtenus avec nos enregistrements étaient très élevés. De nombreux neurones étaient alors considérés comme augmentant leur décharge durant les eSPWs alors que ce n'était pas le cas après vérification manuelle (faux positif). Cela est dû au fait que puisque les neurones déchargent très peu le reste du temps, dès qu'il y a quelques PAs qui sont émis durant cette période le test considère qu'il y a une variation significative de l'activité.

Pour éviter d'avoir de faux positifs, nous avons voulu s'affranchir du ''binning'' des enregistrements qui peut avoir un impact sur la valeur du Z-score en fonction de l'intervalle de temps choisi. C'est pourquoi nous avons testé la méthode suivante.

Méthode 2 : ZETA test (Zenith of Event-based Time-locked Anomalies)

Cette méthode développée en 2021 par Heimel et ses collaborateurs (Heimel et al., 2021) permet de déterminer si un neurone est impacté par une stimulation d'une manière statistiquement robuste. Elle permet également d'éviter d'utiliser un ''binning'' et la détermination de paramètres au préalable qui pourraient avoir un impact sur les résultats. Ce test consiste à déterminer si le train de PAs émis par un neurone pourrait être observé par hasard, c'est-à-dire s'il ne répond pas à un événement particulier induit ou non par l'expérimentateur.

Pour cela, le ZETA est déterminé par l'algorithme selon plusieurs étapes. La première consiste à aligner tous les PAs sur le début du stimulus (comme pour un raster plot). Ensuite, en regroupant tous les PAs sur l'ensemble des essais, l'algorithme obtient un vecteur unique des temps de PAs par rapport au début du stimulus et il calcule la distribution cumulative en fonction du temps. La déviation de cette courbe par rapport à une référence indique si le neurone a une densité de PA plus élevée ou plus faible par rapport à un taux de PA non modulé. Ensuite, l'algorithme compare ce modèle à la probabilité de l'observer par hasard en effectuant de multiples bootstraps en faisant varier les temps d'apparition des stimuli pour générer une distribution d'hypothèse nulle. Après avoir adapté la courbe observée expérimentalement à la variation de la distribution de l'hypothèse nulle, elle est utilisée pour obtenir une valeur p correspondant au ZETA. Plus la valeur p est faible plus il est statistiquement improbable que le pattern de décharge du neurone lors de l'événement en question soit observé ailleurs dans l'enregistrement.

Cependant, beaucoup de faux positifs ont également été observés lors de la vérification manuelle notamment sur les enregistrements réalisés durant la deuxième semaine de vie.

Méthode 3 : T-Test apparié

Un T-test apparié est une méthode statistique utilisée pour comparer les moyennes de deux ensembles de données liées ou corrélées et évaluer si la différence moyenne entre ces deux ensembles de données est significativement différente de zéro. Ici, nous avons utilisé ce test pour comparer le taux de décharge d'un neurone donné avant et pendant chaque eSPWs.

Pour cela, nous avons d'abord déterminé le taux de décharge du neurone entre 3000ms et 500ms avant le début des eSPWs et celui pendant la période de l'eSPW. On a fait ça pour tous les temps correspondant au eSPWs. Ensuite, on a réalisé le T-test apparié entre ces données pour savoir si en moyenne il y a une différence entre la fréquence de décharge avant et pendant les eSPWs.

Si cette différence d'activité entre les deux périodes est considérée comme étant significative par le T-test, la différence moyenne n'est pas égale à zéro (hypothèse alternative). Dans le cas contraire l'hypothèse est considérée comme étant nulle.

Cependant, comme pour les autres tests, beaucoup de faux positifs ont été trouvés à cause de la faible probabilité de décharge des neurones à ces âges. De plus, ce test ne permet pas de savoir si ce pattern d'activité observé pendant la eSPWs peut être observé ailleurs dans l'enregistrement de façon aléatoire sans que ce soit induit par ce phénomène. La méthode suivante permet de voir ça.

Méthode 4 : Shuffle test

Le shuffle test, ou test de mélange, permet de déterminer si l'effet observé lors d'un événement ou d'un stimuli peut être également retrouvé par chance ailleurs dans l'enregistrement.

Pour cela, on calcule pour un neurone le taux de décharge durant les eSPWs et on fait de même avec 100 temps aléatoires dans l'enregistrement. Le taux de décharge du neurone pendant les eSPWs doit être supérieur à 99% de ce qu'on attend par chance pour qu'il soit considéré comme étant significativement actif durant ces périodes.

Cependant, ce test trouve beaucoup de faux positifs à cause de la faible probabilité de décharge des neurones à ces âges. De plus, il ne peut pas être utilisé pour savoir si un événement induit une diminution de décharge car les neurones déchargent trop peu.

Toutes ces méthodes ont permis d'identifier les neurones qui augmentent leur fréquence de décharge de façon significative durant les eSPWs. Cependant, parmi ces neurones se trouvent également de nombreux faux positifs, mais aussi de faux négatifs (**Figure II.16B**). Après avoir réalisé de nombreux contrôles manuels, nous avons constaté que la méthode la plus fiable consistait à combiner les deux tests : le T-test et le shuffle test. Ainsi, pour qu'un neurone soit considéré comme déchargeant de manière significative, il doit être significatif dans les deux tests. On réalise alors ces tests dans les périodes correspondant à la ''Sharp'' et à la ''Tail'' des eSPWs.

3) Déterminer le pattern de décharge des neurones dans la composante Sharp et Tail des eSPWs

En plus de savoir si un neurone augmente sa fréquence de décharge de façon significative, nous avons voulu connaitre leur pattern d'activité durant les composantes Sharp et Tail afin de voir s'il existe une hétérogénéité d'activité durant les eSPWs.

Pour cela, on utilise les résultats des tests réalisés précédemment pour déterminer dans quelle composante le neurone augmente son taux de décharge. Ainsi, si un neurone est significativement actif uniquement durant la composante Sharp et que son taux de décharge durant cette période est supérieur à celui avant cet événement,

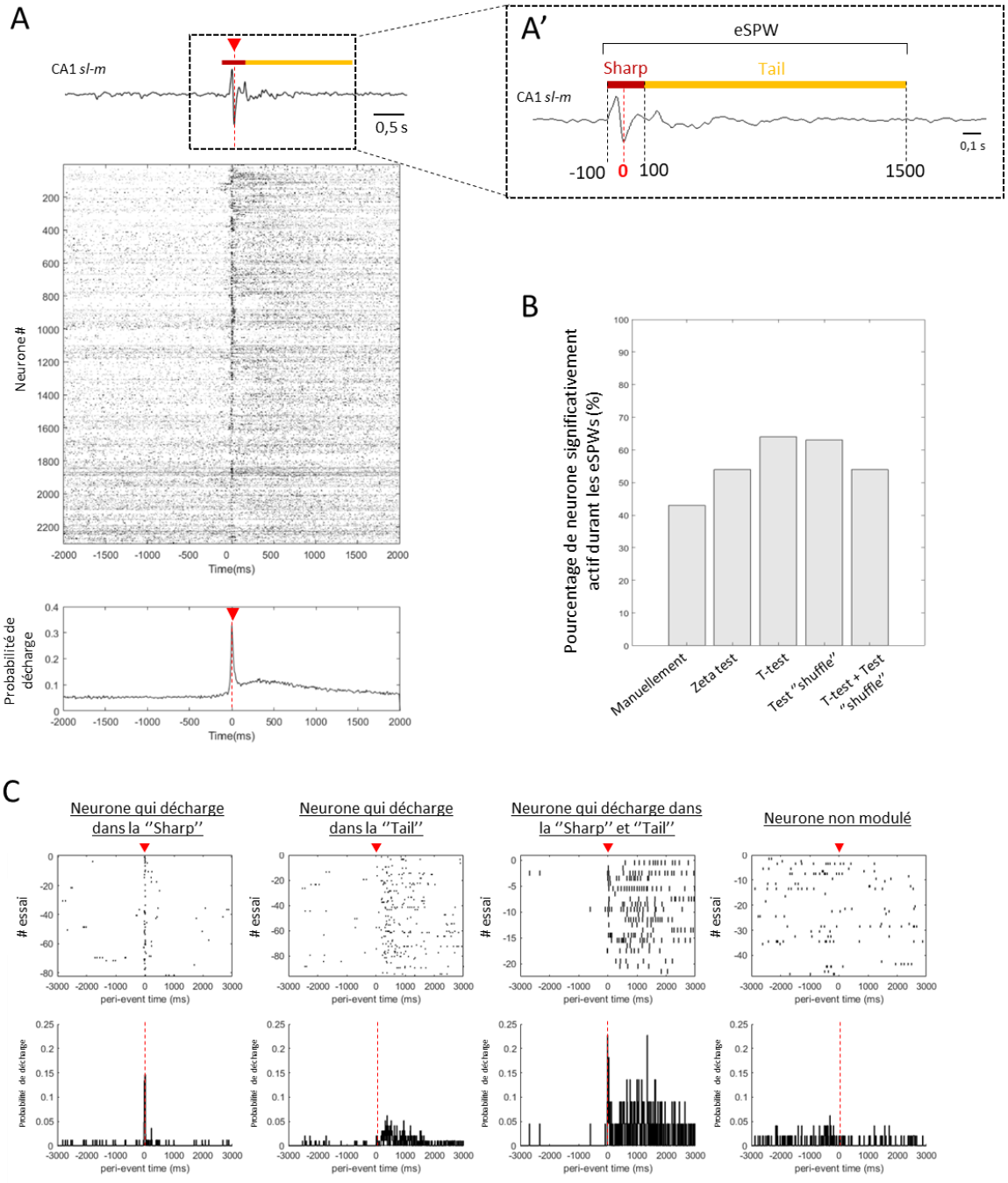


Figure II.16 : Augmentation de la fréquence de décharge des neurones durant les différentes composantes des eSPWs

A. Raster plots et PETH de l'activité des neurones alignés sur les temps des eSPWs. (En haut) signal enregistré lors d'une eSPW (triangle rouge) au niveau de la SLM. (**A'**) Agrandissement du signal lors d'une eSPW où l'on peut voir les différentes composantes qui la constituent. En rouge est représentée la période correspondant à la composante ''Sharp'' (entre -100 ms et 100 ms autour du pic négatif) et en jaune la période correspondant à la composante ''Tail'' (entre 100 ms et 1500 ms après le pic négatif). **B.** Histogramme représentant le pourcentage de neurones déterminés comme étant significativement actifs durant les eSPWs en fonction de différentes méthodes. Un échantillon de 100 neurones a été utilisé pour comparer l'efficacité de ces différentes méthodes. Pour chaque neurone, j'ai d'abord déterminé manuellement si, selon moi, il augmentait leur taux de décharge durant les eSPWs. Ainsi j'ai considéré qu'environ 45% des neurones augmentaient leur activité alors que les différents tests ont tendance à trouver un pourcentage plus élevé de neurones déchargeant de façon significative durant ces temps. **C.** Exemples de Raster plots et de PETH de neurones déchargeant de façon significative dans les différentes composantes des eSPWs et d'un neurone dont l'activité est non modulée.

il sera considéré comme déchargeant exclusivement durant la Sharp. A l'inverse, si un neurone est significativement actif uniquement durant la composante Tail, il sera considéré comme déchargeant exclusivement durant la Tail. Enfin, si un neurone est significativement actif dans la composante Sharp et Tail, il sera considéré comme déchargeant durant les deux composantes des eSPWs (**Figure II.16C**).

De plus, on a voulu déterminer si les neurones pouvaient être inhibés durant les eSPWs. Cependant, déterminer s'il y a une diminution significative de l'activité est compliqué à ces âges à cause de la faible fréquence de décharge des neurones. C'est pourquoi nous avons simplement réalisé un T-test apparié entre le taux de décharge avant les eSPWs et pendant les différentes composantes (comme précédemment) uniquement sur les neurones qui ont un taux de décharge avant les eSPWs supérieur à 0,05 (ce qui correspond à environ 3 PA /min).

A cause du faible taux de décharge des neurones à ces âges, nous avons simplement réalisé un T-test apparié entre le taux de décharge avant les eSPWs et pendant les différentes composantes (comme précédemment). Si le T-Test est significatif et que le taux de décharge avant est supérieur à celui pendant une des deux composantes cela signifie qu'il y a une diminution de l'activité lors de ces composantes.

B- DETERMINER SI LES STIMULATIONS LUMINEUSES ONT UN IMPACT SUR L'ACTIVITE NEURONALE

Pour rappel, les stimulations lumineuses entrainent la décharge des neurones GABAergiques de CA1 (par voie directe) qui par conséquent libèrent du GABA dans le milieu extracellulaire. On a donc voulu voir quel était l'impact du GABA sur les réseaux immatures (effet indirect par voie synaptique des stimulations) (**Figure II.17A et B**).

Pour cela, nous avons procédé de façon similaire à celle de l'étude de l'activité des neurones durant les eSPWs. Ici, nous avons comparé, pour chaque neurone, leur taux de décharge avant chaque impulsion lumineuse (servant de référence) avec celui durant chaque stimulation en réalisant un T-test apparié.

Nous avons choisi de prendre la période se trouvant 200ms avant le début de la stimulation comme référence de fréquence de décharge du neurone. La période correspondant à la stimulation lumineuse est plus longue que la durée réelle des pulses lumineux pour pouvoir observer les éventuels effets de réseaux résultants. Nous avons donc déterminé la fréquence de décharge du neurone à partir du début de la libération de la lumière (en prenant en compte le délai en fonction de la source lumineuse utilisée) jusqu'à 50ms après (**Figure II.17C**). Pour étudier l'effet du GABA sur les neurones opto-taggués et qui par conséquent déchargent directement lors des stimulations, on détermine leur taux de décharge quelques millisecondes plus tard après le début des impulsions lumineuses de sorte à voir l'effet indirect de la stimulation sur eux.

Ainsi, si le T-test est significatif et que le taux de décharge pendant la stimulation est supérieur à celui avant la stimulation, cela signifie que le neurone augmente sa fréquence de décharge durant la stimulation suggérant que le GABA a un effet excitateur sur ce neurone.

A l'inverse, si le T-test est significatif mais que le taux de décharge pendant la stimulation est inférieur à celui avant la stimulation cela signifie que le neurone diminue sa fréquence de décharge durant la stimulation suggérant que le GABA a un effet inhibiteur sur ce neurone.

Si le T-test est non-significatif cela signifie que le neurone est non-modulé durant la stimulation ce qui suggère que le neurone ne reçoit pas d'afférences en provenance de neurones GABAergiques.

Cependant, comme mentionné précédemment, les neurones déchargent très peu à ces âges précoces ce qui rend difficile de déterminer si l'augmentation ou la diminution de leur activité suite aux stimulations lumineuses est significative. C'est pourquoi, nous avons pu déterminer l'effet de ces stimulations uniquement avec les neurones qui ont un taux de décharge supérieur à 0,07 (ce qui correspond à l'émission d'environ 4 PA/min) pour éviter d'inclure de faux positifs dans nos résultats.

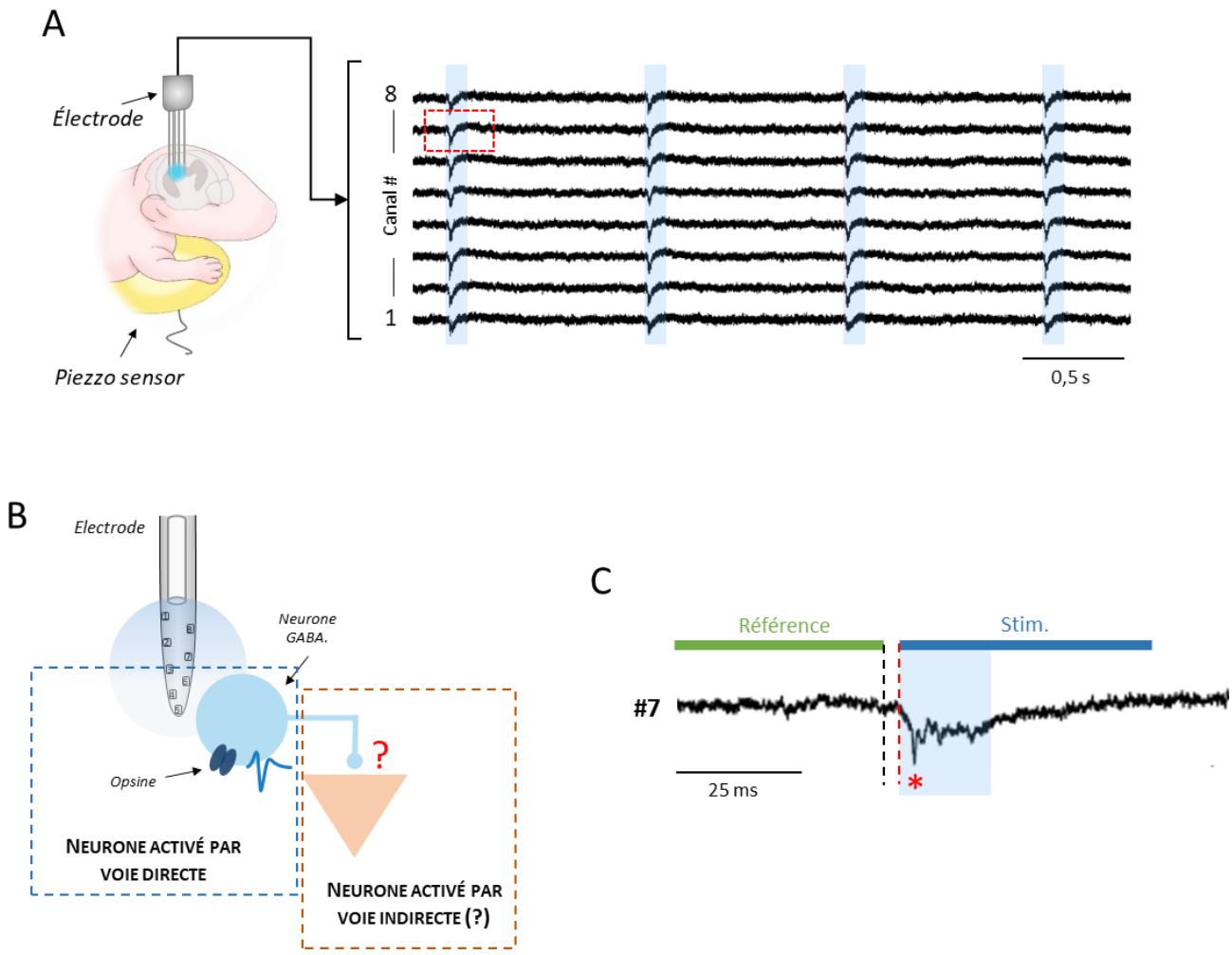


Figure II.17 : Effet de la stimulation lumineuse sur l'activité neuronale de CA1

A. Signaux enregistrés par plusieurs canaux pendant une série de stimulations lumineuses (ligne bleue). Le rectangle rouge délimite la partie du signal qui est montrée en C. **B.** Représentation schématique de l'activation suite à une stimulation lumineuse d'un neurone opto-taggué (par voie directe) qui induit par voie synaptique la décharge d'un autre neurone (voie indirecte). Le neurone GABAergique (en bleu) décharge un PA mais on ne sait pas quel effet il a sur l'activité de la cellule pyramidale (en orange) avec laquelle il établit une connexion synaptique. **C.** Agrandissement du signal enregistré lors d'une impulsion lumineuse (rectangle bleu). En vert est représentée une partie de la période avant la stimulation utilisée pour déterminer le taux de décharge de ''référence'' des neurones que l'on compare avec celui suite aux stimulations représentées en bleu (Stim.). Les pointillés noirs représentent le moment où la stimulation a été déclenchée (TTL) et les pointillés rouges représentent le moment où la lumière est libérée par la fibre optique. L'étoile rouge montre un PA. *Stim. : stimulation.*

Remerciement :

L'ensemble des méthodes et des techniques que j'ai utilisées pour ce projet sont assez récentes et certaines sont peu utilisées. Surtout, elles n'ont jamais été employées dans le cadre de souris nouveau-nées. Une grande partie de mon master, puis de mon doctorat a donc été de mettre au point ces techniques et il a été souvent question d'essais et d'erreurs. Le projet étant pionnier, nous n'avions pas de budget dédié et nous avons dû utiliser les ''moyens du bord'' pour le faire aboutir.

Lors de son recrutement, mon superviseur, Pierre-Pascal Lenck-Santini a cependant obtenu de l'INSERM une aide au démarrage qui lui a permis d'acquérir les systèmes d'enregistrement, ordinateurs et quelques électrodes. Nous avons aussi reçu énormément d'aide technique et matérielle de la part des membres du laboratoire. Tout d'abord Roustem Khazipov et Marat Minlebaev qui nous ont enseigné la technique d'enregistrement chez la souris in-vivo et prêté des électrodes. Rosa Cossart et son équipe (dont je fais partie) ont contribué à l'achat et l'élevage des souris, à leur génotypage, à l'achat des vecteurs viraux, des réactifs et anticorps pour l'imagerie, ont prêté des micromanipulateurs et autres équipements de chirurgie. L'ensemble des personnels des plateformes du laboratoire (imagerie, biologie moléculaire animalerie etc..) ont aussi contribué étroitement à ce projet. Enfin, Sophie Burstlein, ingénieure Century à cette époque, nous a permis de mettre au point les premiers prototypes de stimulation à faible coût.

La mise au point des procédures expérimentales a donc été à elle seule, une aventure hors du commun.

Analyses en cours à ce jour :

Dans cette partie, j'ai décrit les principales analyses que nous avons réalisées pour rédiger le papier qui sera présenté dans la partie suivante.

Cependant, certaines données n'ont pas encore pu être analysées à ce jour, notamment celles obtenues avec le système d'induction de la photostimulation par détection des eSPWs. Ces données nous auraient permis d'étudier l'effet de l'activation des neurones GABAergiques lors des activités néonatales spontanées, où un grand nombre de neurones déchargent durant cette période. Ainsi, ces résultats auraient permis de mieux observer si le GABA a un effet inhibiteur dans les réseaux immatures de CA1.

Ces analyses seront réalisées dans les prochaines semaines suivant l'écriture de ce mémoire.

PARTIE III

RÉSULTATS

''Dans la vie, rien n'est à craindre, tout est à comprendre.''

Marie Curie

ARTICLE: GABAERGIC NEURONS ARE MAJOR CONTRIBUTORS OF NETWORK INHIBITION IN THE NEONATAL HIPPOCAMPUS IN-VIVO

Salomé Mortet, Rachel Carayon, Sophie Brustlein, Agnès Baude, Rosa Cossart, Pierre-Pascal Lenck-Santini*

(En préparation)

PREAMBULE

Les réseaux neuronaux immatures sont caractérisés par des activités spontanées néonatales (ASN) qui synchronisent une large population de neurones indépendamment des stimuli environnementaux. Il est postulé que ces ASNs jouent un rôle important dans la mise en place des réseaux neuronaux et leurs fonctions ultérieures, mais les mécanismes sous-jacents sont encore mal connus.

In vitro, l'hippocampe immature génère ses propres ASNs, appelés potentiels dépolarisants géants (GDPs), impliquant l'activation collective d'un grand nombre de neurones pyramidaux et de neurones GABAergiques (Ben-Ari et al., 1989 ; Bonifazi et al., 2009; Khazipov et al., 1997). Il a été montré que certains types d'interneurones GABAergiques jouent un rôle important dans la synchronisation du réseau lors de ces ASNs in-vitro. In vivo, ces ASNs se produisent spontanément dans les systèmes sensorimoteurs périphériques et se propagent dans le cortex et l'hippocampe (Karlsson et al., 2006; Leinekugel et al., 2002; Mohns & Blumberg, 2008; Valeeva et al., 2019). Cependant, si le rôle des neurones GABAergiques dans la synchronisation néonatale est clairement établi in-vitro, leur contribution à l'activité immature in vivo reste encore mal connue. En parallèle, de nombreuses études ont montré que l'effet dépolarisant de l'activité GABAergique à ces stades immatures joue un rôle majeur dans la construction et la maturation des réseaux (Cancedda et al., 2007; De Marco García et al., 2011, 2015; Griguoli et Cherubini, 2017; Manent et Represa, 2007). Compte tenu de ce rôle fondamental, il n'est pas surprenant qu'une transmission GABAergique défectueuse soit impliquée dans un large éventail de troubles neuronaux tels que l'épilepsie (Nomura, 2021; Rubenstein & Merzenich, 2003; Tempio et al., 2023; Yu et al., 2006). Cependant, l'effet dépolarisant du GABA à ces stades immatures est un sujet très controversé, notamment dans des conditions in vivo (Khalilov et al., 1999 ; Kirmse et al., 2015 ; Murata et Colonnese, 2020 ; Valeeva et al., 2016). Par conséquent, l'impact de ces neurones sur l'activité des réseaux durant les deux premières semaines de vie est encore mal compris. Il est donc nécessaire de mieux comprendre les dynamiques précises des neurones GABAergiques pendant les ASNs et leur impact sur l'activité en cours lors de ces événements.

Notre objectif a donc été de caractériser l'implication des neurones GABAergiques lors des eSPWs in-vivo et de déterminer dans quelle mesure leur activité influence les réseaux hippocampiques immatures. Pour ce faire, nous avons mis en place un protocole d'enregistrement combinant électrophysiologie extracellulaire et optogénétique chez des souris néonatales transgéniques. Ceci nous a permis d'identifier (opto-tagging) et de manipuler l'activité des neurones GABAergiques tout en enregistrant la réponse de la population de CA1 aux eSPWs. Nos résultats montrent que, durant la première semaine de vie postnatale, la majorité des neurones déchargent fortement durant les eSPWs et restent silencieuses le reste du temps. De plus, il existe une hétérogénéité de réponses durant les différentes phases des eSPWs. Parmi les différents patrons d'activité nous avons observé la présence de neurones inhibés, et ce dès les premiers jours de vie (jour postnatal *P*3). La technique d'opto-tagging nous a permis de déterminer que les neurones GABAergiques déchargent à plus haute fréquence, participent à plus d'eSPWs et déchargent plus tôt par rapport aux eSPWs que le reste de la population. Enfin, pendant la première semaine postnatale, la stimulation optogénétique des neurones GABAergiques induit l'inhibition d'environ 20% de la population. Cette proportion augmente drastiquement au début de la deuxième semaine de vie, période pendant laquelle l'effet excitateur des eSPW diminue.

Nos résultats mettent en évidence un effet global inhibiteur de l'activité GABAergique dans l'hippocampe néonatal in-vivo, ce qui était controversé jusqu'ici. Ils confirment aussi la présence de connexions synaptiques GABAergiques fonctionnelles dès les premiers jours de vie. L'augmentation rapide de cette inhibition au début de la deuxième semaine postnatale refléterait l'état de maturation de la connectivité du réseau ainsi que celle des propriétés intrinsèques des neurones qui le composent. Elle permettrait au réseau hippocampique de

passer d'une activité discontinue imposée par la périphérie à un fonctionnement asynchrone propice à l'émergence d'activités auto-générées nécessaires aux fonctions cognitives supérieures.

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2025.04.26.650764; this version posted April 27, 2025. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

GABAergic neurons are major contributors of network inhibition in the neonatal hippocampus in-vivo

Salomé Mortet[1], Rachel Carayon[1], Sophie Brustlein[1], Agnès Baude[1], Rosa Cossart[1], Pierre-Pascal Lenck-Santini[1]*

Aix-Marseille Université, Institut de Neurobiologie de la Méditerranée, INSERM UMR1249

Turing Centre for Living systems, Marseille, France

163 Avenue de Luminy, Marseille Cedex 09

*Corresponding Author : Pierre-Pascal.Lenck-Santini@inserm.fr

Abstract

During development, neural network maturation is activity dependent. During the neonatal period, activity is provided by intermittent, spontaneous network activity patterns (SNAP) that occur independently of environment stimuli. Among the neurotransmitters that take part in neonatal development, the Gamma-amino-butyric acid (GABA) plays a pivotal role. GABAergic cells are the first to emerge the first to form functional synapses. GABA antagonists block hippocampal SNAPs in-vitro and alterations of GABAergic function dramatically impact cortical maturation. Based on these data, the traditional view is that the depolarizing action of GABA, a hallmark of immature networks in slice preparations, is at the core of developmental processes. However, in-vivo evidence for such depolarizing role is not clear, raising questions about the contribution of GABAergic neurons in-vivo. To address this issue we developed an in-vivo approach combining optogenetics and single-unit electrophysiology in non-anesthetized mice. This allowed us to both identify and manipulate hippocampal GABAergic cells while examining their influence on hippocampal SNAP. We found that, even during the first post-natal days, the net action of GABA is inhibitory, but not excitatory. This inhibitory action of GABA drastically increases after the second post-natal week.

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2025.04.26.650764; this version posted April 27, 2025. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

Introduction.

The construction of brain networks during early development relies heavily on neuronal activity (Cancedda et al., 2007; Penn et al., 1998; Spitzer, 2006; Wang et al., 2007; Wong Fong Sang et al., 2021). In the neonatal brain, such activity is provided by recurrent, correlated bursts of neuronal firing that emerge independently environmental stimuli and propagate to the cortical areas (Ackman et al., 2012; Babola et al., 2018; Hanganu et al., 2006; Inácio et al., 2016; Karlsson et al., 2006; Leinekugel et al., 2002; Marguet et al., 2015a; Mohns & Blumberg, 2010; Valeeva et al., 2019), where they drive the maturation of targeted networks (Blankenship & Feller, 2010; Cancedda et al., 2007; Hanganu-Opatz, 2010; Katz & Shatz, 1996; Khazipov & Luhmann, 2006; Leprince et al., 2023; Penn et al., 1998; Wang et al., 2007; Wong Fong Sang et al., 2021). Among the neurotransmitters involved in these processes, the gamma aminobutyric acid (GABA) is considered as a key player. Indeed, cortical GABAergic neurons are born and migrate earlier than their glutamatergic counterpart (Dupuy & Houser, 1996; Schlessinger et al., 1978; Tricoire et al., 2011) and GABAergic synapses are the first ones to emerge (Khazipov et al., 2001; Tyzio et al., 1999). Furthermore, alterations of GABAergic function during development affect major aspects of corticogenesis, including cell migration, apoptosis or synapse formation (Bragg-Gonzalo et al., 2024; Cancedda et al., 2007; De Marco García et al., 2011, 2015; Duan et al., 2020; Griguoli & Cherubini, 2017; Manent & Represa, 2007; Mennerick & Zorumski, 2000), they are event considered at the origin of neuro-developmental disorders such as autism spectrum disorders or early epileptic syndromes (Nomura, 2021; Rubenstein & Merzenich, 2003; Tempio et al., 2023; Yu et al., 2006).

Perhaps the most striking argument supporting the role of GABA during development is its direct influence on correlated bursts of activity in neonates. In slices, the immature hippocampus generates its own recurrent bursts, referred to as *giant depolarizing potentials* (Ben-Ari et al., 1989) that involve the collective activation of large numbers of pyramidal neurons (PN) and interneurons (Bonifazi et al., 2009; Khazipov et al., 1997). Importantly, blockers or agonists of $GABA_A$ receptors block or promote GDPs, retrospectively (Ben-Ari et al., 1989; Cherubini et al., 1990, 1991; Khalilov et al., 1999; Khazipov et al., 1997) and stimulation of specific GABAergic interneuron subtypes alters GDP frequency (Bocchio et al., 2024; Flossmann et al., 2019; Khalilov et al., 1999; Khazipov et al., 1997; Wester & McBain, 2016). Explaining this facilitating effect on GDPs, an influential theory proposes that, contrarily to adults where GABA is inhibitory, activation of $GABA_A$ receptors in neonates induces a depolarization of the neurons. This excitatory action of GABA would originate from the elevated intracellular chloride concentration ($[Cl]_i$) observed in neonates, causing an outflow, instead of an entry of chloride ions to the cell (Cherubini et al., 1991; Sato et al., 2017; Sipilä et al., 2005). With age, the progressive

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2025.04.26.650764; this version posted April 27, 2025. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

increase of extruding chloride transporters (KCC2) would reduce $[Cl]_i$, causing a switch of GABA from excitatory to inhibitory.

In-vivo, evidence for the excitatory action of neonatal GABA is not clear. In the immature neocortex, as early as P3, studies showed that although it may be depolarizing, GABA release is not sufficient to excite glutamatergic cells. (Kirmse et al., 2015; Murata & Colonnese, 2020). In the hippocampus, conflicting results are observed. Whole cell recordings of pyramidal cells reveal that the activation of immature GABAergic neurons does not increase but rather inhibit excitatory post-synaptic currents (Valeeva et al., 2016). In contrast, chemogenetic excitation or inhibition of P3 hippocampal GABAergic cells respectively increase or decrease multi-unit activity in-vivo (Murata & Colonnese, 2020). These results being in apparent contradiction, it is still not clear how GABAergic cells influence the activity of immature networks in-vivo.

The immature hippocampus in-vivo is characterized by recurrent patterns of activity called early sharp waves (eSPWs) that reverse in the border of the pyramidal cell layer. Contrarily to GDPs that are generated locally, eSPWs have an external origin: they are triggered by myoclonic movements that activate somatosensory and entorhinal cortices and propagate to the hippocampus (Dard et al., 2022; Graf et al., 2021; Karlsson et al., 2006; Khazipov et al., 2004; Marguet et al., 2015a; Mohns & Blumberg, 2008; Sokoloff et al., 2021; Valeeva et al., 2019). While there is evidence for GABAergic activity during eSPWs (Dard et al., 2022; Leinekugel et al., 2002) the precise timing of this activity is not known.

To better understand how GABAergic neurons contribute to eSPWs and influence hippocampal networks in-vivo, we recorded single unit activity in unanesthetized neonatal mice during the first two post-natal weeks. Adapting the photostimulation-assisted identification of neuronal population (PINP) method(Lima et al., 2009) to neonatal mice, we were able to identify and manipulate the activity of GABAergic neurons. In general, GABAergic neurons were more active than the rest of the recorded population and participated to more eSPWs. We found evidence of both spontaneous and GABA-driven inhibition as early as P3. This inhibitory effect increased rapidly at the beginning of the 2nd post-natal week to reach a plateau at P9-P10. Altogether, our results suggest GABA is principally inhibitory the neonatal hippocampus in-vivo and that this inhibition is not mature until the 2nd post-natal week.

Results

Local field potentials (LFPS) were recorded bilaterally from the dorsal CA1 region of the hippocampus in P3 to P12 head restrained mouse pups (Figure 1A). As reported previously (Karlsson & Blumberg, 2003; Leinekugel et al., 2002; Marguet et al., 2015b; Valeeva et al., 2019), active sleep in neonates was characterized by an isoelectric hippocampal LFP interrupted by eSPWs,

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2025.04.26.650764; this version posted April 27, 2025. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

occurring at a rate of 2.97 ± 0.16 events/min (Figure 1B, C). ESPWs were often followed by a 0.5-2s period of delta (2-4Hz)-beta (10-20Hz) oscillations coupled with increased action potential activity (the 'tail' period Figure 1C).

Single unit activity in CA1.

Using template matching spike sorting algorithms (Yger et al., 2018), we isolated the firing activity of 2380 neurons in a total of 293 sessions recorded from 98 pups. Each pup was recorded on a single day. Pooling recordings from P3 to P12, we first investigated the properties of action potential (AP) waveforms (Supplementary Figure 1), extracted from LFP recordings (100-5000Hz). Waveform duration, measured at 25% of the maximum spike amplitude, was large, with an average of 675.0±3.0 µs. By comparison, pyramidal cells recorded in 6 supplementary juvenile, P27-P30 mice, under the same conditions (N=396 cells) reached a significantly shorted duration (553.9±6.9 µs; t=17.47, $p=3.95*10^{-65}$). Also, the firing rate of neonatal hippocampal neurons was extremely low (mean: 0.50±0.016 AP/sec) with prolonged periods of silence interrupted by eSPWs. In comparison, P27-30 mice fired at significantly higher rates (mean=2.32±0.19 AP/sec; t=-22.62, $p=1.15x10^{-104}$). In contrast with adult neurons and data from our P27-30 mice, it was not possible to identify GABAergic neurons on the sole basis of spiking properties. Indeed, scatter plots displaying spike width, firing rate and pre/post AP hyperpolarization did not reveal any identifiable cluster. In contrast, such cluster was identifiable in juveniles (Supplementary Figure 1D and E). In the following section, we will therefore consider all units as part of a single group.

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2025.04.26.650764; this version posted April 27, 2025. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

Influence of eSPWs on single unit activity

To better quantify the influence of eSPWs on single unit firing, we performed rasters and peri-event time histograms (PETHs Supplementary Figure 2) for each cell, considering the time of the eSPW trough as the reference event. Data from P3 to P12 animals were pooled. Confirming previous reports in rats (Mohns & Blumberg, 2010; Valeeva et al., 2019), we observed that a large proportion of mouse CA1 neurons increased their firing rate at the time of eSPWs. The type of response displayed by the neurons was heterogeneous: some fired specifically at the trough of the eSPW some at the tail and other during both times. While most of these neurons did not fire in every sharp (Supplementary figure 2), the response pattern they exhibited when they were active was always the same. To better visualize single unit activity at the population level, we grouped the PETHs of all recorded cells on Figure 1D. It can be

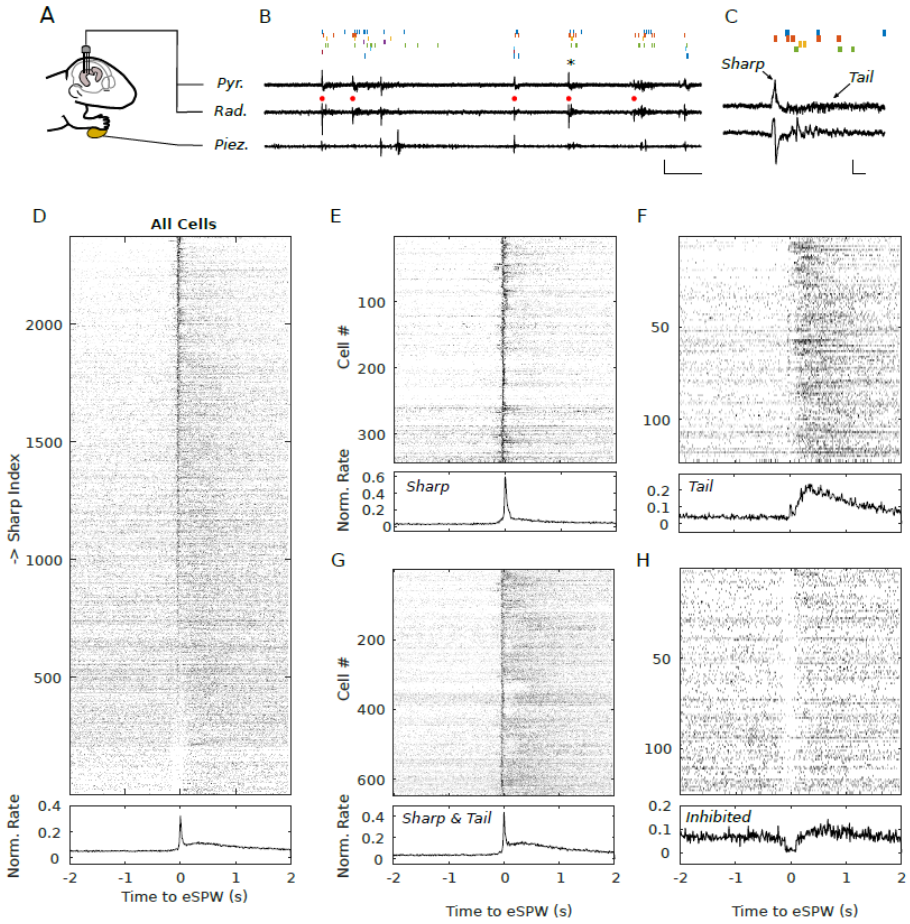


Figure 1. Electrophysiological recordings in head-fixed, non-anesthetized neonatal mice. A) Illustration of the recording principle. B) Example of LFP traces recorded in the pyramidal cell layer (Pyr.) and *stratum radiatum* (Rad), together with the movement outputs from one piezo-element glued to a forepaw. Vertical bars of different colors indicate the occurrence of APs from different cells, isolated from the spike sorting process. Red dots indicate eSPWs (calibration bars: vertical: 200 µV; horizontal: 5s). C) Close-up view of the traces at the time surrounding the eSPW indicated by an asterisk (calibration bars: vertical: 100 µV; horizontal: 200ms). D) Top: Cell response to eSPW from the entire dataset. Each line represents the PETH of an individual cell, normalized by the peak firing rate in the PETH and expressed as a linear grayscale (white=no firing, black=maximum firing). Cells are sorted by decreasing SI. Bottom: average for all cells. E-H) Similar representation selecting cells from four classes of responses.

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2025.04.26.650764; this version posted April 27, 2025. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

noted that there is a global, sharp increase of firing at the time of the eSPWs, with a peak in the 0ms bin of the averaged PSTH. The distribution of peak firing times is at its maximum in the 0ms bin (Supplementary Figure 3, median at 31.5ms) and the mean Sharp Index (SI, see methods) significantly differs from 1 (m=3.83, t-test on log-transformed data, excluding 199 cells with SI=0; t_{2181}=39.89; p<0.0001; Supplementary Figure 3), meaning that neurons fire more during the *sharp* period than during the rest of the session.

We then estimated whether cells systematically fired during the sharp (from 0.1 s before to 0.1 after the eSPW) and/or during the tail (0.2 to 1.5 s after the trough -paired t-tests p<0.05) components of eSPWs. This allowed us to identify several classes of neurons (Figure 1E-H): Neurons that were not systematically modulated by eSPWs (n=1267, 53.4% Supplementary Figure 4), neurons that significantly increased their firing rate during the sharp period (14.5%, n=343; Figure 1E); during tails (5.2%, n=123; Figure 1F), during both sharp and tails (27.1%, n=643; Figure 1G). Note that, even for cells that did not reach significance, a positive modulation can also be observed in the 0-10 ms time bin. Importantly, we observed a fifth class of cells that systematically decreased their firing rate during the sharp component (5.3%, n=125; paired t-test, p<0.05; Figure 1 H)**.** This class was not exclusive since some of those cells also belonged to the *tail* class: they were inhibited during the sharp but increased their firing during the tail component. The presence of inhibition during eSPWs is also quantifiable with the SI (Supplementary Figure 3), where values below 1 correspond to a decreased activity (n=616), and values at zero correspond to no firing at all (excess numbers in the zero-bin, n=199). These cells are also visible at the bottom of Figure 1D**,** where they form a white, vertical band surrounding the eSPW. It is therefore likely that these neurons were inhibited during eSPWs.

Effect of age on eSPW single unit response.

We then examined whether the cell properties evolved with age. As pups grew older, the impact of eSPWs on neuronal firing decreased (Figure 2). In parallel, the session firing rate increased significantly with age (Age vs. log(Session-Rate) correlation coefficient: r=0.480, p=1.04*10^{-137}, confirmed by Generalized linear mixed-effects models -GLMM- including animal ID as a variable Supplementary data; Figure 2B) and SI, which also depends on total firing rate decreased with age (Age vs. Log(SI); excluding inhibited cells; r=-0.463, p=1.21*10^{-115}, also confirmed by GLMMs; Figure 2 C). As can be observed in Figure 3 A, this is likely caused by both an increase of the background activity and a decrease in eSPWs firing with age. By P9, the ESPW-associated PETH barely reached values above baseline fluctuations. This phenomenon is also illustrated (Figure 2D) by a progressive decrease of the proportion of cells that were significantly activated during eSPWs (determined using paired t-tests). Importantly,

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2025.04.26.650764; this version posted April 27, 2025. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

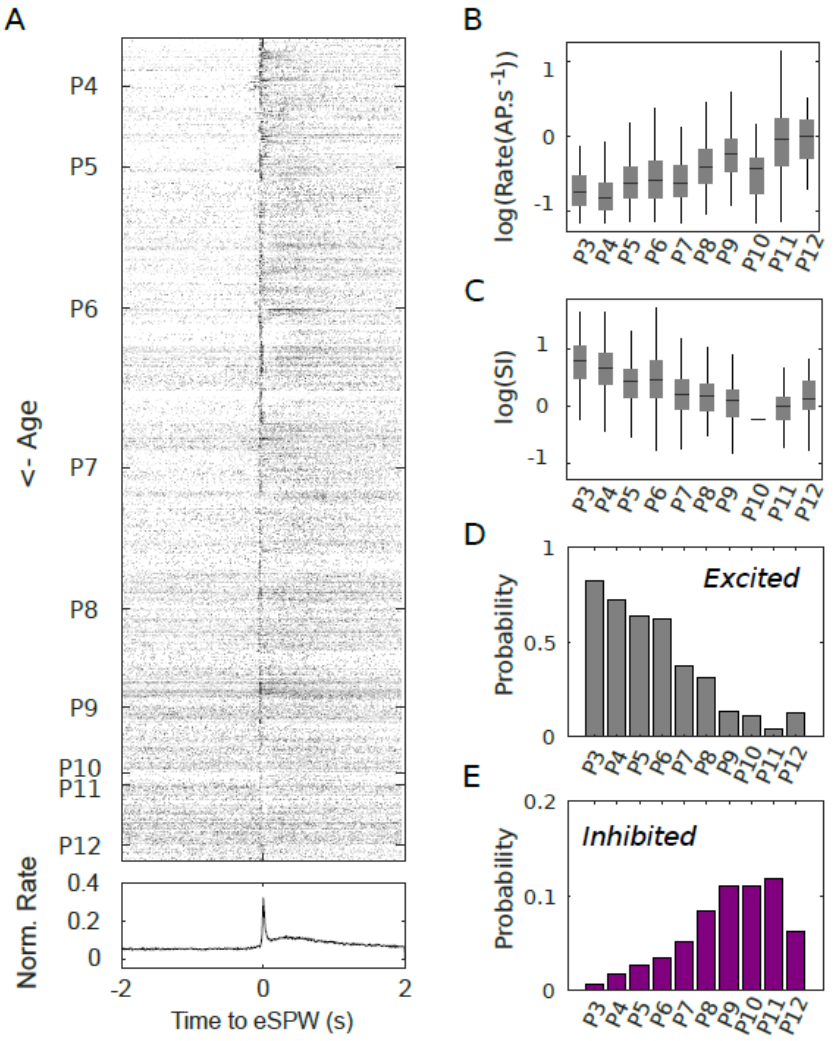


Figure 2. Evolution of firing properties as a function of age. A) PETHS for the whole dataset with cells sorted by increasing age. B-C) Box plots of log-transformed of firing rates and SI as a function of age. Horizontal bars: median, lower and higher extremities: 25th and 75th percentiles, vertical bars: limit for outliers. D-E) Evolution of the proportion of cells that are excited or inhibited during eSPWs, respectively.

the proportion of neurons inhibited during eSPWs increased with age (Figure 2E). Altogether, these data suggest that inhibition is present during the first post-natal week and that it increases with age. The apparent antagonistic age-related behavior between eSPW excitation and inhibition suggests that it is the emergence of GABAergic inhibition that causes the decrease of eSPW-associated firing.

Optogenetic identification and manipulation of immature GABAergic cells.

Since it is not possible to dissociate pyramidal cell from interneuron AP waveforms, we therefore adapted an optogenetic method developed for adults (Lima et al., 2009) that could both help detect and manipulate GABAergic cells. Briefly, adeno-associated viral vectors (AAVs) containing sequences (*pAAV-CAG-DIO-ChroME-ST-P2A-H2B-mRuby3*) expressing the opsin ChroME were injected intraventricularly in Gad::Cre expressing pups. To allow sufficient

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2025.04.26.650764; this version posted April 27, 2025. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

protein expression before recordings, injections were performed in 51 pups, either in-utero (at Embryonic stage E15), for P2 to P5 recordings or at P0 for recordings that started at P6. At the end of recordings, we injected a series of short (20 ms), blue light (270 nm) pulses with either a LED or a laser (for higher power stimulations, see methods), via a fiber that was attached to the electrode array shanks.

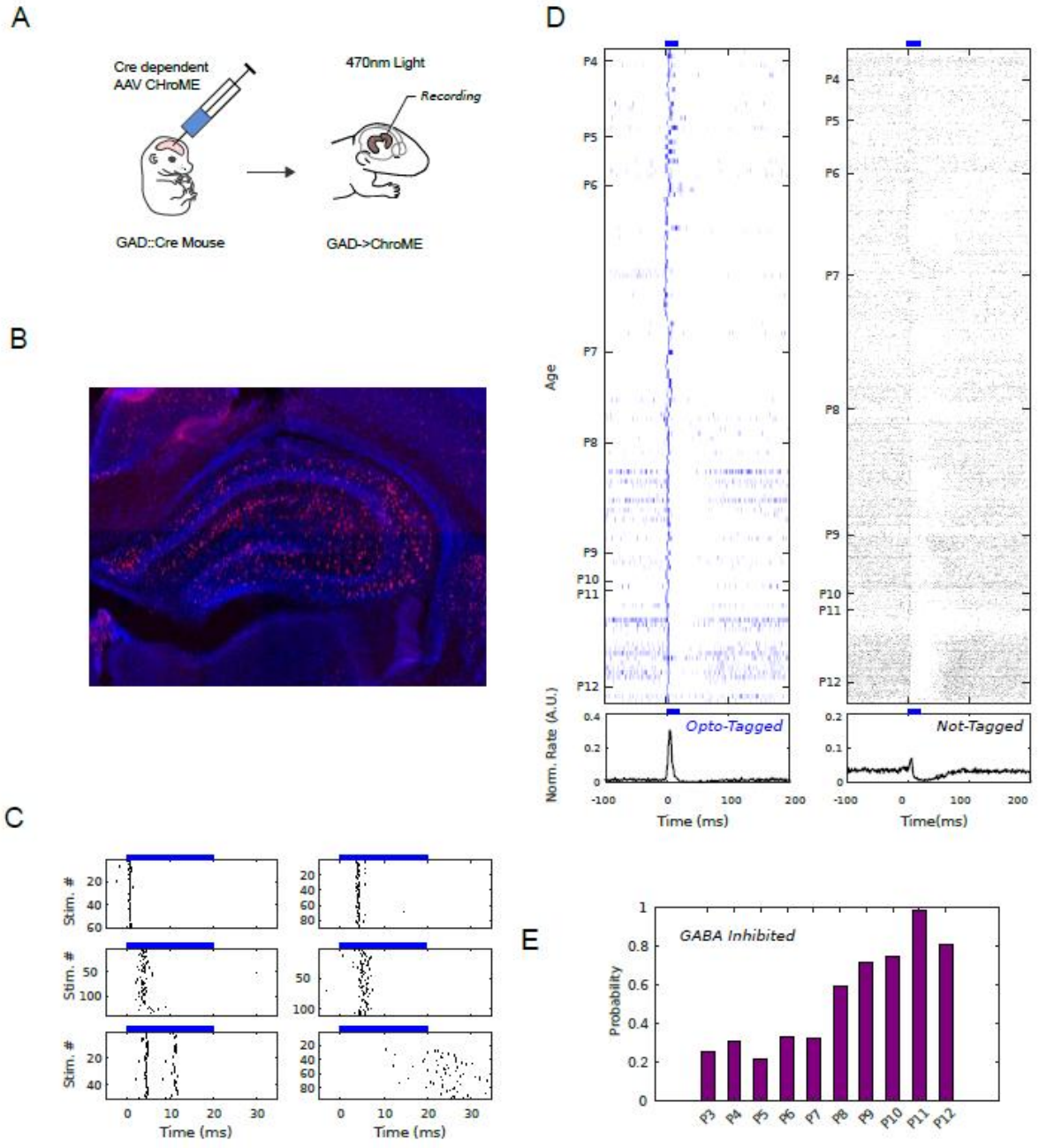


Figure 3: Opto-tagging of GABAergic cells and indirect network inhibition. A) GAD-Cre mice received ICV injections of ChroME expressing AAVs either at E16 or at P0 for recordings at P3-P6 or later, respectively. B) Coronal hippocampal section of a P3 mouse demonstrating de presence of reporter fluorescent protein mRuby (red) and DAPI (blue). C) Rasterplots of 6 different cells with fast delay (top four plots), rebound firing (bottom left) and late onset (bottom right). Dark dots represent action potentials of the cell, each row a stimulation trial. Blue rectangle: timing and duration of the photo-stmulation. D) Average PSTHS of tagged and not tagged cells sorted as a function of age. Bottom: population average. Note the decrease of firing during and after photo-stimulation. E) Proportion of cells that are significantly inhibited after photo-stimulation of ChroME-expressing GABAergic cells.

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2025.04.26.650764; this version posted April 27, 2025. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

Of a total of 1492 recorded cells (also belonging to the previous dataset but restricted to session where photo-stimulation induced a visible effect on the LFP), 131 (8.8%) were directly (within 10ms) and repeatedly (more than 5 stimulations) excited by the light stimulation (Figure 3). These cells will be referred to as '*opto-tagged*' cells. Among these cells, approximately half displayed a narrow, 1-2ms excitation window Figure 3C). Nine of these cells fired twice, in rebound, with a systematic interval ranging between 10 and 20 ms depending on the cell (Figure 3C -bottom left). Other opto-tagged neurons responded at more variable times, displaying a wider excitation window ranging from 5 to 20 ms (Figure 3C-middle row). Interestingly, 6 neurons (recorded between P4-P7) fired more than 10ms after the light onset (Figure 3C bottom right). It is unfortunately impossible to determine whether these cells were directly depolarized by the light (when they fired within the 20ms light stimulation), whether they were indirectly excited by other neurons or fired by disinhibition after GABAergic cells stopped firing.

Using histological reconstruction of the recording sites, the presence of APs on specific electrode contacts and the distance separating these contacts to the site of inversion of eSPW LFPs (in the superficial part of the str. pyramidale), it was possible to estimate the localization of opto-tagged cells with regards to the pyramidal cell layer. As seen on Supplementary Figure 6, opto-tagged cells were likely recorded in all recorded CA1 layers, including the str. oriens, the str. pyramidale, the str rad. and str lac. mol.

Stimulating opto-tagged cells induces inhibition in neonates.

The PSTHs of neurons that did not systematically fire during light stimulation are displayed in Figure 3D. From this graph, two major observations can be made. First, there is an excess firing that peaks 5 ms after stimulus onset. This short delay suggests that this increase is caused by direct photo-stimulation, likely involving GABAergic cells that do not express ChroME in large enough quantities to systematically fire after light stimulation. Indeed, we identified 54 cells that fire in a low number of trials (less than 5) but display an increased rate at stimulus onset. Second, following this 5 ms peak and lasting for ~40ms, there was a systematic decrease of the activity of a large number of cells. Statistical comparisons between baseline and post-stimulation on a trial-to-trial basis revealed that this inhibition concerned 42.8% of cells (638 neurons with significant paired t-tests). This inhibition was observed both in opto-tagged (n=65 over 131, 26.7%) and non-tagged (n=573 over 1361, 42.1%) neurons (proportions not significantly different, X^2= 2.7587. p=0.096). To better estimate the developmental effect of GABAergic stimulation on the network, we restricted our dataset to laser stimulations, which provide a stronger power and illuminated cells from all shanks at a time (35 pups, 1492 cells). Inhibition following photo-stimulation was observed as early as P3,

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2025.04.26.650764; this version posted April 27, 2025. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

where it affected 25.6% of cells (Figure 3E). This proportion increased sharply at P8 and reached 100% at P11 (Figure 3E).

Significant recruitment of GABAergic neurons during eSPWs

As seen on Figure 4A opto-tagged cells displayed similar response profiles than the rest of the population recorded in the same conditions (Figure 4B, Not-tagged cells). Opto-tagged cells also increased their firing rate at the trough of the eSPW and they also displayed a variety of responses similar to those observed in non-tagged cells. That said, their firing rate (mean=1.41±0.186Hz) was higher than for non-tagged cells (Figure 4C; mean=0.52±0.186Hz, ttest on logtransform data, t_{1490}=6.64; p=4.02*10^{-14}) and they fired in a larger proportion of eSPWs than non-tagged cells (Figure 4D; Opto-tagged: mean= 43.6.±2.84%, Not-tagged: mean=31.29±0.67%; t-test on the arcsin transform of the proportions: t=5.24, p=1.82*10^{-7}). Considering *Sharp* and *Sharp+Tail* cells only, the average spike time during the sharp period

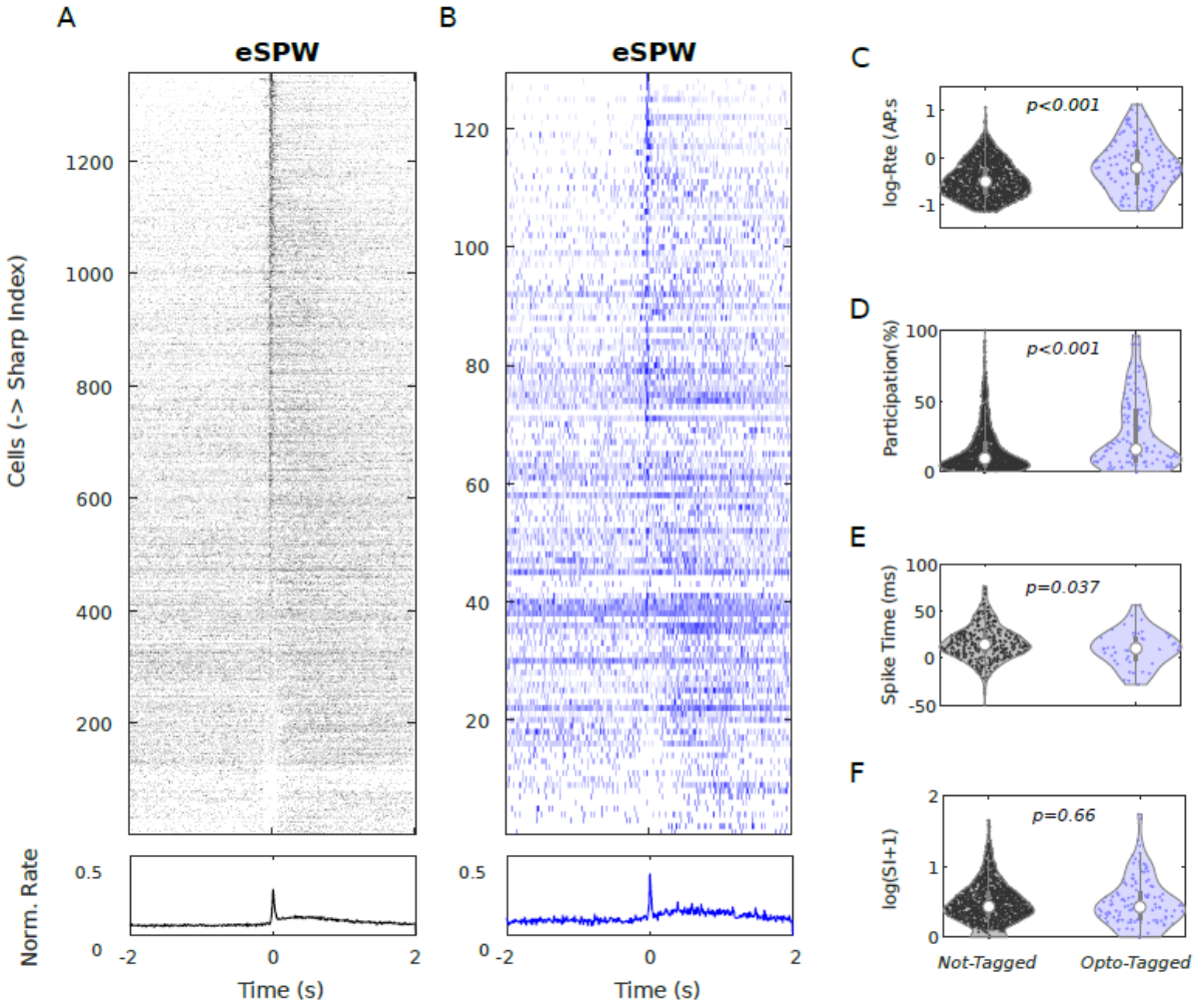


Figure 4. Firing properties of opto-tagged neurons. A) PETHs of not-tagged and B) opto-tagged neurons together with the population average (bottom). C-F) Violin plots of firing measures for both types of cells (kernel density estimates). Each dot is the measure for an individual cell. White circle: median; grey, thick vertical bar: 25th and 75th percentile, thin vertical bar: outlier limit. p: p-value.

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2025.04.26.650764; this version posted April 27, 2025. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

(±100 ms around the eSPW trough -Figure 4E) was smaller for opto-tagged neurons (mean=9.9±2.86ms) than for not-tagged neurons (mean=16.3±0.96ms, t=2.098, p=0.037). Furthermore, the activity of opto-tagged cells was more likely to be significantly modulated by eSPWs than not-tagged cell (49.6% vs 39.6% of modulated cells in opto-tagged and non-tagged cells, respectively; χ^2 test of independence $\chi^2_{(1,\ N=1492)}=4.98$, p=0.026). Importantly, 10.7% of opto-tagged cells (n=14) were significantly inhibited during eSPWs, suggesting that they also received inhibitory inputs. SIs were similar between the two classes of cells (Figure 4F). Altogether, these results suggest that GABAergic neurons are strongly active during eSPWs, and therefore contribute significantly to the inhibitory activity observed during eSPWs.

Discussion

Using a novel method based on opto-tagging of hippocampal GABA neurons in vivo, we were able to show that these cells were highly active during the first post-natal week and that they exert an inhibitory action on approximately a 3rd of the recorded neurons. Evidence of putative GABA-drive excitation at this age was inconsistent and only concerned a negligible (~0.4%) of recorded cells. In accordance with these results, single unit recordings also showed evidence for eSPW-driven inhibition as early as P3. This proportion increased with age, so did the proportion of cells inhibited after photo-stimulation of ChroME-expressing GABAergic neurons. After a rapid increase at the beginning of the 2nd post-natal week, it reached 80-100% at P10-P12. Altogether, these results suggest that endogenous GABA is inhibitory in the neonatal hippocampus and that its inhibitory influence sharply increases during the 2nd Post-Natal week.

Relevance of the method: Since the discovery of GDPs and the shift in intracellular chloride concentrations during development, a major challenge has been to characterize the role of GABAergic activity in immature networks in-vivo. By adapting traditional in-vitro techniques to live, immature animals, investigators have been able to reveal, in pyramidal cells, the simultaneous presence of glutamatergic and GABAergic ($GABA_A$) currents during eSPWs (Leinekugel et al., 2002), reminiscent of what happens during GDPS. However, such techniques only provide data from a small number of cells at a time, preventing experimenters to grasp the full diversity of neuronal activity according to cell type or age. To this day, there is no report of intracellular activity in immature GABAergic neurons during eSPWs in-vivo.

Recently, exciting results have been produced by calcium imaging recordings in live immature mice. Kirmse et al. (2015), showed that, although exogenous GABA delivery depolarized cortical plate neurons at P3-P4 in-vivo, it failed to induce calcium transients. The authors concluded that GABA was depolarizing but not excitatory in the immature neocortex in-vivo. More recently, Dard et al. (2022) investigated immature calcium transients in both hippocampal

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2025.04.26.650764; this version posted April 27, 2025. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

pyramidal and GABAergic neurons in-vivo. They showed that during the 1st post-natal week, hippocampal pyramidal cells and interneurons were synchronously activated following myoclonic twitches and startles. At the beginning of the 2nd post-natal week, pyramidal cells, but not interneurons disengaged from movement. This discontinuity in hippocampal dynamics, coinciding with the emergence of peri-somatic inhibition, suggests that the inhibitory action of GABA only impacts hippocampal networks after the 2nd post-natal week. However, the temporal dynamics of calcium fluorescent indicators are significantly slower than electrophysiological events such as APs. This may be particularly problematic for fast inhibitory activity, which may not be detected when surrounded such an intense AP firing as the one observed during myoclonic twitches and eSPWs. Despite remarkable advances in calcium indicators and spike inference algorithms (Berens et al., 2018; Deneux et al., 2016; Vogelstein et al., 2010) there are still functional differences between neuronal activity recorded in electrophysiology vs calcium imaging (Siegle et al., 2021; Wei et al., 2020). Therefore, current calcium fluorescence techniques may not reveal the full activity repertoire of immature GABAergic neurons in-vivo, particularly during the first post-natal week. As we saw in our extracellular dataset, it is almost impossible to discriminate between interneurons and pyramidal cells on the sole basis of extracellular waveform and/or discharge properties. For this reason, we developed the opto-tagging method to identify GABAergic neurons within our single unit recordings. This allowed us to investigate neuronal activity at the millisecond resolution while keeping track of the identity of GABAergic neurons. Notably, we observed an heterogeneity of responses during eSPWs, including a short-lasting (~100ms) inhibition in a small portion of cells. This was not observed in calcium imaging data.

GABAergic Inhibition but not excitation in the immature hippocampus. Our results provide evidence for an inhibitory role of GABAergic neurons during the first post-natal week in-vivo. In addition, less than 1% of recorded neurons fired with a long delay (15-25 ms) after the photo-stimulation onset. While these neurons (all recorded before P8) could have been excited by GABAergic transmission, their response delays were rather short compared to what is observed in-vitro (~40ms), under physiological, immature intracellular chloride concentrations (Valeeva et al., 2010). In any case, the low proportion of these cells (~0.4%) suggests that, even during the first post-natal week, the excitatory action of GABA on hippocampal single unit firing is negligeable compared to its massive inhibitory effect on the network. Therefore, although acute slice preparations experiments support the excitatory GABA hypothesis, our result fail to do so in-vivo. Yet, recent evidence suggests that immature GABA may be indeed depolarizing in-vivo. First, $[Cl]_i$ is elevated in immature neurons in-vivo (Sato et al., 2017). Second, exogenous GABA induces a depolarization of the majority of cortical plate neurons at P3-P4 (Kirmse et al., 2015). Finally, using chemogenetics Murata and Colonnese (Murata &

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2025.04.26.650764; this version posted April 27, 2025. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

Colonnese, 2020) showed that excitation or inhibition of hippocampal GABAergic cells increased or decreased neuronal firing in vivo. To reconcile these results with ours, one may consider the depolarizing action of GABA as facilitating, rather than excitatory. Indeed, the fact that, in neonates, the reversal potential of GABA (~-60µV) sits close to the AP threshold of the cell (~-45 µV) makes it a good candidate to facilitate ongoing glutamatergic inputs and indirectly trigger APs. This scenario likely occurred in Murata et al. (2020) experiments where spontaneous multi-unit activity was studied in the context of prolonged activation of GABAergic cells. In contrast, our photo-stimulations triggered short bursts of GABA release, occurring randomly during our recordings. Since background activity in neonates is really low, GABA release was more likely to be triggered alone, without the co-occurrence of glutamatergic inputs. As demonstrated by Kirmse et al., (2015) and explaining the absence of GABA driven excitation in our data, GABA release by itself is not sufficient to induce AP firing. While our experimental procedures do not allow us to investigate subthreshold events, recent advances on voltage sensitive dyes may help us reveal such effects.

Origin of early Gabaergic inhibition. During the 1st post-natal week, we observed a consistent suppression of AP firing in a third of the hippocampal units. This inhibitory effect may be caused by a GABA-induced hyperpolarization or by a shunting effect of GABA, mechanism through which glutamatergic inputs are cancelled by both a reduction of input resistance of the cells and a re-entry of chloride ions when its membrane potential reaches the GABA reversing potential (Gao et al., 1998). Another, non-exclusive possibility is that the co-activation of metabotropic $GABA_B$ receptors induced a significant inhibitory effect. This effect has indeed been demonstrated in slices (Khalilov et al., 2017; Tosetti et al., 2004, 2005).

Given the late rise of perisomatic inhibition from PV basket cells (Dard et al., 2022), such neonatal inhibition may originate from dendrite targeting GABAergic interneurons. While we cannot determine precisely the type of GABAergic cell we recorded, our LFP/histological reconstructions suggest that opto-tagged cells likely belong to interneurons with cell bodies in multiple CA1 layers, including but not restricted to the pyramidal cell layer. All cell types are therefore likely to contribute to inhibition at these ages. Further studies may reveal the differential contribution of specific subclasses GABAergic cells and receptors to early inhibition.

The rise of inhibition during the second post-natal week. The proportion of cells inhibited by photo-stimulation of GAD-Cre neurons rose-up sharply, going from ~20% between P3 and P7 to 60% at P8 and even 100% at P10. Similarly the proportion of cells inhibited by eSPWs increased. In the same time, the excitatory impact of eSPWs on the network decreased. These results are in agreement with a recent study from Dard et al. (2022) that showed a rapid rise of the movement-induced inhibition during the second post-natal week. This rise of inhibition

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2025.04.26.650764; this version posted April 27, 2025. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

was paralleled with the emergence of peri-somatic inhibition by Parvalbumin-expressing GABAergic cells. In addition to the maturation of peri-somatic inhibition, other developmental processes, such as the maturation of $GABA_B$ signalling (Luhmann & Prince, 1991) or the upregulation of the chloride extruder KCC2 (Rivera et al., 1999) may participate to such an increase.

Conclusion.

Altogether, our results provide strong evidence for a net inhibitory effect of GABA signalling in the neonatal hippocampus. Is also confirms previous reports of a rapid rise of inhibition after the second post-natal week. As argued in Dard et al. (2022) and (Kirmse & Zhang, 2022), it is likely that the development GABAergic inhibition at the beginning of the 2nd post-natal week allows CA1 neurons to disengage from sensory inputs driven by the periphery such as myoclonic twitches/startles and retinal or cochlear waves. This late disengagement from the periphery may allow the emergence of internal hippocampal dynamics, necessary for the initiation of environment exploration.

Methods

All experimental procedures, husbandry and care were approved by the French ethics committee (Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (MESRI); Comité d'éthique CEEA-014; APAFiS #28.506 #46290-2023121410536843 v5 and S #38060-2022072115429698 v9). They were conducted in agreement with the European Union Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes.
Mice were bred and stored in an animal facility with room temperature (RT) and relative humidity maintained at 22 ± 1°C and 50 ± 20%, respectively. They were provided ad libitum access to water and food and housed in enriched social and environmental conditions.

GAD67-Cre mice were kindly donated by Dr. Hannah Monyer (Heidelberg University) and back-crossed to a JAX Swiss Outbred background. GAD-Cre males were then bred with wildtype Swiss females.

Viral vectors (pAAV-CAG-DIO-ChroME-ST-P2A-H2B-mRuby3), obtained from Addgene and donated by H. Adesnik (viral prep # 108912-AAV9; http://n2t.net/addgene:108912; RRID:Addgene_108912) were used to express the cre-dependent cation channelrhodopsin ChroME and target it to the soma and proximal dendrites of neurons (Mardinly et al., 2018). The opsin was also separated from the reporter protein mRuby3, which remained in the

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2025.04.26.650764; this version posted April 27, 2025. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

nucleus. During the initial stages of the experiment, two litters (7 animals P5-P7) were injected with another viral vector (pAAV-EF1a-double floxed-hChR2(H134R)-mCherry-WPRE-HGHpA (AAV9)) expressing the humanized channelrhodopsin H134R mutant fused with mCherry. In our hands, the light activation induced using this viral last vector was less efficient than with the ChroME-mRuby3 vector.
Depending of the desired recording age (before or after P6) viral vectors were either injected in-utero at embryonic age 15 (E15) or intra-cerebro-ventricularly at P0, respectively.

The intra-cerebro-ventricular injection protocol was adapted from published methods (Bocchio et al., 2024; Kim et al., 2014; Leprince et al., 2023). P0 Gad67cre/+ mouse pups, genotyped the same day, were anesthetized by hypothermia. They were placed on ice and maintained on a dry ice-cooled stereotaxic adaptor (Stoelting, 51615) fixed to a stereotaxic frame with a digital display console (Kopf, Model 940). Solutions (2µL) containing diluted AAV with Fast Blue dye (1:20) were injected in the left lateral ventricle, estimated to be at two fifth of the imaginary line between the left eye and lambda. Injections were performed with a glass pipette pulled from borosilicate glass (3.5” 3-000-203-G/X, Drummond Scientific) and connected to a Nanoject III system (Drummond Scientific). The pipette was inserted 0,4 mm below the surface of the skull. Injections accuracy was visually verified by transparency when the blue dye spread through the whole ventricle. After injection, pups were placed with their litter and recording procedures started 5 days later.

In utero injections (adapted from (Cloarec et al., 2016; Walantus et al., 2007)) were performed on pregnant dams at E15,5 under analgesia (buprenorphine- Buprecare® -0,045mg/kg and carprophen, Rimadyl® -10mg/kg) and general anesthesia (Isoflurane 1,5-2%). The uterine horns were exposed and a volume of 1,5–2 µL of viral solutions with the same concentrations was injected into the left lateral ventricle of each embryo. Injections were performed through a pulled glass capillary with a microinjector (Picospritzer II, General Valve Corporation, Fairfield, NJ, USA). Mice give birth 4 days after the procedure. At P3, the expression of mRuby3 in Gad67cre/+ pups was detectable when mice were placed under green fluorescent light. This allowed us to restrict our recording procedures to Gad-Cre/ChroMe-mRuby3 pups and therefore reduce the number of animals used for experiments.

Validation of the GAD67-Cre transgenic mouse line and ChroME viral vectors, previously done in our laboratory and published in a recent article (Bocchio et al., 2024). Briefly, immunolabelling of injected pups showed that the distribution of mRuby3 expressing cells was consistent to the known distribution of GABAergic neurons in CA1. We did not find any neuron

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2025.04.26.650764; this version posted April 27, 2025. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

with pyramidal-like structure (with dendrites reaching to the *str. Lac. Mol*) expressing mRuby3. Finally, all mRuby3 expressing cells were GAD67 positive.

Surgery was performed in mice aged between P3 and P12 under isoflurane anesthesia (2-4 %). Before surgery, mice received a subcutaneous injection of buprenorphine (Buprecare® 0,03mg/kg) and topical administration of lidocaine/prilocaine ointment (5 %) on the scalp. During anesthesia, the scalp was scrubbed with pividone-iodine solution(Betadine® 7.5%) and incised with a scalpel. The skull was cleared of periosteum and blood. Two chlorided silver wires (5cm long, 127µm diameter, AM-System), serving as ground and reference, were placed for 1mm between the skull and the dura above the posterior part of the auditory cortex and secured with cyanoacrylate glue (vetbond, 3M). A 3 by 1 cm head bar was then fixed above the cerebellum and posterior visual cortex with dental cement (Superbond, Sun Medical CO.), letting the areas above both hippocampi accessible. Craniotomies were then performed above the hippocampi in the coordinates described on table 1 s a function of age.

	P3-P4	P5-P6	P7-P8	P9-P10	P11-P12
AP	1.1mm	1.3mm	1.5mm	1.7mm	1.9mm
ML	1.3mm	1.5mm	1.7mm	1.9mm	2.1mm

Table 1. Stereotaxic coordinates for hippocampal electrode insertion (with regards to Bregma) as a function of age.

The craniotomy sites were covered with agarose (Sigma-Aldrich, 2% in PBS solution) for protection until recording time. Pups were then let to recover without anesthesia on a heating pad. Thirty minutes after surgery, pups were secured to the recording apparatus via the head bar, the rest of the body resting on a heating pad to maintain body temperature at 37°C. Throughout the recording that follows, pups were constantly monitored and fed with veterinary milk ad libitum. A piezo element (RS Pro, 35mm Ø) functioning as a movement detector was placed bellow the animal and connected to custom made electronic amplifier and rectifier montage (https://mptek.fr/).

Electrodes consisted of silicon probes that were previously coated with a fluorescent marker (DiI-Sigma-Aldrich) and secured to micro-manipulators (IVM 300; Scientifica) by specific adapters (Adpt-A32-OM32 and Adpt-A64-OM32x2-sm, Neuronexus) and driven through a computer interface (LinLab2, Scientifica). Two types of silicon probes were used simultaneously. First, 32-channel probes (A1x32-Edge, Neuronexus) with contacts spread linearly along a single axis (50µm spacing covering 1550 µm) were used to detect eSPW LFPs. They were inserted throughout CA1-Dentate gyrus axis of the left dorsal hippocampus. Second, high density 32- or 64ch probes (Buzsaki32, Neuronexus or ASSY-77 P-1, Cambridge

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2025.04.26.650764; this version posted April 27, 2025. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

Neurotech), mounted with optic fibers were used for electrophysiology and optogenetics. These probes, also coated with DiI were slowly inserted through the right dorsal hippocampus by steps ranging from 20 µm, for the first 800 µm to 1 µm when approaching the pyramidal cell layer where APs appeared. Once units of sufficient amplitude (3 times the background activity) were detected, the electrode was left in place for 15 minutes and recordings started. Once a recording was achieved, the single unit electrode array was moved ~50-100 µm in order to detect other units below the pyramidal cell layer, identified by the LFP inversion during eSPWs. The signal from the electrodes was filtered (0.1 Hz- 6000 Hz), digitized (30KHz) and multiplexed by preamplifiers (RHD-32 channel, Intan Technologies). It was then recorded via an acquisition system (RHD2000_evaluation_system, Intan Technologies) that synchronously recorded the analog signals from the piezo sensors and the TTL ouputs from the optogenetic controlling devices. Signal acquisition was controlled via the Open-Ephys graphical user interface (https://open-ephys.org/gui; Versions 0.6.0 to 0.6.6).

Optical stimulation was performed via optic fibers located either on each shank of the probe (Buzsaki32, neuronexus, 105 µm core fiber, 0.22 NA) or one fiber above all shanks (Assy-77, Cambridge Neurotech -100 µm core fiber, 0.22 NA with 0.7mm taper tip). A critical part of the stimulation protocol (Royer et al., 2010, 2012) is the ability to modulate the intensity of the light pulse so that it progressively increases and decreases (such as between the troughs of a sine wave). To do so we first used four LEDs (470nm, 170mW; Thorlabs) collimated through a lens to optic fibers (100 µm core, 0.22NA) themselves connected to the electrode array with a ferrule. At the extremity each shank fiber, light power reached a maximum of 40µW, which is sufficient to induce AP firing near electrode contacts, but not to excite neurons outside of this region. However, after multiple use of the electrode arrays, we realized that despite careful cleaning, fibers become opaque, and light output becomes dimmer. Under these conditions, it was therefore difficult to induce APs. In later parts of this experiment, we therefore used a more powerful laser source (Sapphire 488, Coherent), that we controlled to output between 110 and 900 µW.

Light sources were modulated using a custom made MATLAB graphical user interface from which we selected the shank excited (In the case of Neuronexus probes) and the light parameters being used. The output from this interface was sent to a Digital/Analog I/O interface (National Instruments USB-6341) and dispatched between LEDs or the laser and the Open-Ephys acquisition board. Using a photo-sensor connected to an oscilloscope, we determined the delays between the emission of the TTLs and the appearance of light on the tip of the electrode. These delays were different between the LED (2ms) and the laser (1ms), they were taken in consideration when computing the cellular responses to photo-stimulation.

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2025.04.26.650764; this version posted April 27, 2025. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

Spike sorting was performed offline using the Spyking-circus toolbox, developed in python (Yger et al., 2018). This toolbox uses template a matching algorithm, that allows to retrieve waveforms even in the case of temporal collision with other waveforms from other neurons. This is particularly relevant in periods of high firing such as eSPWs or optogenetic stimulations. Curation and visualization of spike sorting output was performed with the Phy (https://github.com/cortex-lab/phy) software.

All analyses were performed using custom made scripts on Matlab (Mathworks). Statistical significance was considered at $p<0.05$.

Figure legends

Figure 1. Electrophysiological recordings in head-fixed, non-anesthetized neonatal mice. A) Illustration of the recording principle. B) Example of LFP traces recorded in the pyramidal cell layer (Pyr.) and *stratum radiatum* (Rad), together with the movement outputs from one piezo-element glued to a forepaw. Vertical bars of different colors indicate the occurrence of APs from different cells, isolated from the spike sorting process. Red dots indicate eSPWs (calibration bars: vertical: 200 µV; horizontal: 5s). C) Close-up view of the traces at the time surrounding the eSPW indicated by an asterisk (calibration bars: vertical: 100 µV; horizontal: 0.2s). D) Top: Cell response to eSPW from the entire dataset. Each line represents the PETH of an individual cell, normalized by the peak firing rate in the PETH and expressed as a linear grayscale (white=no firing, black=maximum firing). Cells are sorted by decreasing SI. Bottom: average for all cells. E-H) Similar representation selecting cells from four classes of responses.

Figure 2. Evolution of firing properties as a function of age. A) PETHS for the whole dataset with cells sorted by increasing age. B-C) Box plots of log-transformed of firing rates and SI as a function of age. Horizontal bars: median, lower and higher extremities: 25^{th} and 75^{th} percentiles, vertical bars: limit for outliers. D-E) Evolution of the proportion of cells that are excited or inhibited during eSPWs, respectively.

Figure 3: Opto-tagging of GABAergic cells and indirect network inhibition. A) GAD-Cre mice received ICV injections of ChroME expressing AAVs either at E16 or at P0 for recordings at P3-P6 or later, respectively. B) Coronal hippocampal section of a P3 mouse demonstrating de presence of reporter fluorescent protein mRuby (red) and DAPI (blue). C) Rasterplots of 6 different cells with fast delay (top four plots), rebound firing (bottom left) and late onset (bottom right). Dark dots represent action potentials of the cell, each row a stimulation trial. Blue rectangle: timing and duration of the photo-stimulation. D) Average PSTHS of tagged and not tagged cells sorted as a function of age. Bottom: population average. Note the decrease of

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2025.04.26.650764; this version posted April 27, 2025. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

firing during and after photo- stimulation. E) Proportion of cells that are significantly inhibited after photo-stimulation of ChroME expressing cells.

Figure 4. Firing properties of opto-tagged neurons. A) PETHs of not-tagged and B) opto-tagged neurons together with the population average (bottom). C-F) Violin plots(Hintze & Nelson, 1998) of firing measures for both types of cells (kernel density estimates). Each dot is the measure for an individual cell. White circle: median; grey, thick vertical bar: 25th and 75th percentile, thin vertical bar: outlier limit. p: p-value.

Acknowledgements

This work was supported by the French National Research Agency (ANR-22-CE17-0016) European Research Council under the European Union's Horizon 2020 research and innovation program grant #646925 and #951330 (HOPE), the Fondation Bettencourt Schueller, and the Fondation Allianz-Institut de France. S.M. was funded by the "Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation". We would like to thank all INMED members for scientific discussions about the project; H Rouault, S. Sarno, R. Khazipov, M. Minlebaev, M. Picardo, P Quilichini, J Epsztein and J Koenig for their technical, computational and scientific assistance throughout the project. We are grateful to members of the Khazipov team for sharing equipment and facilities, A. Carabalona, A. Fortoul, and E. Buhler for their training in-utero injections; F. Michel from the INMED imaging facility (InMagic), M. Kurz for her assistance with the maintenance and generation of transgenic mice; A. Monthiel and F. Bader from the INMED cellular molecular biology platform for express genotyping, the staff of the INMED animal facility, G. Gay from the Turing Centre for living systems multi-engineering platform for custom software design and R. Martinez for his logistical support.

References

Ackman, J. B., Burbridge, T. J., & Crair, M. C. (2012). Retinal waves coordinate patterned activity throughout the developing visual system. *Nature*, *490*(7419), 219–225. https://doi.org/10.1038/nature11529

Babola, T. A., Li, S., Gribizis, A., Lee, B. J., Issa, J. B., Wang, H. C., Crair, M. C., & Bergles, D. E. (2018). Homeostatic Control of Spontaneous Activity in the Developing Auditory System. *Neuron*, *99*(3), 511-524.e5. https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2018.07.004

Ben-Ari, Y., Cherubini, E., Corradetti, R., & Gaiarsa, J. L. (1989). Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. *The Journal of Physiology*, *416*(1), 303–325. https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.1989.SP017762

Berens, P., Freeman, J., Deneux, T., Chenkov, N., McColgan, T., Speiser, A., Macke, J. H., Turaga, S. C., Mineault, P., Rupprecht, P., Gerhard, S., Friedrich, R. W., Friedrich, J., Paninski, L., Pachitariu, M.,

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2025.04.26.650764; this version posted April 27, 2025. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

Harris, K. D., Bolte, B., Machado, T. A., Ringach, D., … Bethge, M. (2018). Community-based benchmarking improves spike rate inference from two-photon calcium imaging data. *PLoS Computational Biology*, *14*(5). https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006157

Blankenship, A. G., & Feller, M. B. (2010). Mechanisms underlying spontaneous patterned activity in developing neural circuits. *Nature Reviews. Neuroscience*, *11*(1), 18–29. https://doi.org/10.1038/NRN2759

Bocchio, M., Vorobyev, A., Sadeh, S., Brustlein, S., Dard, R., Reichinnek, S., Emiliani, V., Baude, A., Clopath, C., & CossartID, R. (2024). Functional networks of inhibitory neurons orchestrate synchrony in the hippocampus. *PLOS Biology*, *22*(10), e3002837. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.3002837

Bonifazi, P., Goldin, M., Picardo, M. A., Jorquera, I., Cattani, A., Bianconi, G., Represa, A., Ben-Ari, Y., & Cossart, R. (2009). GABAergic hub neurons orchestrate synchrony in developing hippocampal networks. *Science*, *326*(5958), 1419–1424. https://doi.org/10.1126/science.1175509

Bragg-Gonzalo, L., Aguilera, A., González-Arias, C., De León Reyes, N. S., Sánchez-Cruz, A., Carballeira, P., Leroy, F., Perea, G., & Nieto, M. (2024). Early cortical GABAergic interneurons determine the projection patterns of L4 excitatory neurons. In *Sci. Adv* (Vol. 10). https://www.science.org

Cancedda, L., Fiumelli, H., Chen, K., & Poo, M. M. (2007). Excitatory GABA action is essential for morphological maturation of cortical neurons in vivo. *Journal of Neuroscience*, *27*(19), 5224–5235. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5169-06.2007

Cherubini, E., Gaiarsa, J. L., & Ben-Aft, Y. (1991). *GABA: an exitatory transmitter in early postnatal life*.

Cherubini, E., Rovira, C., Gaiarsa, J. L., Corrade˜i, R., & Ari, Y. Ben. (1990). GABA MEDIATED EXCITATION IN IMMATURE RAT CA3 HIPPOCAMPAL NEURONS. In *ht. I. Devl. Neuroscience* (Vol. 8, Issue 4).

Cloarec, R., Bauer, S., Luche, H., Buhler, E., Pallesi-Pocachard, E., Salmi, M., Courtens, S., Massacrier, A., Grenot, P., Teissier, N., Watrin, F., Schaller, F., Adle-Biassette, H., Gressens, P., Malissen, M., Stamminger, T., Streblow, D. N., Bruneau, N., & Szepetowski, P. (2016). Cytomegalovirus Infection of the Rat Developing Brain In Utero Prominently Targets Immune Cells and Promotes Early Microglial Activation. *PLoS ONE*, *11*(7), e0160176. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0160176

Dard, R. F., Leprince, E., Denis, J., Balappa, S. R., Suchkov, D., Boyce, R., Lopez, C., Giorgi-Kurz, M., Szwagier, T., Dumont, T., Rouault, H., Minlebaev, M., Baude, A., Cossart, R., & Picardo, M. A. (2022). The rapid developmental rise of somatic inhibition disengages hippocampal dynamics from self-motion. *ELife*, *11*. https://doi.org/10.7554/ELIFE.78116

De Marco García, N. V., Karayannis, T., & Fishell, G. (2011). Neuronal activity is required for the development of specific cortical interneuron subtypes. *Nature*, *472*(7343), 351–355. https://doi.org/10.1038/nature09865

De Marco García, N. V., Priya, R., Tuncdemir, S. N., Fishell, G., & Karayannis, T. (2015). Sensory inputs control the integration of neurogliaform interneurons into cortical circuits. *Nature Neuroscience*, *18*(3), 393–403. https://doi.org/10.1038/nn.3946

Deneux, T., Kaszas, A., Szalay, G., Katona, G., Lakner, T., Grinvald, A., Rozsa, B., & Vanzetta, I. (2016). Accurate spike estimation from noisy calcium signals for ultrafast three-dimensional imaging of large neuronal populations in vivo. *Nature Communications*, *7*. https://doi.org/10.1038/ncomms12190

Duan, Z. R. S., Che, A., Chu, P., Modol, L., Bollmann, Y., Babij, R., Fetcho, R. N., Otsuka, T., Fuccillo, M. V., Liston, C., Pisapia, D. J., Cossart, R., & De Marco García, N. V. (2020). GABAergic Restriction of Network Dynamics Regulates Interneuron Survival in the Developing Cortex. *Neuron*, *105*(1), 75-92.e5. https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2019.10.008

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2025.04.26.650764; this version posted April 27, 2025. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

Dupuy, S. T., & Houser, C. R. (1996). Prominent Expression of Two Forms of Glutamate Decarboxylase in the Embryonic and Early Postnatal Rat Hippocampal Formation. *Journal of Neuroscience*, *16*(21), 6919–6932. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-21-06919.1996

Flossmann, T., Kaas, T., Rahmati, V., Kiebel, S. J., Witte, O. W., Holthoff, K., & Kirmse, K. (2019). Somatostatin Interneurons Promote Neuronal Synchrony in the Neonatal Hippocampus. *Cell Reports*, *26*(12), 3173-3182.e5. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.02.061

Gao, X. B., Chen, G., & Van Den Pol, A. N. (1998). GABA-dependent firing of glutamate-evoked action potentials at AMPA/kainate receptors in developing hypothalamic neurons. *Journal of Neurophysiology*, *79*(2), 716–726. https://doi.org/10.1152/JN.1998.79.2.716

Graf, J., Zhang, C., Marguet, S. L., Herrmann, T., Flossmann, T., Hinsch, R., Rahmati, V., Guenther, M., Frahm, C., Urbach, A., Neves, R. M., Witte, O. W., Kiebel, S. J., Isbrandt, D., Hübner, C. A., Holthoff, K., & Kirmse, K. (2021). A limited role of NKCC1 in telencephalic glutamatergic neurons for developing hippocampal network dynamics and behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *118*(14). https://doi.org/10.1073/PNAS.2014784118/-/DCSUPPLEMENTAL

Griguoli, M., & Cherubini, E. (2017). Early correlated network activity in the hippocampus: Its putative role in shaping neuronal circuits. In *Frontiers in Cellular Neuroscience* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00255

Hanganu, I. L., Ben-Ari, Y., & Khazipov, R. (2006). Retinal waves trigger spindle bursts in the neonatal rat visual cortex. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *26*(25), 6728–6736. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0752-06.2006

Hanganu-Opatz, I. L. (2010). Between molecules and experience: role of early patterns of coordinated activity for the development of cortical maps and sensory abilities. *Brain Research Reviews*, *64*(1), 160–176. https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESREV.2010.03.005

Hintze, J. L., & Nelson, R. D. (1998). Violin plots: A box plot-density trace synergism. *American Statistician*, *52*(2), 181–184. https://doi.org/10.1080/00031305.1998.10480559

Inácio, A. R., Nasretdinov, A., Lebedeva, J., & Khazipov, R. (2016). Sensory feedback synchronizes motor and sensory neuronal networks in the neonatal rat spinal cord. *Nature Communications*, *7*. https://doi.org/10.1038/ncomms13060

Karlsson, K., & Blumberg, M. S. (2003). Hippocampal theta in the newborn rat is revealed under conditions that promote REM sleep. *Journal of Neuroscience*, *23*(4), 1114–1118. https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-04-01114.2003

Karlsson, K., Mohns, E. J., Viana di Prisco, G., & Blumberg, M. S. (2006). On the co-occurrence of startles and hippocampal sharp waves in newborn rats. *Hippocampus*, *16*(11), 959–965. https://doi.org/10.1002/HIPO.20224

Katz, L. C., & Shatz, C. J. (1996). Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science (New York, N.Y.)*, *274*(5290), 1133–1138. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.274.5290.1133

Khalilov, I., Dzhala, V., Ben-Ari, Y., Khazipov, R., & Khazipov, R. (1999). Dual Role of GABA in the Neonatal Rat Hippocampus. In *Dev Neurosci* (Vol. 21). www.karger.com/journals/dne

Khalilov, I., Minlebaev, M., Mukhtarov, M., Juzekaeva, E., & Khazipov, R. (2017). Postsynaptic GABA(B) Receptors Contribute to the Termination of Giant Depolarizing Potentials in CA3 Neonatal Rat Hippocampus. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *11*, 179. https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00179

Khazipov, R., Esclapez, M., Caillard, O., Bernard, C., Khalilov, I., Tyzio, R., Hirsch, J., Dzhala, V., Berger, B., & Ben-Ari, Y. (2001). Early Development of Neuronal Activity in the Primate HippocampusIn

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2025.04.26.650764; this version posted April 27, 2025. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

Utero. *Journal of Neuroscience*, *21*(24), 9770–9781. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-24-09770.2001

Khazipov, R., Leinekugel, X., Khalilov, I., Gaiarsa, J.-L., & Ben-Ari, Y. (1997). Synchronization of GABAergic interneuronal network in CA3 subfield of neonatal rat hippocampal slices. In *Journal of Physiology*.

Khazipov, R., & Luhmann, H. J. (2006). Early patterns of electrical activity in the developing cerebral cortex of humans and rodents. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 29, Issue 7, pp. 414–418). https://doi.org/10.1016/j.tins.2006.05.007

Khazipov, R., Sirota, A., Leinekugel, X., Holmes, G. L., Ben-Ari, Y., & Buzsáki, G. (2004). Early motor activity drives spindle bursts in the developing somatosensory cortex. *Nature*, *432*(7018), 758–761. https://doi.org/10.1038/nature03132

Kim, J. Y., Grunke, S. D., Levites, Y., Golde, T. E., & Jankowsky, J. L. (2014). Intracerebroventricular Viral Injection of the Neonatal Mouse Brain for Persistent and Widespread Neuronal Transduction. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, *91*, 51863. https://doi.org/10.3791/51863

Kirmse, K., Kummer, M., Kovalchuk, Y., Witte, O. W., Garaschuk, O., & Holthoff, K. (2015). GABA depolarizes immature neurons and inhibits network activity in the neonatal neocortex in vivo. *Nature Communications*, *6*. https://doi.org/10.1038/ncomms8750

Kirmse, K., & Zhang, C. (2022). Principles of GABAergic signaling in developing cortical network dynamics. *Cell Reports*, *38*(13). https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2022.110568

Leinekugel, X., Khazipov, R., Cannon, R., Hirase, H., Ben-Ari, Y., & Buzsáki, G. (2002). Correlated bursts of activity in the neonatal hippocampus in vivo. *Science*, *296*(5575), 2049–2052. https://doi.org/10.1126/science.1071111

Leprince, E., Dard, R. F., Mortet, S., Filippi, C., Giorgi-Kurz, M., Bourboulou, R., Lenck-Santini, P. P., Picardo, M. A., Bocchio, M., Baude, A., & Cossart, R. (2023). Extrinsic control of the early postnatal CA1 hippocampal circuits. *Neuron*, *111*(6), 888-902.e8. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.12.013

Lima, S. Q., Hromádka, T., Znamenskiy, P., & Zador, A. M. (2009). PINP: a new method of tagging neuronal populations for identification during in vivo electrophysiological recording. *PloS One*, *4*(7). https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0006099

Luhmann, H. J., & Prince, D. A. (1991). Postnatal maturation of the GABAergic system in rat neocortex. *Journal of Neurophysiology*, *65*(2), 247–263. https://doi.org/10.1152/JN.1991.65.2.247

Manent, J. B., & Represa, A. (2007). Neurotransmitters and brain maturation: Early paracrine actions of GABA and glutamate modulate neuronal migration. In *Neuroscientist* (Vol. 13, Issue 3, pp. 268–279). https://doi.org/10.1177/1073858406298918

Mardinly, A. R., Oldenburg, I. A., Pégard, N. C., Sridharan, S., Lyall, E. H., Chesnov, K., Brohawn, S. G., Waller, L., & Adesnik, H. (2018). Precise multimodal optical control of neural ensemble activity. *Nature Neuroscience*, *21*(6), 881–893. https://doi.org/10.1038/S41593-018-0139-8

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., & Isbrandt, D. (2015a). Treatment during a vulnerable developmental period rescues a genetic epilepsy. *Nature Medicine*, *21*(12), 1436–1444. https://doi.org/10.1038/nm.3987

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., & Isbrandt, D. (2015b). Treatment during a vulnerable developmental period rescues a genetic epilepsy. *Nature Medicine*, *21*(12), 1436–1444. https://doi.org/10.1038/NM.3987

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2025.04.26.650764; this version posted April 27, 2025. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

Mennerick, S., & Zorumski, C. F. (2000). Introduction Neural Activity and Survival in the Developing Nervous System. In *Molecular Neurobiology* (Vol. 41).

Mohns, E. J., & Blumberg, M. S. (2008). Synchronous bursts of neuronal activity in the developing hippocampus: Modulation by active sleep and association with emerging gamma and theta rhythms. *Journal of Neuroscience*, *28*(40), 10134–10144. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1967-08.2008

Mohns, E. J., & Blumberg, M. S. (2010). Neocortical activation of the hippocampus during sleep in infant rats. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *30*(9), 3438–3449. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4832-09.2010

Murata, Y., & Colonnese, M. T. (2020). GABAergic interneurons excite neonatal hippocampus in vivo. *Science Advances*, *6*(24). https://doi.org/10.1126/SCIADV.ABA1430

Nomura, T. (2021). Interneuron Dysfunction and Inhibitory Deficits in Autism and Fragile X Syndrome. *Cells*, *10*(10). https://doi.org/10.3390/CELLS10102610

Penn, A. A., Riquelme, P. A., Feller, M. B., & Shatz, C. J. (1998). Competition in retinogeniculate patterning driven by spontaneous activity. *Science (New York, N.Y.)*, *279*(5359), 2108–2112. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.279.5359.2108

Rivera, C., Voipio, J., Payne, J. A., Ruusuvuori, E., Lahtinen, H., Lamsa, K., Pirvola, U., Saarma, M., & Kaila, K. (1999). The K+/Cl- co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature*, *397*(6716), 251–255. https://doi.org/10.1038/16697

Royer, S., Zemelman, B. V., Barbic, M., Losonczy, A., Buzsáki, G., & Magee, J. C. (2010). Multi-array silicon probes with integrated optical fibers: light-assisted perturbation and recording of local neural circuits in the behaving animal. *The European Journal of Neuroscience*, *31*(12), 2279–2291. https://doi.org/10.1111/J.1460-9568.2010.07250.X

Royer, S., Zemelman, B. V., Losonczy, A., Kim, J., Chance, F., Magee, J. C., & Buzsáki, G. (2012). Control of timing, rate and bursts of hippocampal place cells by dendritic and somatic inhibition. *Nature Neuroscience*, *15*(5), 769–775. https://doi.org/10.1038/NN.3077

Rubenstein, J. L. R., & Merzenich, M. M. (2003). Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems. *Genes, Brain and Behavior*, *2*(5), 255–267. https://doi.org/10.1034/J.1601-183X.2003.00037.X

Sato, S. S., Artoni, P., Landi, S., Cozzolino, O., Parra, R., Pracucci, E., Trovato, F., Szczurkowska, J., Luin, S., Arosio, D., Beltram, F., Cancedda, L., Kaila, K., & Ratto, G. M. (2017). Simultaneous two-photon imaging of intracellular chloride concentration and pH in mouse pyramidal neurons in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(41), E8770–E8779. https://doi.org/10.1073/PNAS.1702861114/SUPPL_FILE/PNAS.201702861SI.PDF

Schlessinger, A. R., Cowan, W. M., & Swanson, L. W. (1978). The time of origin of neurons in Ammon's horn and the associated retrohippocampal fields. *Anatomy and Embryology*, *154*(2), 153–173. https://doi.org/10.1007/BF00304660

Siegle, J. H., Ledochowitsch, P., Jia, X., Millman, D. J., Ocker, G. K., Caldejon, S., Casal, L., Cho, A., Denman, D. J., Durand, S., Groblewski, P. A., Heller, G., Kato, I., Kivikas, S., Lecoq, J., Nayan, C., Ngo, K., Nicovich, P. R., North, K., … de Vries, S. E. J. (2021). Reconciling functional differences in populations of neurons recorded with two-photon imaging and electrophysiology. *ELife*, *10*. https://doi.org/10.7554/eLife.69068

Sipilä, S. T., Huttu, K., Soltesz, I., Voipio, J., & Kaila, K. (2005). Depolarizing GABA acts on intrinsically bursting pyramidal neurons to drive giant depolarizing potentials in the immature hippocampus. *Journal of Neuroscience*, *25*(22), 5280–5289. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0378-05.2005

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2025.04.26.650764; this version posted April 27, 2025. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

Sokoloff, G., Dooley, J. C., Glanz, R. M., Wen, R. Y., Hickerson, M. M., Evans, L. G., Laughlin, H. M., Apfelbaum, K. S., & Blumberg, M. S. (2021). Twitches emerge postnatally during quiet sleep in human infants and are synchronized with sleep spindles. *Current Biology*, *31*(15), 3426-3432.e4. https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.05.038

Spitzer, N. C. (2006). Electrical activity in early neuronal development. In *Nature* (Vol. 444, Issue 7120, pp. 707–712). Nature Publishing Group. https://doi.org/10.1038/nature05300

Tempio, A., Boulksibat, A., Bardoni, B., & Delhaye, S. (2023). Fragile X Syndrome as an interneuronopathy: a lesson for future studies and treatments. *Frontiers in Neuroscience*, *17*, 1171895. https://doi.org/10.3389/fnins.2023.1171895

Tosetti, P., Bakels, R., Colin-Le Brun, I., Ferrand, N., Gaiarsa, J. L., & Caillard, O. (2004). Acute desensitization of presynaptic GABAB-mediated inhibition and induction of epileptiform discharges in the neonatal rat hippocampus. *European Journal of Neuroscience*, *19*(12), 3227–3234. https://doi.org/10.1111/j.0953-816X.2004.03413.x

Tosetti, P., Ferrand, N., Colin-Le Brun, I., & Gaïarsa, J. L. (2005). Epileptiform activity triggers long-term plasticity of GABAB receptor signalling in the developing rat hippocampus. *Journal of Physiology*, *568*(3), 951–966. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.094631

Tricoire, L., Pelkey, K. A., Erkkila, B. E., Jeffries, B. W., Yuan, X., & McBain, C. J. (2011). A blueprint for the spatiotemporal origins of mouse hippocampal interneuron diversity. *Journal of Neuroscience*, *31*(30), 10948–10970. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0323-11.2011

Tyzio, R., Represa, A., Jorquera, I., Ben-Ari, Y., Gozlan, H., & Aniksztejn, L. (1999). The establishment of GABAergic and glutamatergic synapses on CA1 pyramidal neurons is sequential and correlates with the development of the apical dendrite. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *19*(23), 10372–10382. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-23-10372.1999

Valeeva, G., Abdullin, A., Tyzio, R., Skorinkin, A., Nikolski, E., Ben-Ari, Y., & Khazipov, R. (2010). Temporal coding at the immature depolarizing gabaergic synapse. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *4*(JUL). https://doi.org/10.3389/fncel.2010.00017

Valeeva, G., Janackova, S., Nasretdinov, A., Rychkova, V., Makarov, R., Holmes, G. L., Khazipov, R., & Lenck-Santini, P. P. (2019). Emergence of Coordinated Activity in the Developing Entorhinal-Hippocampal Network. *Cerebral Cortex (New York, N.Y. : 1991)*, *29*(2), 906–920. https://doi.org/10.1093/CERCOR/BHY309

Valeeva, G., Tressard, T., Mukhtarov, M., Baude, A., & Khazipov, R. (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), 5961–5973. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3482-15.2016

Vogelstein, J. T., Packer, A. M., Machado, T. A., Sippy, T., Babadi, B., Yuste, R., & Paninski, L. (2010). Fast nonnegative deconvolution for spike train inference from population calcium imaging. *Journal of Neurophysiology*, *104*(6), 3691–3704. https://doi.org/10.1152/jn.01073.2009

Walantus, W., Castaneda, D., Elias, L., & Kriegstein, A. (2007). In Utero Intraventricular Injection and Electroporation of E15 Mouse Embryos. *Journal of Visualized Experiments*, *6*. https://doi.org/10.3791/239-V

Wang, C. L., Zhang, L., Zhou, Y., Zhou, J., Yang, X. J., Duan, S. M., Xiong, Z. Q., & Ding, Y. Q. (2007). Activity-Dependent Development of Callosal Projections in the Somatosensory Cortex. *The Journal of Neuroscience*, *27*(42), 11334. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3380-07.2007

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2025.04.26.650764; this version posted April 27, 2025. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

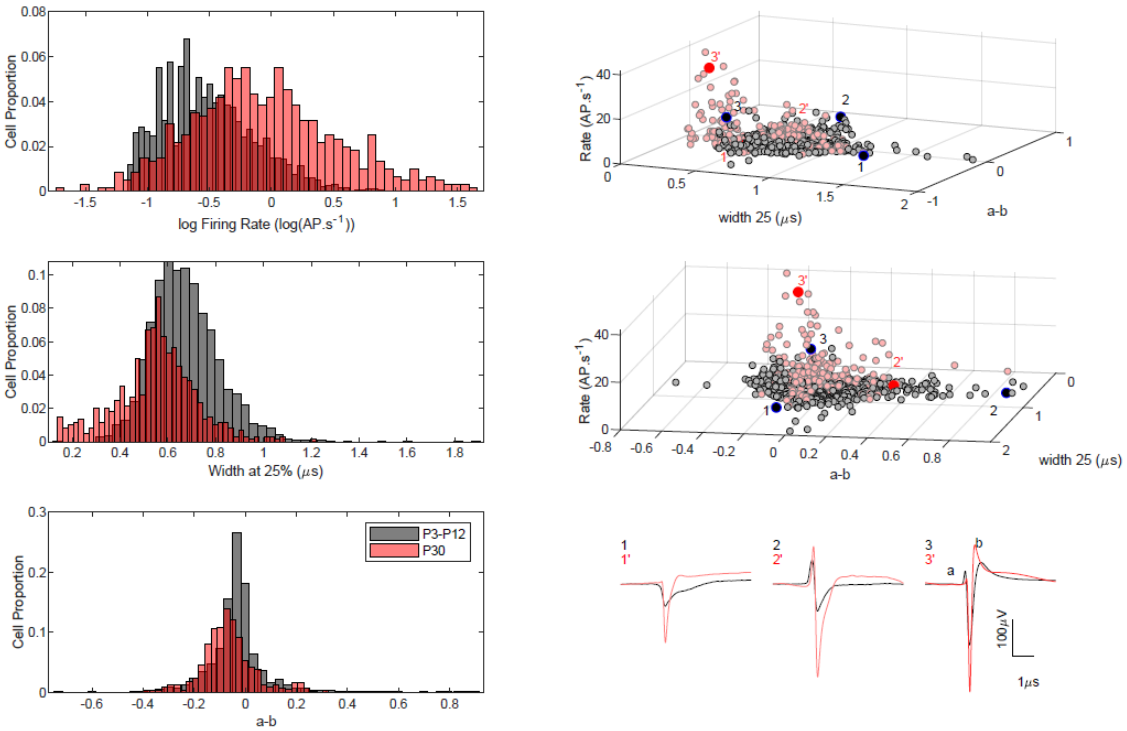
Wei, Z., Lin, B. J., Chen, T. W., Daie, K., Svoboda, K., & Druckmann, S. (2020). A comparison of neuronal population dynamics measured with calcium imaging and electrophysiology. *PLoS Computational Biology*, *16*(9). https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1008198

Wester, J. C., & McBain, C. J. (2016). Interneurons differentially contribute to spontaneous network activity in the developing hippocampus dependent on their embryonic lineage. *Journal of Neuroscience*, *36*(9), 2646–2662. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4000-15.2016

Wong Fong Sang, I. E., Schroer, J., Halbhuber, L., Warm, D., Yang, J. W., Luhmann, H. J., Kilb, W., & Sinning, A. (2021). Optogenetically Controlled Activity Pattern Determines Survival Rate of Developing Neocortical Neurons. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(12). https://doi.org/10.3390/IJMS22126575

Yger, P., Spampinato, G. L. B., Esposito, E., Lefebvre, B., Deny, S., Gardella, C., Stimberg, M., Jetter, F., Zeck, G., Picaud, S., Duebel, J., & Marre, O. (2018). A spike sorting toolbox for up to thousands of electrodes validated with ground truth recordings in vitro and in vivo. *ELife*, *7*. https://doi.org/10.7554/ELIFE.34518

Yu, F. H., Mantegazza, M., Westenbroek, R. E., Robbins, C. A., Kalume, F., Burton, K. A., Spain, W. J., McKnight, G. S., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (2006). Reduced sodium current in GABAergic interneurons in a mouse model of severe myoclonic epilepsy in infancy. *Nature Neuroscience*, *9*(9), 1142–1149. https://doi.org/10.1038/NN1754

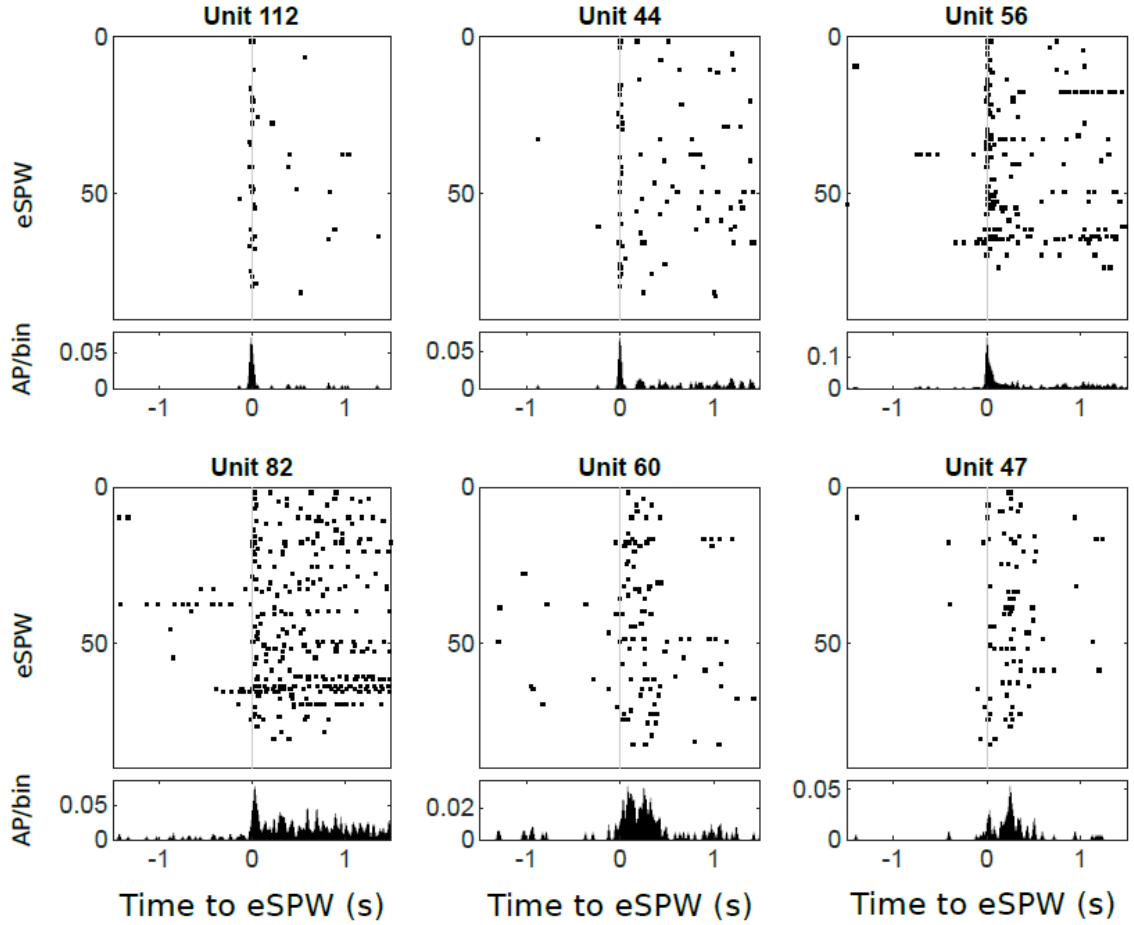


Supplementary Figure 1. Left : histograms representing the proportion if single unit firing properties in immature (P3-P12, grey) vs. juvenile mice (P27-P30, red). Bottom. a and b refer to the pre and post hyperpolarization observed in single units as indicated in the right-side panel. Right: scatterplors of single unit properties recorded in both age groups. Juvenile fast spiking GABAergic cells form of a cluster in the high rate, low width corner. The cluster is absent in neonates. Bottom traces: average

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2025.04.26.650764; this version posted April 27, 2025. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

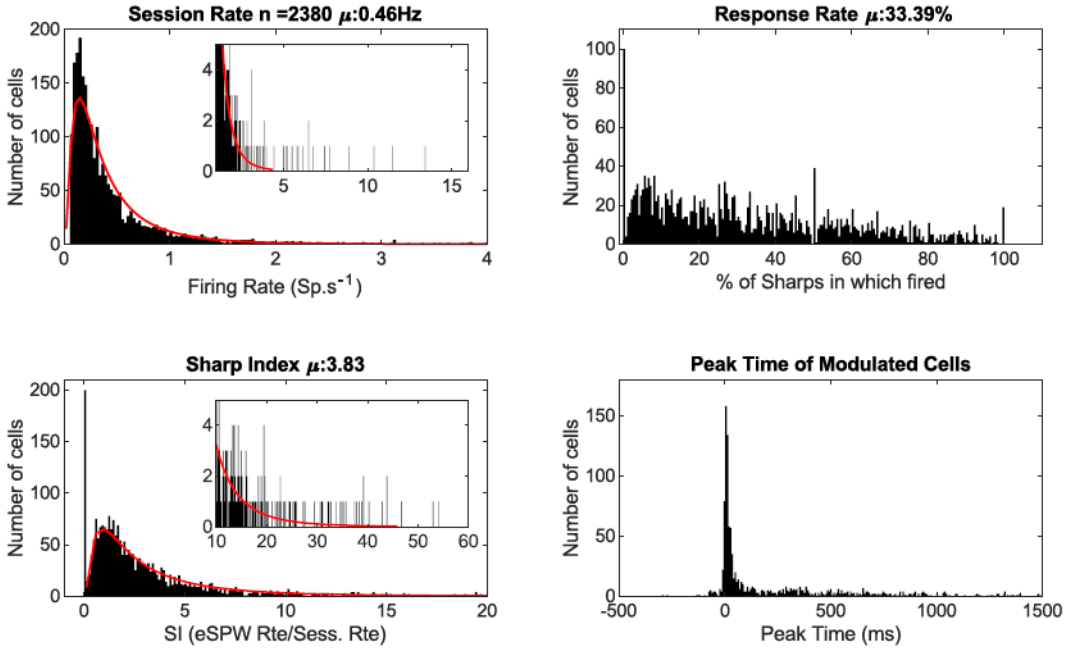
waveforms of cells indicated above in black (neonates) and red (juvenile) for waveforms with a large width (left), waveforms with a prominent biphasic spike (middle -see Someck et al 2023) and typical fast-spiking waveforms (right).

reference: Someck, S., Levi, A., Sloin, H.E. *et al.* Positive and biphasic extracellular waveforms correspond to return currents and axonal spikes. *Commun Biol* **6**, 950 (2023). https://doi.org/10.1038/s42003-023-05328-6

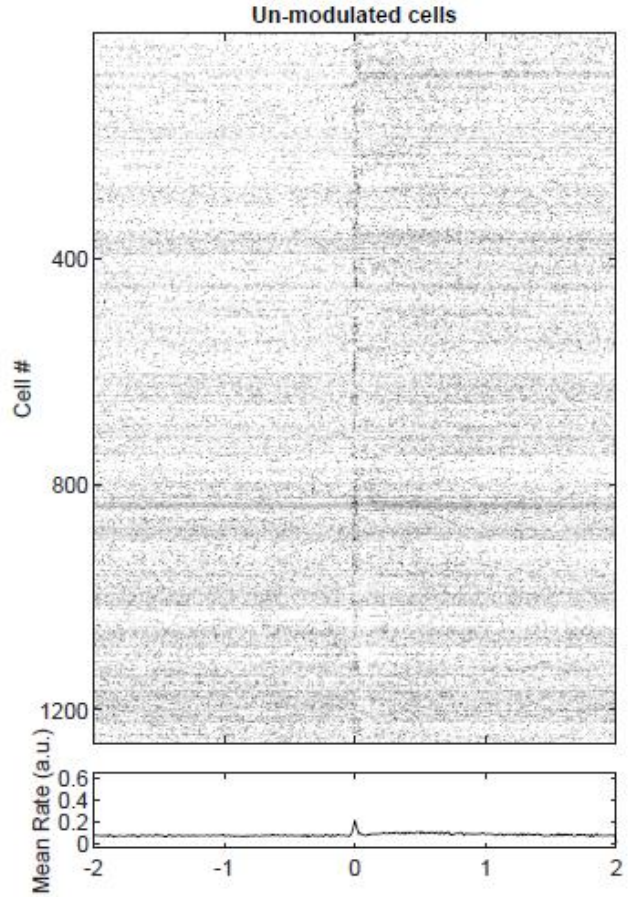


Supplementary Figure 2: Rasters and corresponding histograms of 6 simultaneously recorded cells in a P4 mouse. While there is a variety of cell response types, each cell tend to fire in a stereotypical way following eSPWs.

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2025.04.26.650764; this version posted April 27, 2025. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

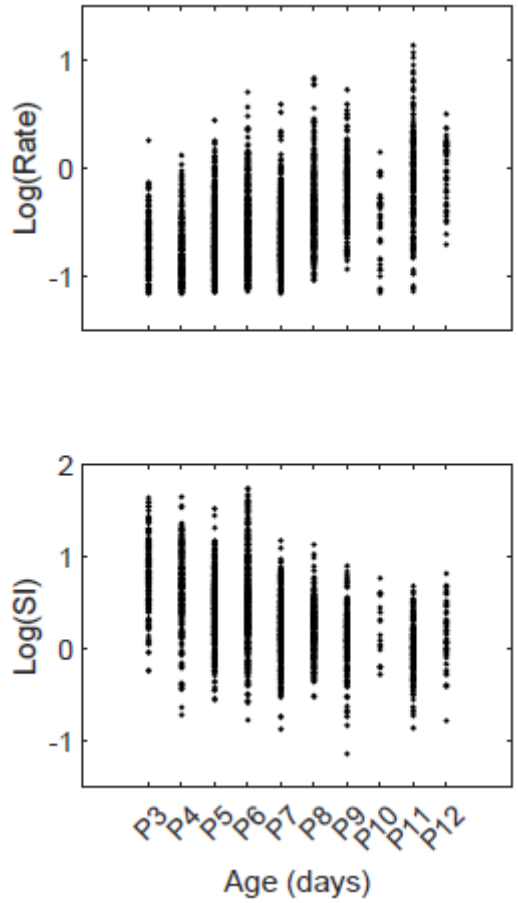


Supplementary Figure 3: Histograms of cell discharge properties



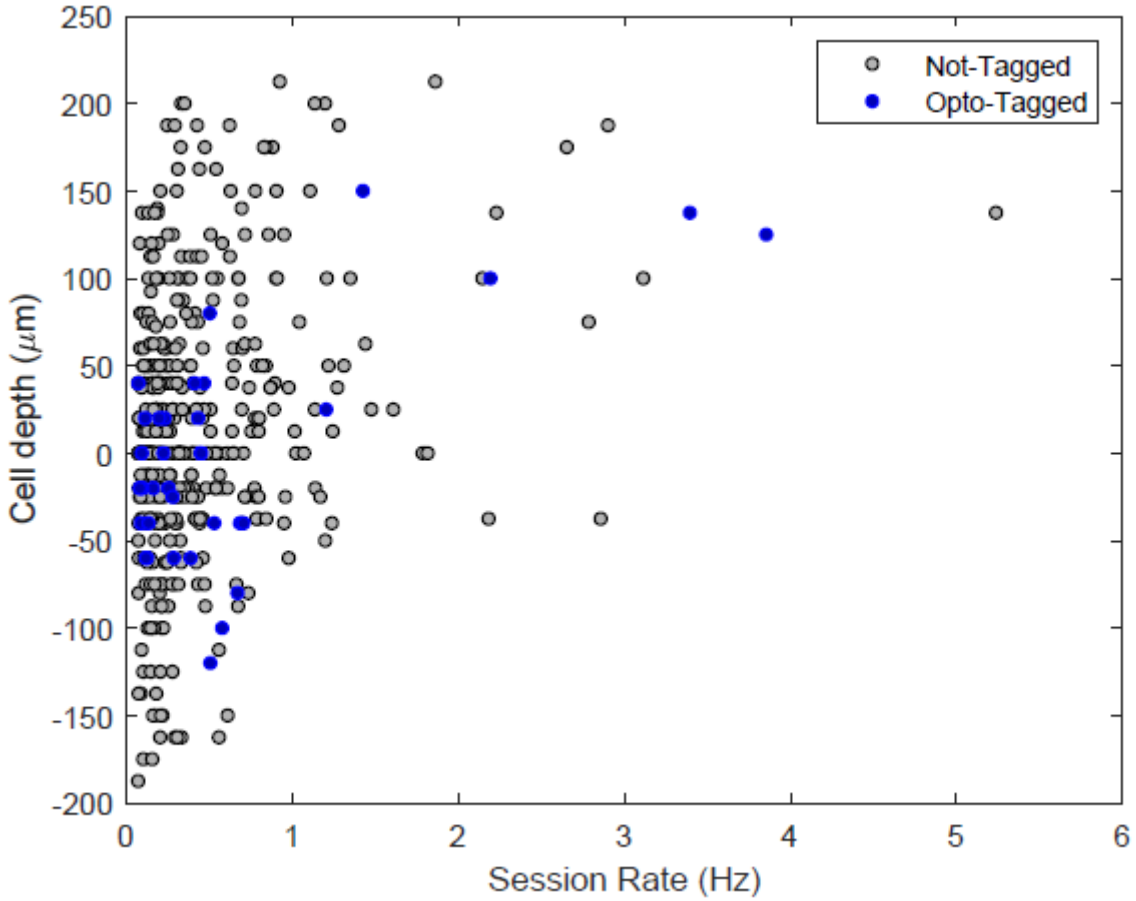
Supplementary Figure 4: PETHs for un-modulated cells. Although cells did not reach significance of a systematic activation during eSPWs, an excess firing is visible for all cells at the time of eSPW trough.

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2025.04.26.650764; this version posted April 27, 2025. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.



Supplementary Figure 5: Relationship between age and session rate or SI (log values) for all recorded cells. Each dot corresponds to a cell.

bioRxiv preprint doi: https://doi.org/10.1101/2025.04.26.650764; this version posted April 27, 2025. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.



Supplementary Figure 6: Session rate vs. localization in the radial axis of opto-tagged and not-tagged neurons. Each dot is a single neuron. Cell localization is estimated from histology, the presence of APs on electrode contacts and the site of inversion of eSPW LFP (zero-value, which is estimated to be on the superficial edge of the pyramidal cell layer).

PARTIE IV

CONCLUSION ET DISCUSSION

''Nos connaissances sont une goutte, notre ignorance un océan.''

Isaac Newton

Pour mieux comprendre la contribution des neurones GABAergiques dans la dynamique de l'activité des réseaux hippocampiques néonataux, j'ai mis en place un protocole d'enregistrement combinant électrophysiologie extracellulaire et optogénétique chez la souris nouveau-née. Ceci nous a permis d'identifier (opto-tagging) et de manipuler l'activité des neurones GABAergiques tout en enregistrant la réponse de la population de CA1 aux eSPWs. Cette méthodologie n'avait encore jamais été réalisée sur des souris postnatales, ce qui permet de discriminer l'activité électrophysiologique des cellules GABAergiques par rapport au reste de la population.

Les résultats que nous avons obtenus peuvent être résumés de la façon suivante :

1) La **stimulation des neurones GABAergiques** induit, dès la 1ere semaine de vie, l'**inhibition** d'une proportion significative des neurones de CA1.

2) Les neurones **GABAergiques sont plus actifs** que le reste de la population et ils participent plus fortement aux eSPWs.

3) Alors que la décharge d'une majorité des neurones de CA1 augmente fortement au moment de la pointe des eSPWs, une partie d'entre eux est **inhibée**. Cette inhibition débute avant les eSPWs et dure ~200ms.

4) L'**hétérogénéité** des réponses neuronales aux eSPWs s'observe de façon **ubiquitaire**. Elle est identique entre les cellules GABAergiques (opto-tagguées) et le reste de la population.

5) Le **nombre de cellules inhibées**, que ce soit par photo-stimulation ou par les eSPWs, **augmente** avec l'âge. Cette augmentation est corrélée avec une diminution de l'effet excitateur des eSPWs sur la population.

Ainsi, ces résultats mettent en évidence un effet global inhibiteur de l'activité GABAergique dans l'hippocampe néonatal in vivo. Ils confirment aussi la présence de connexions synaptiques GABAergiques fonctionnelles dès les premiers jours de vie. L'augmentation rapide de cette inhibition au début de la 2e semaine postnatale refléterait l'état de maturation de la connectivité du réseau ainsi que celle des propriétés intrinsèques des neurones qui le composent. Elle permettrait au réseau hippocampique de passer d'une activité discontinue imposée par la périphérie à un fonctionnement asynchrone propice à l'émergence d'activités auto-générées nécessaires aux fonctions cognitives supérieures.

Dans cette dernière partie du manuscrit, je reviendrai dans un premier temps sur certaines limitations techniques que nous avons rencontrées, liées à la difficulté que représente la réalisation d'enregistrements électrophysiologiques et de la technique d'opto-tagging chez des souris nouveau-nées. Puis, je discuterai des principales découvertes faites, des prochains résultats découlant de ces données et des futures directions de recherche.

I Limitations techniques

La mise au point de ce protocole, n'ayant à ce jour encore jamais été réalisée sur des souris nouveau-nées, a occupé une grande partie de ma thèse. Nous avons exploré différentes approches et rencontré de nombreuses difficultés techniques, que nous avons dû surmonter pour mener à bien nos expériences. Tous ces aspects sont

décrits en détail dans la Partie II ” Mise au point de méthodologies expérimentales aux stades néonataux". Je ne reviendrai donc pas sur ces points dans cette section mais présenterai plutôt les limites de cette méthode.

Tout d’abord, il est important de noter que la technique d’électrophysiologie présente, en elle-même, des difficultés majeures. En effet, les principaux inconvénients de cette technique sont la présence d’interférences électriques (qui peuvent aussi être liées aux mouvements volontaires de l’animal) rendant parfois les enregistrements inexploitables ainsi que l’activité des neurones peut être perdue pendant l’enregistrement en cours. Ce dernier phénomène rend le processus de "spike sorting" particulièrement complexe, une difficulté qui est également accentuée par les caractéristiques de décharge des neurones immatures (faible taux de décharge, potentiels d’action de faible amplitude, etc.). En conséquence le processus de ‘’spike sorting’’ n’a pu être réalisé sur seulement 114 animaux sur 195 enregistrés entre P3 et P12.

Bien qu’ayant une meilleure résolution temporelle que l’imagerie calcique in-vivo, l’électrophysiologie unitaire, qui dépend du ‘’spike sorting’’ présente un biais important : elle ne peut identifier que les neurones les plus actifs. En effet, le ‘’spike sorting’’ repose sur un échantillonnage d’un nombre suffisant de potentiels d’action provenant de la même cellule. Dans le cas contraire, leur ‘’cluster’’ n’est pas assez dense et ne peut donc pas être identifié comme appartenant à un neurone. Ainsi, il manque, dans la population de neurones que j’ai enregistrés, ceux qui déchargent moins de 50 PAs durant l’ensemble de la session (paramètre proposé par les développeurs de Spyking Circus). Il se pourrait bien que de tels neurones constituent une proportion significative de la population néonatale. Comme l’ont observé Tyzio et al. (1999), à P0 les neurones pyramidaux générés le plus tard, n’ont pas encore développé leurs dendrites distales. Il se peut donc, notamment lors des premiers jours de vie, que ces neurones soient trop peu actifs pour être identifiés avec notre méthode. Cependant, si, comme cela a été montré in-vitro par ces auteurs, ces neurones étaient excités par le GABA in-vivo, ils auraient émis, lors des stimulations et les eSPWs, suffisamment de PAs pour être identifiés. Cette limitation ne permet donc pas d’expliquer que l’on n’ait aussi peu de neurones excités par photostimulation des neurones GABAergiques.

S’ajoutant aux difficultés électrophysiologiques, nous avons rencontré des difficultés vis-à-vis de la photostimulation. Parmi les animaux ayant fourni des enregistrements exploitables du point de vue électrophysiologique, seuls 43 présentaient des neurones opto-taggués. Face à ces difficultés et au regard du faible taux de réussite, nous avons cherché à améliorer nos rendements en ajustant notre protocole au fur et à mesure des expériences. Cependant, dans un souci d'efficacité et d'optimisation ainsi que par pression temporelle vis à vis de la fin de mon contrat de thèse, nous avons parfois modifié plusieurs aspects simultanément. Par conséquent, nous n’avons pas pu mener d’étude comparative rigoureuse entre les différents protocoles testés.

Une autre limitation technique rencontrée concerne l’enregistrement des mouvements myocloniques de l’animal. Bien que les souris aient été placées sur des capteurs piézoélectriques pour enregistrer leurs mouvements, seuls ceux des parties du corps en contact direct avec ces capteurs ont pu être détectés. Par conséquent, les contractions musculaires situées sur d’autres pattes ou au niveau de la tête, de la nuque ou de la queue, n’ont pas pu être enregistrées. Cela complique la détermination précise de la proportion d’eSPWs associées à des mouvements spontanés, rendant difficile une évaluation exacte de cette corrélation.

La dernière difficulté que j’aborderai dans cette partie concerne les critères utilisés pour déterminer si un neurone est opto-taggué ou non. Dans nos analyses, nous considérons comme opto-taggués uniquement les neurones générant des PAs dans plus de 10% des stimulations lumineuses. Nous avons donc dû exclure un nombre important de neurones dont la réponse était ambigüe. L’activité de tels neurones apparaît d’ailleurs dans la figure 4 de l’article, sous la forme d’une ligne dans les 10 premières millisecondes suivant la stimulation, pour les cellules non-taguées. Il est fort probable qu’à cause d’une infection trop faible par le vecteur viral, la réponse de certains neurones GABAergiques ne soit pas suffisamment systématique pour qu’ils soient

considérés comme étant opto-taggués. Cette difficulté pour trouver les meilleurs critères pour déterminer si un neurone est opto-taggué ou non est aussi alimentée par le fait que les neurones immatures présentent globalement une activité de décharge très faible. Lorsqu'un neurone décharge au moins deux fois durant les stimulations (lesquelles durent 20 ms), il est légitime de se demander si cela peut réellement être attribué au hasard. D'autres méthodes utilisant des remaniements aléatoires ('shuffles') se sont avérées inefficaces, car trop permissives, pour cette détermination. Par prudence, nous avons donc choisi de ne pas considérer ces cellules peu actives comme étant opto-taggués. En conséquence, il est possible que nous ayons, par ce biais, sous-échantillonné la population de neurones GABAergique.

Dans le même ordre d'idées, ce n'est pas parce qu'un neurone n'a pas répondu aux photo-stimulations qu'il n'est pas GABAergique. Pour des raisons d'efficacité d'infection et d'expression génétique, certains neurones GABAergiques peuvent ne pas avoir suffisamment d'opsine pour que la stimulation induise une réponse neuronale. Ainsi, parmi la population non-tagguée, il y a de fortes chances que se trouvent, en plus des neurones glutamatergiques, des neurones GABAergiques. Il est donc possible que les différences de propriétés de décharge entre cellules GABAergiques et le reste de la population soient encore plus contrastées que ce que nous avons rapporté. L'utilisation de lignées transgéniques exprimant la Cre sous promoteur spécifique aux cellules glutamatergiques (Emx-Cre) permettrait de clarifier ce point.

Enfin, nous l'avons vu dans l'introduction, la population des neurones GABAergiques est très hétérogène du point de vue physiologique, morphologique ainsi que par leur connectivité. Il est donc fort probable que cette hétérogénéité influence la réponse de chaque classe d'interneurones vis à vis des eSPWs ou de la stimulation. De plus, certaines classes de cellules GABAergiques, comme les interneurones CCK, semblent avoir un impact plus important sur le réseau que d'autres. L'utilisation de souris GAD-Cre ne permet évidemment pas de spécifier l'influence de ces différentes classes sur la dynamique du réseau. Des expériences futures, utilisant des constructions transgéniques plus spécifiques à chacun de ces sous-types d'interneurones pourraient cependant fournir des informations pertinentes concernant l'influence qu'ils exercent sur la dynamique des réseaux immatures.

II Discussion et perspectives futures

Dans cette partie, je discuterai des caractéristiques de l'activité neuronale immature ainsi que de l'évolution des différents motifs d'activité en lien étroit avec l'émergence de l'inhibition GABAergique et avec la maturation de la connectivité péri-somatique locale de la région de CA1. Nous verrons ensuite les perspectives futures découlant de mes travaux visant à étudier le rôle de l'activité précoce sur la maturation du réseau hippocampique ainsi que leur description dans le cas de pathologies neurodéveloppementales.

A- ACTIVITE INHIBITRICE LORS DES ESPWS DES LES PREMIERS JOURS POSTNATAUX

Origine cellulaire locale de l'inhibition

Bien que la plupart des neurones de CA1 augmentent leur fréquence de décharge pendant les eSPWs, nous montrons que 5 % d'entre eux sont inhibés pendant ces événements. En parallèle, entre P3 et P7, la photo-stimulation des neurones GABAergiques induit une inhibition d'environ 20% des neurones. Bien que cela ne concerne qu'une minorité de neurones, la présence d'inhibition à des stades aussi précoces suggère qu'il existe déjà des connexions synaptiques inhibitrices fonctionnelles au sein de la région de CA1. En effet, dès P0, selon Tyzio et al. (1999), les premières connexions synaptiques observées sur les cellules pyramidales les plus immatures sont GABAergiques. Ces connexions sont principalement localisées dans le stratum radiatum et le stratum oriens mais pas dans le stratum pyramidale (Dupuy & Houser, 1996 ; Tyzio et al., 1999). Une interprétation serait que l'inhibition GABAergique néonatale dans CA1 impliquerait d'abord des interneurones à projection dendritique et non péri-somatique. Une classe candidate d'interneurones pourrait être les neurones NGFs, dont le corps cellulaire et les arborisations dendritiques et axonales se trouvent dans la SLM. Ces neurones reçoivent des connexions du cortex entorhinal (via la voie temporo-ammonique), de CA3 (via les collatérales de schaffer), mais aussi du thalamus et des cellules Cajal-retzius. Notons que la zone d'influence des NGFs se trouve là où les principaux courants associés aux eSPWs sont observés. Chez l'adulte, les NGFs ont une décharge retardée et, dans l'hippocampe, elles peuvent décharger de façon persistante, pendant plusieurs secondes après stimulation (Sheffield et al., 2013). Les boutons synaptiques des terminales axoniques des NGFs sont localisés de façon diffuse, certains n'ayant pas de cible synaptique spécifique, permettant au GABA libéré d'atteindre des récepteurs extra-synaptiques par conduction volumique. L'activation des NGFs induit donc un courant lent et faible, via l'activation des récepteurs GABAA et GABAB. Le caractère lent de cette réponse à l'activation des NGFs est d'ailleurs en accord avec l'inhibition prolongée que nous observons après photostimulation. Il reste à déterminer si cette inhibition implique les récepteurs GABAA comme les récepteurs GABAB. Dans le cadre d'un rôle du GABA dans la mise en place et la maturation des réseaux immatures, l'ensemble des propriétés des NGFs fait de cette classe d'interneurones un acteur potentiel majeur. Cependant, les propriétés physiologiques et anatomiques des NGFs dans le cerveau en développement sont mal connues. Ce rôle reste donc à préciser.

Une autre possibilité pour expliquer l'apparition tardive de l'innervation péri-somatique serait qu'avant la première semaine, les futurs interneurones à projection péri-somatique soient bien présents et fonctionnels mais qu'ils n'aient pas encore eu le temps de connecter les corps cellulaires des cellules pyramidales. Cette hypothèse est soutenue par les observations en microscopie électronique de Morozov et Freund (2003) qui montrent que les interneurones exprimant la CCK ne forment ce type de connexion qu'à partir de P8 chez le rat. Avant cet âge, les connexions sont concentrées dans le stratum radiatum. Pour les interneurones à PV, un scénario identique est observé (Dard et al., 2022). Les mécanismes responsables d'un tel changement de cible synaptique au cours du développement restent à préciser.

Ces deux dernières hypothèses, c'est-à-dire une action dendritique majeure des NGFs couplée à une action dendritique des futurs interneurones péri-somatiques, ne sont pas exclusives. Il est fort probable que l'inhibition précoce que nous observons provienne de ces deux groupes d'interneurones. Quoi qu'il en soit, l'innervation GABAergique dendritique semble jouer un rôle central au cours de la première semaine de vie. Etant donné le rôle du GABA (via GABAA et GABAB) dans la modulation des processus d'axo- et dendrito- genèse lors du développement, il est donc possible d'envisager que la libération de GABAergique induite par les eSPWs

induise une cascade d'événements post-synaptiques (via les protéines G et/ou le calcium intracellulaire) responsable de la croissance dendritique des neurones pyramidaux.

Origine extra-hippocampique de l'inhibition

Cependant, l'observation des PETHs associés aux eSPWS montre que l'inhibition induite par ces événements commence environ 100 ms avant le pic de la *sharp* et se prolonge pendant ~200 ms. Il est possible que cette inhibition résulterait d'une entrée inhibitrice de type *feed-forward* provenant soit de structures extra-hippocampiques soit d'une catégorie d'interneurones locaux recevant une innervation différente du reste de la population de CA1. Chez l'adulte, le septum médian établit principalement des connexions (GABAergiques, glutamatergiques et cholinergiques) avec les neurones GABAergiques de CA1, notamment avec ceux exprimant la PV. Les afférences en provenance de cette structure sont observables dès la fin de la période embryonnaire (Super et Soriano, 1994 ; Freund et Antal, 1988 ; Sun et al., 2014). Comme le EC ou le VMT (Valeeva et al. 2019 ; Leprince et al. 2022), le septum pourrait donc également influencer la dynamique du réseau de CA1 immature lors des eSPWs. Par conséquent, nous pouvons émettre l'hypothèse que les neurones inhibés au début des eSPWs sont des neurones GABAergiques (probablement des PVBC) recevant des afférences GABAergiques inhibitrices provenant du septum. Il existe aussi des neurones GABAergiques à longue projection, résidant dans la formation hippocampique et le EC qui pourraient aussi être responsables de cette inhibition.

Etat de maturation des cibles pyramidales et GABAergiques

Toutefois, la formation de connexions synaptiques GABAergiques fonctionnelles ne suffit pas pour établir que l'inhibition observée lors des eSPWs résulte d'une activité GABAergique. En effet, à ces stades précoces du développement, l'effet du GABA sur les réseaux neuronaux reste un sujet très controversé. Durant les deux premières semaines postnatales, le GABA aurait un effet dépolarisant en raison de l'immaturité des propriétés intrinsèques des neurones. Au cours du développement, on assiste à un changement de polarité de l'action du GABA suite à l'augmentation de l'expression du co-transporteur KCC2 favorisant la transition du GABA d'un effet excitateur à un effet inhibiteur (Rivera et al., 1999). Cependant, à un âge donné, toutes les cellules ne se trouvent pas au même stade de maturation étant donné que la neurogenèse des neurones s'étend sur plusieurs jours. On peut donc envisager que le GABA pourrait avoir un effet excitateur sur certains neurones et inhibiteur sur d'autres en fonction de leur stade de maturation à un âge donné. Par conséquent, l'impact du GABA sera probablement différent selon qu'il s'agisse d'un neurone généré précocement ou plus tardivement, ces cellules ayant probablement une expression différente des transporteurs du Cl- à un temps donné. Ainsi, l'inhibition observée lors des eSPWs pourrait résulter d'une activité GABAergique inhibitrice, à condition que ces neurones aient atteint un degré de maturité suffisant pour que le GABA exerce un effet hyperpolarisant sur eux. On peut alors s'interroger sur la possibilité que le GABA exerce un effet hyperpolarisant sur certains neurones dès les premiers jours de vie.

Augmentation de l'inhibition lors de la 2e semaine postnatale

La proportion de neurones inhibés lors des eSPWs augmente avec l'âge, tandis que la proportion de neurones qui augmentent leur taux de décharge lors des eSPWs diminue (**Figure IV.2**). En parallèle, la proportion de neurones inhibés suite à la photostimulation des neurones GABAergiques augmente rapidement à P8 et atteint même 100% à P10. Dans l'ensemble, ces résultats sont en accord avec une étude récente de Dard et al. (2022), qui a montré une augmentation rapide de l'inhibition induite par le mouvement au cours de la deuxième semaine postnatale (Dard et al., 2022). Cette augmentation abrupte corrèle avec l'émergence de l'inhibition

péri-somatique des neurones GABAergiques exprimant la parvalbumine sur les cellules pyramidales (Marty et al., 2002 ; Tyzio et al., 1999). Nous l'avons vu plus haut, ce développement de l'innervation péri-somatique pourrait s'expliquer par une modification de la cible des cellules CCK ou PV, passant de dendritique à somatique. L'inhibition péri-somatique étant plus efficace pour inhiber la décharge neuronale, nous pouvons l'observer plus clairement sous la forme d'une disparition des potentiels d'action. En parallèle, cette augmentation de l'inhibition pourrait aussi être attribuée à une modification des concentrations de [Cl]i (chlore intracellulaire), grâce à l'augmentation des co-transporteurs KCC2. Bien qu'il soit possible de mettre en doute l'effet excitateur du GABA immature, son effet dépolarisant, au moins pour certaines valeurs du potentiel de repos, est bien présent. La diminution progressive de [Cl]i grâce à l'expression de KCC2 reste une explication valide de l'augmentation de l'inhibition.

B- INHIBITION GABAERGIQUE (ET NON INHIBITION) DANS L'HIPPOCAMPE IMMATURE

La présence de preuves d'inhibition lors de la première semaine de vie, couplée à la très faible réponse excitatrice induite par la stimulation des neurones GABAergiques, suggère que l'effet global de l'activation de ces neurones est inhibiteur et non excitateur comme cela est suggéré par les données in-vitro. Dans l'ensemble, ces résultats sont en accord avec les études précédentes (Kirmse et al., 2015 ; Valeeva et al., 2016) qui ont montré que l'effet de la dépolarisation médiée par le GABA est principalement inférieur au seuil d'activation des neurones et que l'effet net de l'activité GABAergique est inhibiteur in vivo. Cependant, ils sont en contradiction avec les résultats récents de Murata et Colonnese (Murata et Colonnese, 2020) qui suggèrent qu'à P3, les neurones GABAergiques de l'hippocampe mais pas néocorticaux excitent les cellules pyramidales immatures. En effet, nous ne rapportons pas l'observation d'effet excitateur du GABA. Dans notre étude, moins de 1% des neurones enregistrés déchargent avec un long délai (15-25 ms) après le début de la photostimulation. Bien que ces neurones (tous enregistrés avant P8) aient pu être excités par la transmission GABAergique, leurs délais de réponse étaient plutôt courts par rapport à ce qui est observé in vitro (~40ms), sous des concentrations physiologiques de Cl- intracellulaire immature (Valeeva et al., 2010). De plus, la faible proportion de ces cellules suggère que, même au cours de la première semaine postnatale, l'action excitatrice du GABA dans l'hippocampe est négligeable par rapport à son effet inhibiteur massif sur le réseau. Il reste néanmoins possible que l'activité GABAergique ait un impact plus subtil, en dessous du seuil, sur l'activité neuronale.

Au moment de la rédaction de ce manuscrit, nous effectuons les dernières analyses de notre papier visant à préciser l'impact de l'activation des neurones GABAergiques sur les réseaux immatures au cours de la première semaine de vie. Ces analyses sont faites à partir des enregistrements réalisés avec le système d'induction de la photostimulation par détection des eSPWs. L'activation des neurones GABAergiques à un moment où l'activité neuronale est intense, comme lors des eSPWs, devrait nous permettre d'évaluer plus efficacement si leur activité entraîne une inhibition des neurones. Les données préliminaires que nous avons obtenues montrent que l'activation des neurones GABAergiques semble induire une inhibition de l'activité neuronale de CA1 (**Figure IV.1**), ce qui va dans le sens de nos observations précédentes. Ces résultats nous permettront de déterminer si, comme pour les GDPs in vitro, les neurones GABAergiques pourraient être impliqués dans la synchronisation des réseaux immatures in vivo. Il aurait été intéressant de compléter ces analyses, cette fois-ci en inhibant plutôt qu'en excitant les neurones GABAergiques lors des eSPWs. Dans ce cas, nous devrions observer une augmentation de l'activité neuronale.

Ainsi, nos résultats mettent en évidence que le GABA a un effet inhibiteur sur le réseau hippocampique immature. L'augmentation abrupte de la proportion de neurones inhibés par le GABA au début de la 2e semaine de vie serait liée à la maturation de la connectivité locale et corrèle également avec l'émergence de l'inhibition péri-somatique. Elle serait peut-être aussi liée à une levée d'excitation sous-liminaire des cellules cibles, causée par le changement de [Cl]i induit par l'apparition de KCC2. De plus, il est intéressant de noter que l'augmentation de la proportion de neurones inhibés par la stimulation des neurones GABAergiques, ainsi que celle liée aux eSPWs est corrélée avec la diminution de l'effet excitateur des eSPWs sur le réseau. Je propose que l'émergence de l'inhibition GABAergique, combinée à celle de la connectivité des neurones GABAergiques, pourrait expliquer l'hétérogénéité des réponses neuronales associées aux eSPWs.

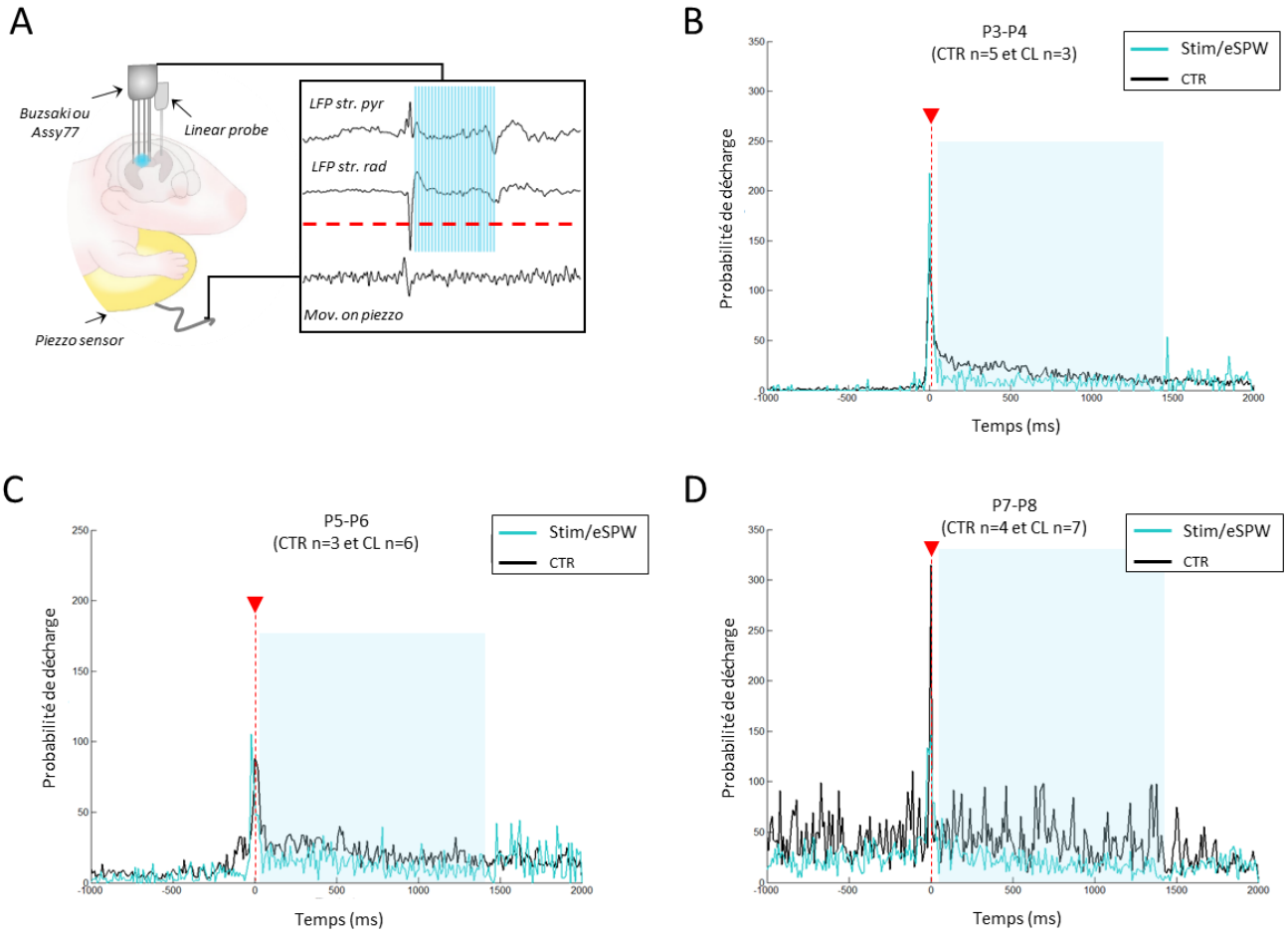


Figure IV.1 : Données préliminaires de l'activation des neurones GABAergiques lors des eSPWs

A. Représentation schématique du principe du système d'induction de la photostimulation par détection des eSPWs (Stim/eSPW). Lorsque le signal dépasse le seuil (ligne en pointillés rouges) à la suite de la présence d'une eSPW (triangle rouge), un signal est transmis à un code Python qui permet de déclencher un train de stimulations lumineuses (traits bleus). **B-D.** Activité neuronale de CA1 lors des eSPWs (condition contrôle représentée en noir) et lors des eSPWs couplés à une stimulation lumineuse (condition Stim/eSPW représentée en bleu). Le rectangle bleu représente la stimulation lumineuse induite suite à la détection d'une eSPW dans les conditions Stim/eSPW. Notons que, pour tous les âges, l'activation des neurones GABAergiques pendant les eSPWs semble entraîner une diminution de la fréquence de décharge de la population neuronale.

C- ACTIVITE GABAERGIQUE A L'ORIGINE D'UNE HETEROGEINITE D'ACTIVITE LORS DES ESPWS

Nos résultats mettent en évidence une hétérogénéité de patrons de décharge des cellules lors des eSPWs. En effet, les neurones de CA1 ne sont pas tous modulés de la même manière durant ces événements et adoptent des motifs d'activité différents. Parmi ceux qui augmentent leur taux de décharge pendant les eSPWs, certains le font uniquement durant les 100 premières millisecondes de ces événements, lors de la composante ''Sharp'', tandis que d'autres continuent de décharger massivement pendant plusieurs centaines de millisecondes dans la composante ''Tail''. Notons aussi que ces motifs sont systématiques, c'est-à-dire qu'un neurone donné décharge de façon identique pour toutes les eSPWs. Cela suggère que ce qui régit la réponse d'un neurone vis-à-vis des eSPWs à un âge donné est fixe. Or, nous constatons que la proportion de ces différents patrons d'activité évolue avec l'âge (**Figure IV.2**). En effet, durant la première semaine de vie, la grande majorité des neurones augmente leur fréquence de décharge lors des eSPWs. Or, à P3-P4, la majorité de ces neurones (~75%) déchargent principalement pendant la composante ''Sharp''. Plus tard, cette proportion diminue. A P7 où le patron de décharge le plus représenté devient celui de type ''Tail'' (~75% des cellules excitées). Durant la deuxième semaine de vie, vers P9, la proportion de cellules excitées lors des eSPWs diminue fortement, tandis que celle des cellules inhibées augmente. Je propose que la diversité des motifs d'activité pourrait s'expliquer par une différence de maturation des neurones et de leur niveau d'intégration au sein du réseau.

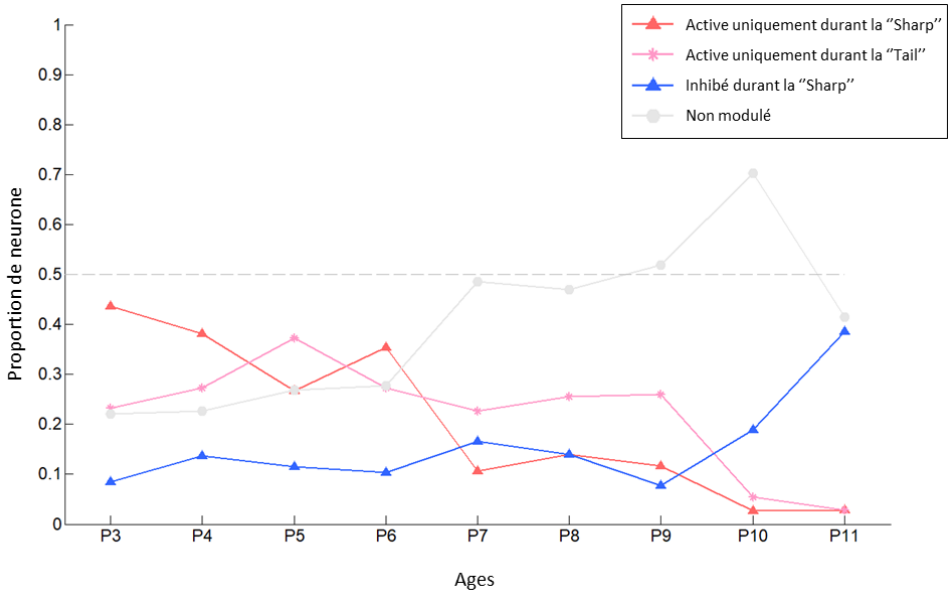


Figure IV.2 : Evolution de la proportion de neurones excités ou inhibés pendant les différentes composantes des eSPWs

Pour chaque âge est représentée la proportion de neurones significativement excités uniquement dans la composante ''Sharp'' (en rouge), significativement excités dans la composante ''Tail'' (en rose), significativement inhibés dans la composante ''Sharp'' (en bleu) et non modulés lors des eSPWs (en gris). Notons que les neurones qui présentent une décharge significative dans la composante ''Tail'' peuvent également être significativement inhibés ou excités dans la composante ''Sharp''.

En effet, nous pouvons envisager que les neurones qui sont immédiatement excités durant les eSPWs (dans la composante ‘’Sharp’’) sont ceux qui reçoivent des connexions directes du EC, principale voie d’entrée excitatrice associée aux eSPWs. Ces projections contactent les dendrites apicales des neurones pyramidaux ainsi que les Cajal-retzuis situés dans la SLM (Super et al. 1998 ; Tyzio et al. 1999 ; Anstotz et al. 2018, 2016) ou les interneurones NGFs. Par ailleurs, dès la naissance, les afférences en provenance du thalamus établissent également des connexions synaptiques excitatrices avec les NGFs de la SLM modulant ainsi leur activité (Leprince et al. 2023). À l'inverse, les neurones inhibés pendant la composante "Sharp" seraient ceux qui reçoivent des afférences GABAergiques plus fortes, discutées plus haut. En contraste avec les neurones de type “sharp”, les neurones de type ‘tail’ semblent indifférents à l’excitation directe de la Sharp. Certains sont même inhibés pendant la sharp. Ils déchargent après la sharp, en association avec les oscillations beta caractéristiques de la composante ‘tail’. Ce détachement de l’influence directe des eSPWs, associé à une activation lors d’oscillations suggère un état de maturation plus important de ces neurones et un degré d’intégration au réseau plus complexe. De plus, certains neurones à double composante sharp et tail montrent une inhibition quelques millisecondes après qu’ils aient déchargé dans la ‘’Sharp’’. Cette inhibition est réminiscente de l’inhibition de type feed-back, et suggère donc l’émergence d’un réseau intra-hippocampique inhibiteur fonctionnel. Ainsi, nous assistons, lors de la deuxième semaine postnatale, à une transition d’une réponse majoritairement immature, directement liée aux activités provenant de la périphérie, vers une réponse plus complexe associée aux oscillations. Ce processus d’indépendance vis-à-vis des activations périphériques (que l’on appellera internalisation) se développe de façon concomitante avec l’augmentation de l’inhibition dans le réseau. Il est donc possible que l’émergence de l’inhibition, particulièrement au niveau péri-somatique, soit nécessaire à ce changement de mode de fonction de l’hippocampe.

Caractéristique de l’activité des neurones GABAergiques durant les eSPWs

Le rôle important des neurones GABAergiques dans la synchronisation de l’activité neuronale lors des eSPWs peut aussi être envisagé étant donné que ces neurones sont actifs durant les eSPWs. Nous avons en effet montré que les neurones GABAergiques immatures (identifiés par optottagging) déchargent à plus haute fréquence, participent à plus d’eSPWs et déchargent plus tôt par rapport aux eSPWs que le reste de la population. Bien que nous ne puissions pas identifier précisément le type de neurone GABAergique enregistré, nos reconstructions LFP/histologiques permettent de nous donner une idée de leur localisation dans les couches de CA1. Ainsi, nous avons pu déterminer que la grande majorité des neurones opto-taggués se situent dans la couche pyramidale et l’orienset sont donc susceptible d’être des neurones GABAergiques exprimant la CCK ou la PV, des neurones O-LMs, des neurones axo-axoniques, des neurones en forme de lierre (Ivy cells) ou encore des neurones bistratifiés (**Figure IV.3**). Toutefois, à partir de la deuxième semaine de vie, l’activité des neurones GABAergiques ne semble plus être positivement modulée par les eSPWs. Ces observations diffèrent de celles faites par Dard et al. qui montrent que l’activité des neurones GABAergiques ne change pas et reste positivement modulée.

Pour tester l’hypothèse concernant le rôle central des neurones GABAergiques sur l'activité neuronale lors des eSPWs, il serait intéressant de pouvoir bloquer l’activation des neurones GABAergiques lors de ces événements afin d'observer l'impact sur l'activité neuronale. On pourrait s'attendre à observer une diminution du nombre de neurones qui décharge dans la ‘’Tail’’ ou une réduction de la durée de la décharge dans la ‘’Tail’’.

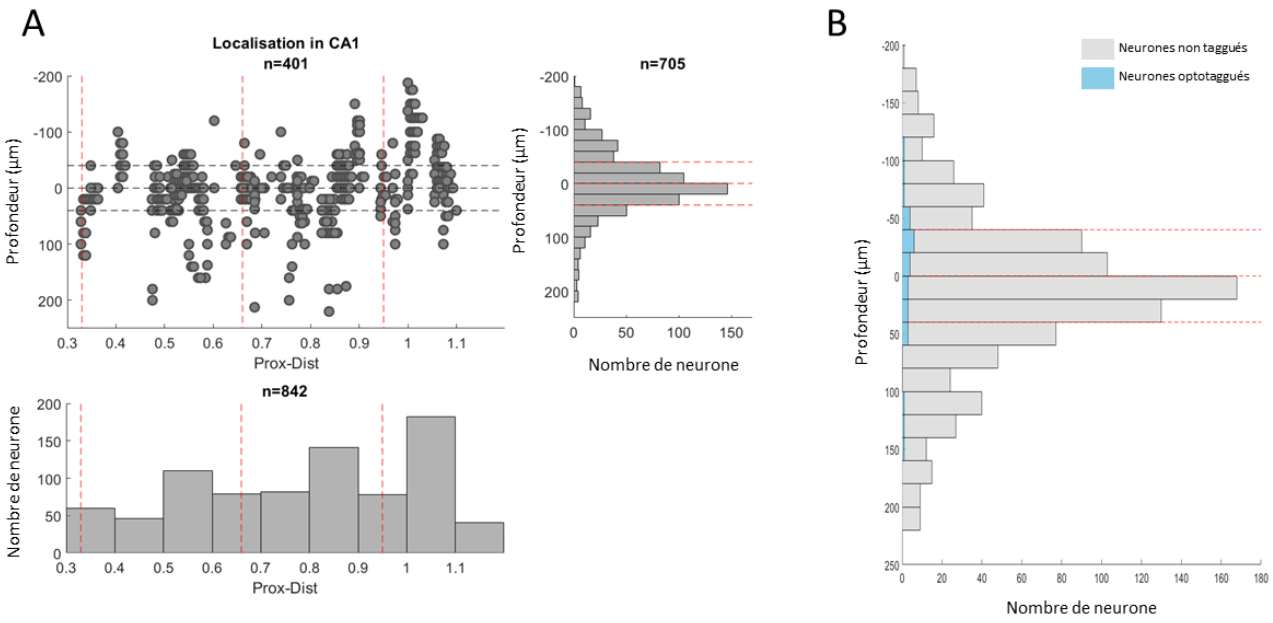


Figure IV.3 : Estimation de la localisation des neurones enregistrés dans la région de CA1

A. Représentation de la localisation des neurones enregistrés dans l'axe radial et proximo-distal de la région CA1 (en haut à gauche). Les pointillés noirs délimitent la couche pyramidale présumée, la valeur 0 µm correspond au site d'inversion, situé au milieu de la couche pyramidale. (En haut à droite) Répartition du nombre de neurones enregistrés en fonction de la profondeur dans CA1. (En bas) Répartition du nombre de neurones enregistrés dans l'axe proximo-distal. **B.** Répartition du nombre de neurones non opto-taggués (en gris) et opto-taggués (en bleu) en fonction de la profondeur dans CA1. Les pointillés noirs délimitent la couche pyramidale présumée.

Lien entre stade de maturation, effet du GABA et patron d'activité

Cependant, comme nous l'avons vu précédemment, il se pourrait que l'effet de la transmission GABAergique puisse varier en fonction des propriétés intrinsèques des neurones. Selon l'état de maturation des neurones pyramidaux, de la densité des co-transporteurs KCC2, les concentrations en ions chlorure et la maturation de leurs dendrites l'impact des neurones GABAergiques pourrait donc varier. La maturité des cellules est un facteur qui pourrait également expliquer l'hétérogénéité de réponse que nous avons observée. En accord avec ce que nous avons dit plus haut concernant le processus d'internalisation, un neurone à un stade avancé de maturation aura tendance à décharger dans la composante ''Tail''. Etant donné son état de maturation, il serait aussi plus facilement inhibé par le GABA, particulièrement lors de la phase Sharp. Pour préciser cette hypothèse, il serait intéressant de comparer l'activité des neurones inhibés par la stimulation des neurones GABAergiques avec celle qui ne le sont pas lors des eSPWs. Les neurones inhibés par le GABA devraient exhiber un patron de décharge de type tail. Cependant, nos données préliminaires n'ont pas été très concluantes (**cf. la partie annexe**).

Âge embryonnaire, localisation anatomique et réponse aux eSPWs

Si, comme je le propose, la dynamique de réponse des cellules pyramidales dépendait de leur état de maturation et leur niveau d'intégration dans le réseau, la date de naissance embryonnaire de ces neurones devrait être un facteur décisif dans cette dynamique. Ainsi, pour un âge donné, les cellules les plus jeunes (générées après E16) devraient avoir une réponse plus directement modulée par la composante 'Sharp' que les

cellules plus anciennes (générées vers E12-E13). A l'inverse, les cellules les plus anciennes auraient une réponse plus tardive par rapport aux eSPWs. Or, il existe dans l'axe proximo-distal, mais aussi dans l'axe radial de la couche pyramidale de CA1, un gradient de maturation des neurones, dépendant de leur âge embryonnaire. Par conséquent, on pourrait s'attendre à observer une différence d'activité entre les neurones en fonction de leur localisation dans ces axes. Les cellules les plus concentrées dans la partie proximale et profonde, étant plus jeunes, devraient décharger préférentiellement avec un patron de type 'sharp' que celles en position distale et superficielle. Bien qu'ayant consacré une grande partie de mes analyses au test de cette hypothèse, mes résultats ne semblent pas la confirmer. La répartition des cellules dans l'axe proximo-distal ou dans l'axe radial n'influencerait pas de façon significative leur réponse aux eSPWs (**cf. la partie annexe**). Cependant, il est possible que l'échantillon de cellules pyramidales que j'utilise pour ces analyses soit biaisé puisqu'il pourrait aussi inclure des cellules GABAergiques n'exprimant pas assez d'opsine pour être optotaguées. Une expérience sur des souris exprimant la Cre sous contrôle d'un promoteur spécifique aux cellules pyramidales, comme Emx, permettrait de préciser ce point.

Résumé : Rôle des neurones GABAergiques dans la maturation fonctionnelle des neurones de CA1.

L'ensemble de nos résultats soutient l'idée que l'activité GABAergique est impliquée dans la modulation de l'activité neuronale de CA1 lors des eSPWs. Cette capacité est étroitement liée à la maturation de l'inhibition péri-somatique et à l'émergence de connectivité récurrente au sein de la région de CA1 mais aussi à l'émergence de l'action inhibitrice du GABA sur les réseaux immatures (**Figure IV.4**). A partir de nos observations, nous proposons le scénario suivant :

1) Durant les premiers jours de vie, les afférences externes à l'hippocampe (EC, thalamus, etc…) établissent des connexions synaptiques excitatrices avec les neurones de CA1. En l'absence d'inhibition, ces neurones vont décharger immédiatement dans la composante ''Sharp'' des eSPWs. Un faible nombre de neurones reçoit des afférences GABAergiques, probablement d'interneurones à projection longue distance présents dans des structures extérieures à CA1. Ceux-ci seront donc inhibés lors des eSPWs. Malgré la rareté des connexions récurrentes excitatrices et inhibitrices à ces âges, il se pourrait que quelques neurones établissent suffisamment de connexions locales pour générer des réponses de type ''Sharp''.

2) Avec l'émergence des connexions synaptiques récurrentes, les neurones qui commencent à être intégrés dans le réseau vont donc acquérir des caractéristiques de réponse mixte. Lors des eSPWs, ils vont décharger d'abord directement à l'excitation des afférences externes puis adopteront un patron d'activité de type ''Tail''. A ce stade, l'activité GABAergique commencerait à jouer un rôle important dans la modulation de l'activité de réseau en exerçant notamment une inhibition ''feed-back'' sur certains neurones.

3) Au début de la deuxième semaine de vie, la connectivité intra-hippocampique se développe. Nous assistons d'une part à l'émergence de l'inhibition péri-somatique des cellules pyramidales par les interneurones CCK et PV et, d'autre part à la disparition de l'effet dépolarisant du GABA en faveur d'une forte inhibition. En conséquence, l'impact excitateur des eSPWs sur le réseau diminue tandis que la proportion des cellules inhibées par ces événements augmente. Le réseau hippocampique passe alors d'une activité discontinue imposée par la périphérie et favorable à la croissance des réseaux, à un fonctionnement asynchrone propice à l'émergence d'activités auto-générées nécessaires aux fonctions cognitives supérieures.

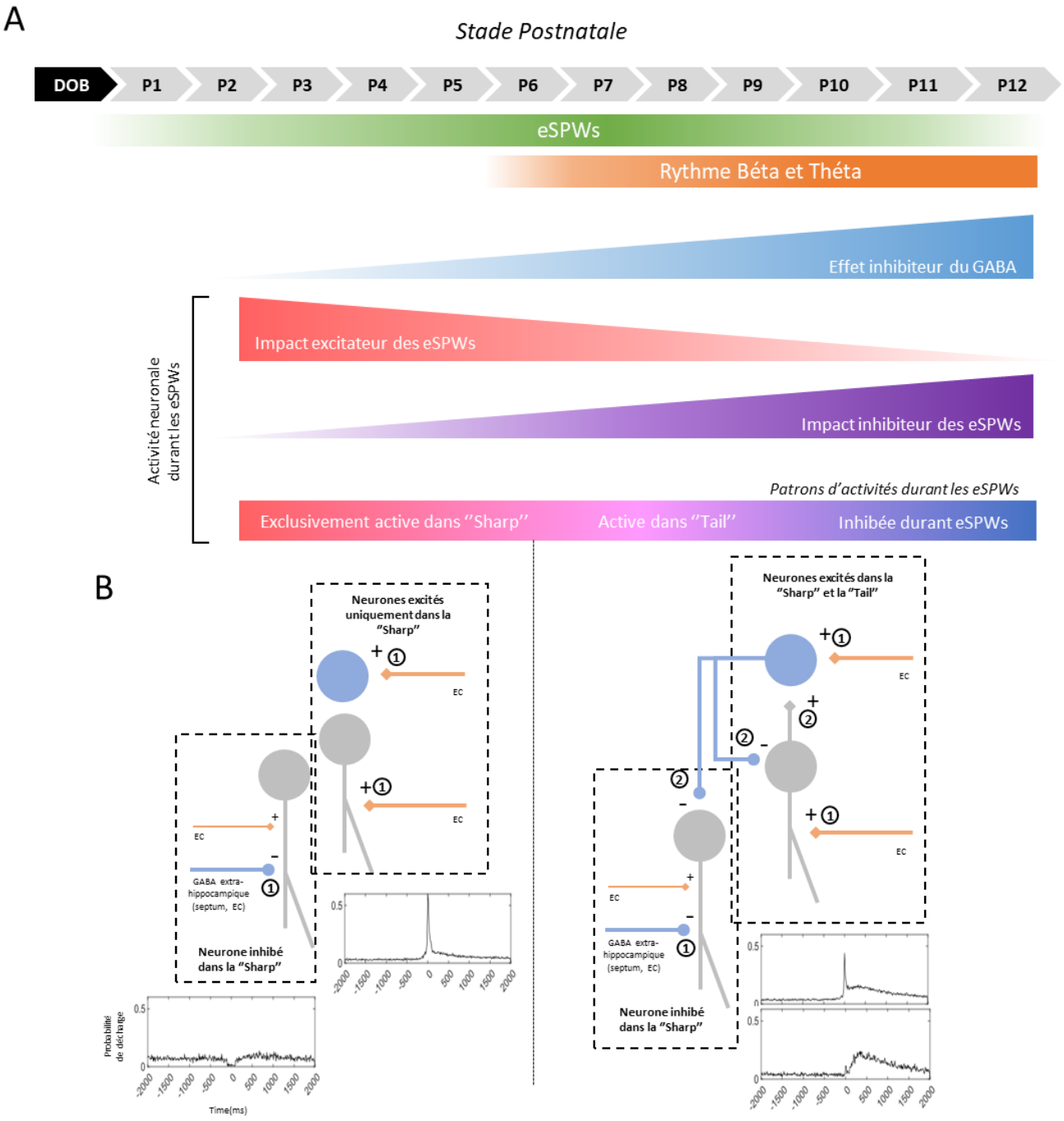


Figure IV.4 : Evolution des patrons d'activité lors des eSPWs et de l'émergence de l'inhibition GABAergique dans l'hippocampe immature.

A. La proportion de cellules inhibées (en violet) lors des eSPWs augmente avec l'âge, tandis que celle des cellules excitées (en rouge) diminue. Au cours des premiers jours de vie, les neurones déchargent principalement pendant la ''Sharp'', bien que certains présentent une activité dans la ''Tail''. Aux alentours de P7, la majorité des neurones actifs lors des eSPWs déchargent dans la ''Tail'', tandis que la proportion de ceux déchargeant exclusivement dans la ''Sharp'' diminue.En parallèle, la proportion de cellules inhibées par la photostimulation des neurones GABAergiques (en bleu) augmente avec l'âge. Une augmentation drastique est observée au début de la deuxième semaine de vie, où la proportion de neurones inhibés à la suite des stimulations lumineuses passe d'environ 20 % à 60 %. **B.** Représentation schématique de l'évolution de la connectivité locale sous-tendant les différents patrons d'activité. Les PETHs des neurones déchargeant dans les différentes composantes des eSPWs sont associés aux différents patrons d'activité.

D- Perspectives : conséquence de l'altération de l'activité neuronale aux stades néonataux

Nous l'avons vu, les neurones GABAergiques jouent un rôle crucial dans la régulation de nombreux processus développementaux au cours de la période néonatale (Rivera et al., 1999 ; Chudotvorova et al., 2005 ; Cancedda et al., 2007 ; Wang et Kriegstein, 2008). Bien que nos travaux permettent de préciser l'influence de ces neurones sur l'activité de réseaux pendant cette période, ils ne nous permettent pas de fournir un lien direct entre leur activité durant les eSPWs et la maturation des réseaux. Il serait donc important d'explorer ce rôle directement en perturbant spécifiquement l'activité GABAergique lors des eSPWs et d'en évaluer les conséquences à des stades ultérieurs du développement.

Une des conséquences de l'hypothèse d'un rôle fondamental des neurones GABAergiques dans le neurodéveloppement est que toute altération de la fonction GABAergique durant cette période, qu'elle soit d'origine génétique ou environnementale, impacterait la mise en place des réseaux. Cette anomalie, qui affecterait la réponse même des réseaux aux activités précoces, devrait empêcher leur mise en place optimale avant l'intégration des premières expériences sensorielles lors de la période critique de la petite enfance. Il en résulterait un dommage permanent du système nerveux, même dans le cas d'une restauration ultérieure de l'activité GABAergique. C'est cette hypothèse que j'aimerais tester en examinant directement l'activité et le rôle des neurones GABAergiques dans la dynamique des réseaux néonataux porteurs de mutations génétiques impliquées dans les troubles du neurodéveloppement.

Dans ce manuscrit, j'ai souvent mentionné les cellules de Cajal-Retzius et le rôle qu'elles joueraient dans ces processus développementaux. Toutefois, leur contribution lors des activités précoces est inconnue. L'utilisation de mon approche d'opto-tagging permettrait donc de mieux préciser ce rôle.

1) Altération de l'activité des neurones GABAergiques de CA1 durant les premières semaines postnatales

Afin d'évaluer le rôle des neurones GABAergiques dans la construction des réseaux hippocampiques, il serait intéressant de perturber spécifiquement l'activité GABAergique lors des eSPWs pendant la première semaine de vie. Cela nécessiterait donc de bloquer ces activités exclusivement pendant les eSPWs de façon chronique, avec un système semblable à notre système d'induction de la photostimulation par détection des eSPWs in vivo. Cependant, cette procédure serait très invasive pour les souriceaux, qui devraient alors être séparés de leur mère et reliés à un système de détection des eSPWs et d'induction de photostimulation durant plusieurs jours. Une autre approche plus réalisable consisterait à bloquer en permanence l'activité de certains sous-types de neurones GABAergiques de CA1 (indépendamment des eSPWs) pendant la première semaine de vie.

Dans cette optique, Dard et al. (2022) ont réalisé une étude similaire afin de tester si le développement de l'innervation péri-somatique issue des interneurones PV dépend de l'activité des interneurones SST. Pour cela, ils ont inhibé l'activité de ces derniers pendant plusieurs jours au cours de la première semaine de vie, en faisant exprimer des DREADD inhibitrices dans ces neurones. Ils ont alors montré que l'altération de l'activité des neurones SST entraînait une réduction de l'innervation péri-somatique issue des cellules PV à P9 après l'inhibition chronique des interneurones SST. Cependant, ils n'ont relevé aucun changement dans la réduction d'activité observée suite aux mouvements des souriceaux lors des enregistrements en imagerie calcique. Cela suggère que l'altération de la maturation de l'innervation péri-somatique issue des cellules PV n'empêche pas

l'apparition de l'inhibition induite par le mouvement lors de la deuxième semaine de vie. Toutefois, la dynamique temporelle des indicateurs de fluorescence calcique est plus lente que celle des événements électrophysiologiques tels que les PAs. Il est donc possible que les patrons de décharge lors des eSPWs que nous avons décrits soient altérés dans le cas de l'inhibition chronique des neurones GABAergiques durant les premiers jours de vie.

C'est pourquoi il serait intéressant d'examiner l'activité neuronale en électrophysiologie unitaire pour déterminer si l'inhibition des neurones GABAergiques impacte les différents patrons d'activité des neurones observés lors des eSPWs. De plus, il serait pertinent d'étudier les conséquences de cette inhibition sur le plan anatomique (nombre de neurones dans CA1, proportion des connexions excitatrices et inhibitrices, etc.) ainsi qu'à l'échelle comportementale. Étant donné le rôle clé que semblent jouer certains sous-types de neurones GABAergiques, comme les neurones CCK et les NGFs, lors des eSPWs, il serait pertinent d'inhiber ces derniers. Ainsi, on pourrait s'attendre à ce que l'altération de l'activité GABAergique entraîne des répercussions sur la construction des réseaux, mais aussi sur les plans comportemental et cognitif de l'animal.

2) Dans le cas de troubles neurodéveloppementaux

Des études ont montré que l'altération de la transmission GABAergique est impliquée dans un grand nombre de troubles neurodéveloppementaux (Nomura, 2021; Rubenstein & Merzenich, 2003; Tempio et al., 2023; Yu et al., 2006 ; Tyzio et al. 2014). Il serait donc intéressant d'étudier la contribution des neurones GABAergiques dans les activités néonatales in vivo et de déterminer leur influence sur les réseaux immatures mais dans des modèles de neuropathie développementale.

Ces dernières années, mon superviseur s'est intéressé à un modèle d'encéphalopathies précoces associées aux mutations STXBP1. Le gène stxbp1 code pour la protéine syntaxin-binding, connue pour son rôle dans l'organisation du complexe SNARE, permettant la libération des vésicules synaptiques. La syntaxine est aussi impliquée dans l'ancrage de plusieurs protéines synaptiques, notamment KV7.2. La mutation de stxbp1 empêcherait l'action inhibitrice de la syntaxine sur les canaux Kv7 (Devaux et al. 2017). Les souris ayant cette mutation présentent un phénotype épileptique précoce qui peut être observé dès la naissance et, en grandissant, ont un déficit intellectuel profond. Les enregistrements réalisaés chez les nouveaux nés atteints de ce type d'épilepsie encéphalopathique suggèrent la présence d'une désorganisation des activités précoces qui serait à l'origine des déficits cognitifs. Un des objectifs a donc été de déterminer l'impact de mutations STXBP1 sur les activités néonatales.

Les données préliminaires ont suggéré une altération des eSPWs hippocampiques et des spindle-burts du cortex somato-sensoriel. En effet, celles-ci sont suivies, chez les mutants par un rebond à forte amplitude de type pointe intericale. J'ai également réalisé des enregistrements sur ces souris mutantes, âgées entre 5 et 8 jours, dans lesquelles j'ai observé également des rebonds à forte amplitude de type pointe intericale mais aussi une très faible activité neuronale similaire à celle observé chez des animaux âgés de 3 ou 4 jours. Ces observations laissent présager d'un retard dans la maturation de la connectivité et des propriétés intrinsèques des neurones. Il serait donc intéressant de décrire l'activité des neurones GABAergiques lors des eSPWs et de déterminer leur implication dans les réseaux hippocampiques immatures dans ces modèles pathologiques de neuropathie développementale. On pourrait envisager que dans ces modèles il y ait un retard de la maturation de la connectivité locale associé ou non à une altération de l'effet inhibiteur du GABA qui aurait pour conséquence la présence d'une faible proportion de neurones qui déchargeraient dans la composante ''Tail'' des eSPWs.

Ainsi, ces travaux permettraient de mieux comprendre comment se met en place le réseau dans un contexte pathologique et de savoir si les activités spontanées néonatales et/ou l'activité des neurones GABAergiques sont altérées dans ces conditions.

3) L'activité des cellules de Cajal-Retzuis lors des eSPWs : un rôle majeur dans la maturation des réseaux ?

Nous avons vu dans ce manuscrit que les cellules de Cajal-Retzius (CRs) jouent un rôle important dans la maturation des réseaux grâce à la sécrétion de reelin. Ces cellules sont intégrées dans le réseau immature de CA1 dès les premiers jours de vie et reçoivent des afférences synaptiques GABAergiques provenant d'interneurones tels que les interneurones NGFs ou les neurones O-LM (Marchionni et al., 2010 ; Quattrocolo et Maccaferri, 2013 ; Anstötz et Maccaferri, 2020). Elles reçoivent également des connexions excitatrices provenant du cortex entorhinal (EC) (Supèr et al., 1998). On peut donc supposer que ces cellules augmentent leur taux de décharge lors des eSPWs, bien que leur contribution lors de ces activités précoces reste inconnue. De plus, les CRs forment des connexions excitatrices avec les NGFs et les cellules pyramidales au niveau de leurs dendrites distales situées dans la couche SLM (Quattrocolo et Maccaferri, 2013, 2014). Ces connexions sur les neurones GABAergiques permettent une levée de l'inhibition sur les cellules pyramidales (Quattrocolo et Maccaferri, 2014).

Il serait donc intéressant d'utiliser notre approche d'opto-tagging pour déterminer leur contribution lors des eSPWs et leur impact sur le réseau immature. En plus d'être activées lors les eSPWs, on pourrait s'attendre à ce qu'elles modulent l'activité des cellules pyramidales et des neurones GABAergiques avec lesquels elles forment des connexions. Cela suggérerait que ces cellules jouent un rôle important dans la dynamique de décharge des neurones immatures de CA1 lors des eSPWs. Par conséquent, il serait également intéressant de voir si une altération de l'activité des CRs lors des eSPWs aurait un impact sur la maturation des réseaux.

III Conclusion

Mes travaux de thèse apportent une meilleure compréhension de la participation des neurones GABAergiques dans la dynamique des réseaux néonataux dans la région de CA1. Dans l'ensemble, nous avons mis en évidence un effet global inhibiteur de l'activité GABAergique dans l'hippocampe néonatal in vivo. L'augmentation rapide de cette inhibition au début de la 2e semaine postnatale refléterait l'état de maturation de la connectivité du réseau ainsi que celui des propriétés intrinsèques des neurones qui le composent. Comme l'ont soutenu Dard et al. (2022) et Kirmse et Zhang (2022), il est probable que le développement tardif de l'inhibition GABAergique permette aux neurones de CA1 de se désengager des entrées sensorielles induites par la périphérie, telles que les mouvements myocloniques. Ce désengagement tardif de la périphérie permettrait l'émergence de la dynamique interne de l'hippocampe, nécessaire aux fonctions cognitives supérieures telles que l'exploration de l'environnement.

De nombreuses études ont montré l'importance de l'activité GABAergique à ces stades immatures dans la construction et la maturation des réseaux. Ainsi, l'altération de la transmission GABAergique est impliquée dans un grand nombre de troubles neurodéveloppementaux sévères tels que l'épilepsie ou encore les troubles du spectre de l'autisme.

FIGURES ANNEXES

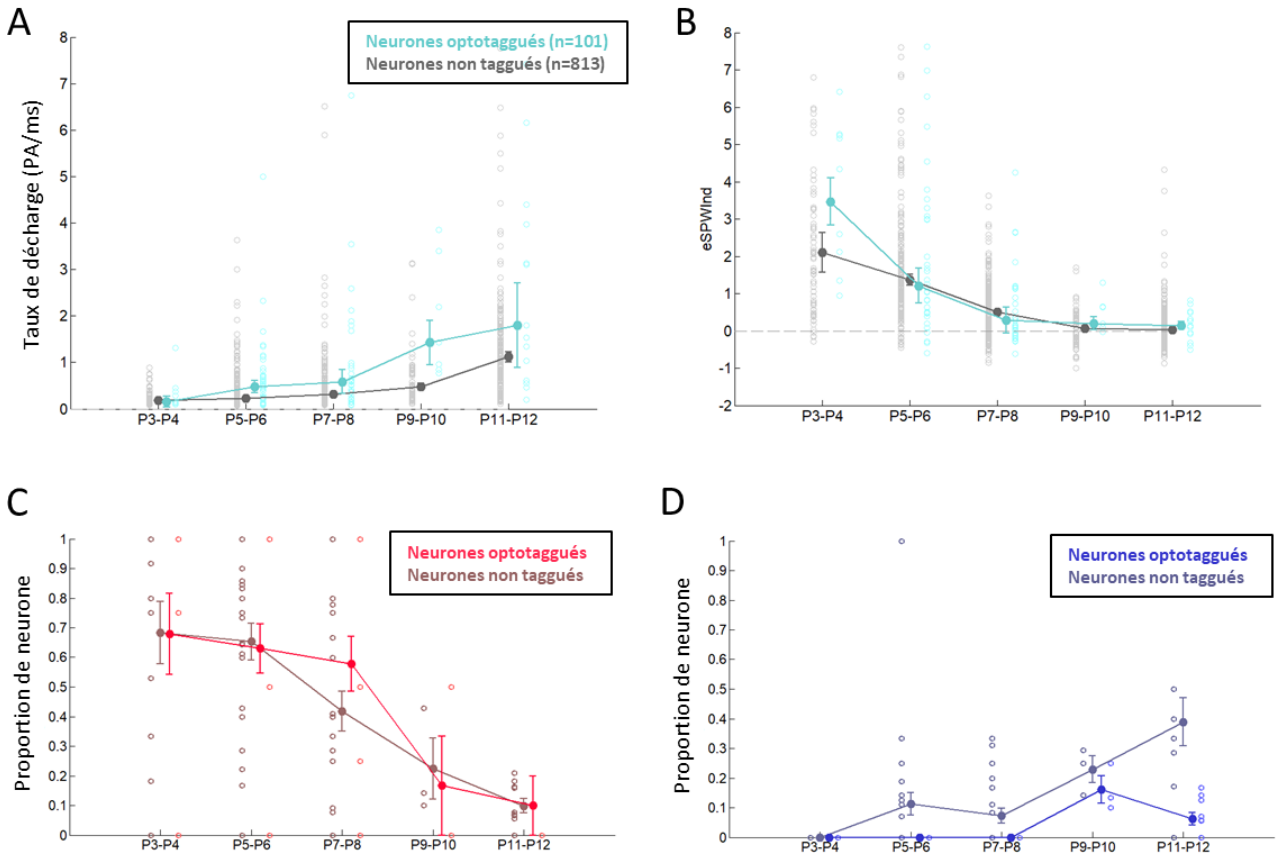


Figure annexe 1 : Activité des neurones GABAergiques durant eSPWs

A. Taux de décharge durant l'ensemble de la session d'enregistrement (PA/ms) des neurones opto-taggués (en bleu) et non taggués (en gris). Notons que les neurones GABAergiques opto-taggués semblent avoir une fréquence de décharge plus élevée que le reste de la population neuronale. **B.** Taux de décharge durant les eSPWs par rapport au taux de décharge durant l'ensemble de la session (représenté sous forme d'index). Notons qu'avec l'âge, les neurones GABAergiques opto-taggués ont un taux de décharge durant les eSPWs similaire à celui durant l'ensemble de la session, comme observé pour l'ensemble de la population neuronale. **C.** Évolution de la proportion de neurones qui sont significativement excités ou (**D**) inhibés durant les eSPWs. Notons que la proportion de neurones GABAergiques opto-taggués excités durant les eSPWs évolue de la même façon que celle des non taggués. Concernant la proportion de neurones inhibés durant les eSPWs, il commence à y avoir des neurones opto-taggués inhibés seulement à partir de P9.

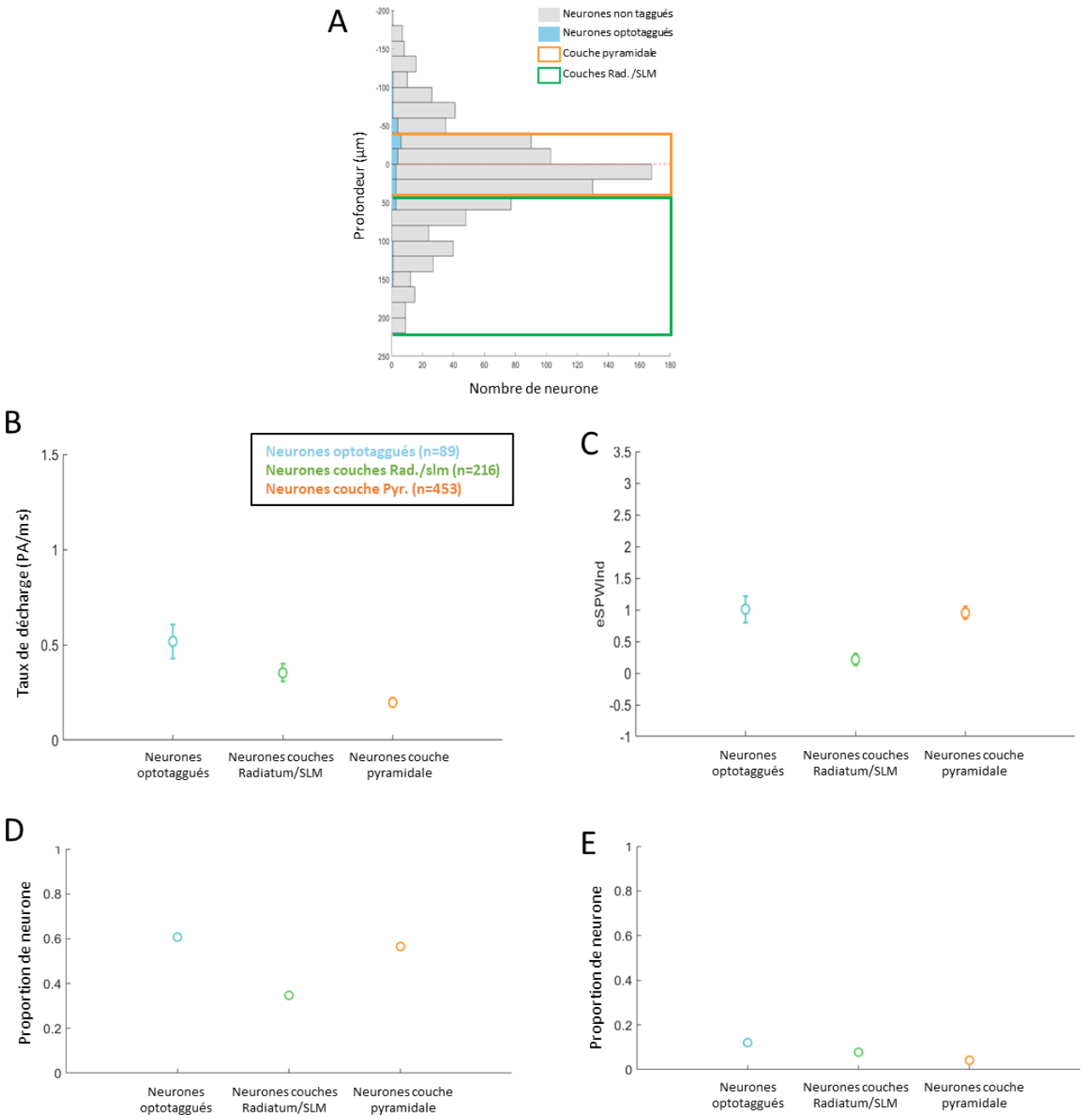


Figure annexe 2 : Activité des neurones durant les eSPWs en fonction de leur localisation dans l'axe radial de CA1

A. Répartition des neurones enregistrés dans l'axe radial de CA1. Le rectangle orange délimite les neurones se trouvant dans la couche pyramidale présumée, le rectangle vert délimite les neurones se trouvant dans le stratum radiatum (Rad.) et la SLM présumée. Les neurones optotagués sont représentés en bleu et les non-taggués en gris. Notons que les neurones situés dans le radiatum et la SLM sont majoritairement des neurones GABAergiques (d'après les descriptions faites sur la localisation des différents types cellulaires dans CA1). **B.** Taux de décharge durant l'ensemble de la session d'enregistrement (PA/ms) des neurones en fonction de leur localisation dans les différentes couches de CA1 (tout âge confondu). Notons que les neurones optotagués et ceux se trouvant dans le radiatum et la SLM semblent avoir un taux de décharge supérieur à celui des neurones pyramidaux présumés. **C.** Taux de décharge durant les eSPWs par rapport au taux de décharge durant l'ensemble de la session (représenté sous forme d'index) (tout âge confondu). Notons que les neurones se trouvant dans le radiatum et la SLM sont moins excités durant les eSPWs que les neurones se trouvant dans les autres couches de CA1. **D.** Proportion de neurones significativement excités ou (**E**) inhibés durant les eSPWs (tout âge confondu). Notons qu'il y a moins de neurones significativement excités durant les eSPWs dans le radiatum et la SLM.

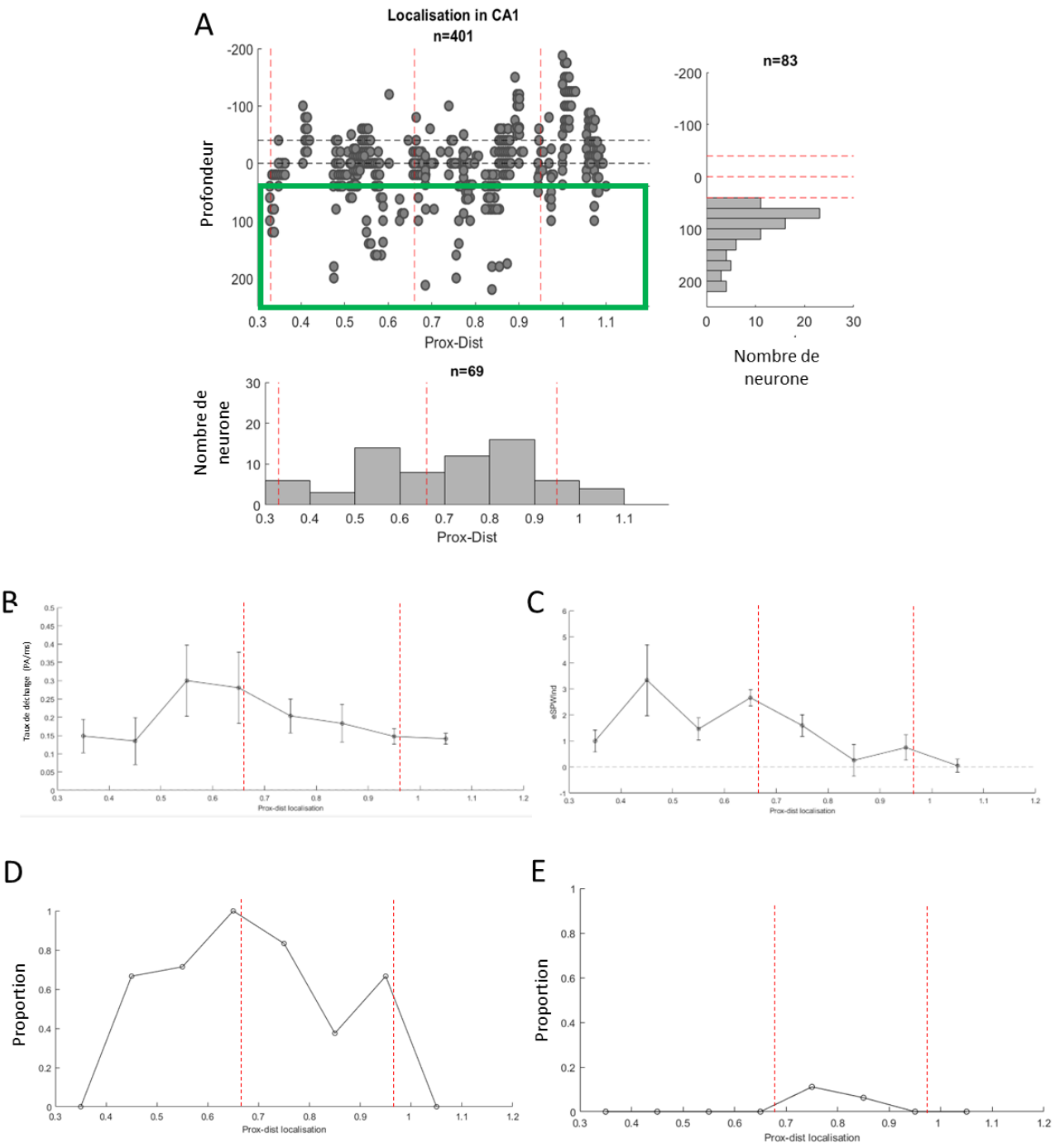


Figure annexe 3 : Activité des neurones se trouvant dans le radiatum/slm durant les eSPWs en fonction de leur localisation dans en proximo-distale

A. Représentation de la localisation des neurones enregistrés dans l'axe radial et proximo-distal de la région CA1 (en haut à gauche). Les pointillés noirs délimitent la couche pyramidale présumée, la valeur 0 µm correspond au site d'inversion, situé au milieu de la couche pyramidale. (En haut à droite) Répartition du nombre de neurones enregistrés en fonction de la profondeur dans CA1. (En bas) Répartition du nombre de neurones enregistrés dans l'axe proximo-distal. Le rectangle vert délimite les neurones se trouvant dans le stratum radiatum (Rad.) et la SLM présumée. **B.** Taux de décharge durant l'ensemble de la session d'enregistrement (PA/ms) des neurones en fonction de leur localisation dans l'axe proximo-distal (tout âge confondu). **C.** Taux de décharge durant les eSPWs par rapport au taux de décharge durant l'ensemble de la session (représenté sous forme d'index) (tout âge confondu). **D.** Proportion de neurones significativement excités ou (**E**) inhibés durant les eSPWs (tout âge confondu).

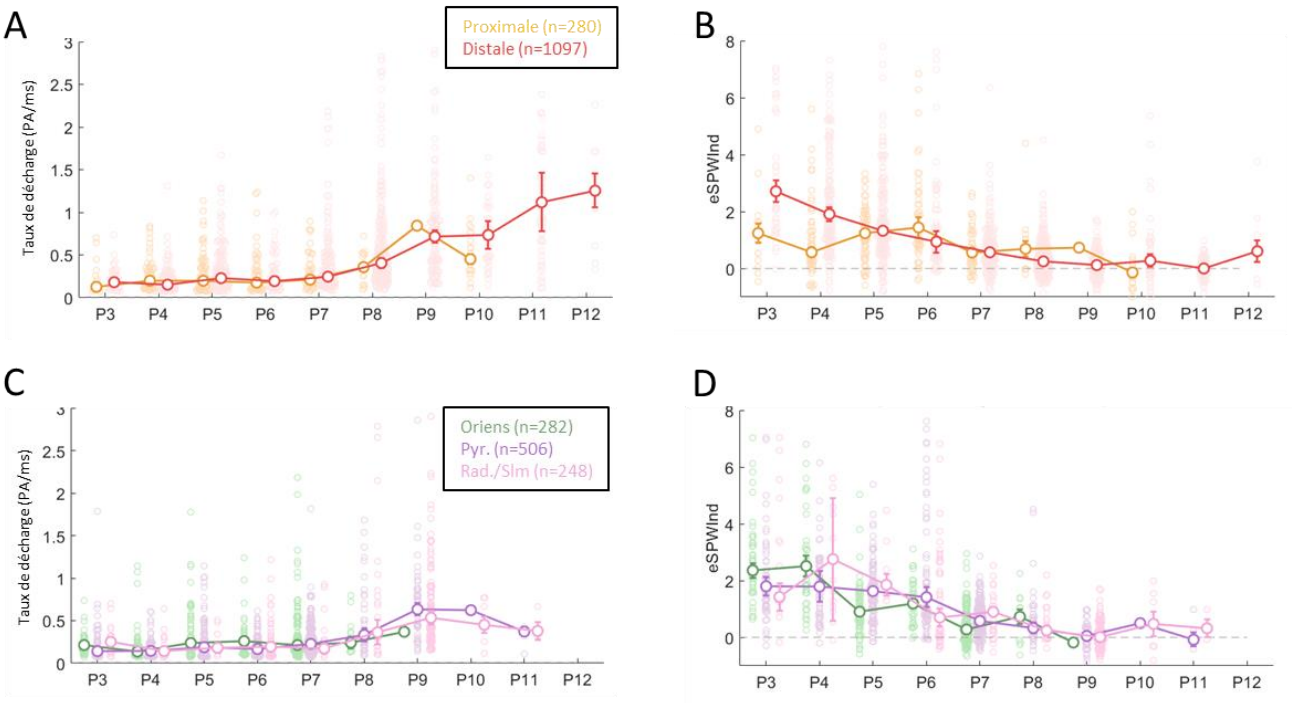


Figure annexe 4 : Evolution de l'activité des neurones durant les eSPWs en fonction de leur localisation dans l'axe radial et en proximo-distale

A. Taux de décharge durant l'ensemble de la session d'enregistrement (PA/ms) des neurones selon leur localisation dans la partie proximale (en jaune) et dans la partie distale (en orange) de CA1. Notons qu'il ne semble pas y avoir de différence entre les deux populations. **B.** Taux de décharge durant les eSPWs par rapport au taux de décharge durant l'ensemble de la session (représenté sous forme d'index) en fonction de leur localisation dans l'axe proximo-distal de CA1. Notons qu'il ne semble pas y avoir de différence entre les deux populations, sauf peut-être à P3 et P4. **C.** Taux de décharge durant la session d'enregistrement (PA/ms) des neurones selon leur localisation dans les différentes couches (présumées) de CA1. Notons qu'il ne semble pas y avoir de différence entre les différentes populations. **D.** Taux de décharge durant les eSPWs par rapport au taux de décharge durant l'ensemble de la session (représenté sous forme d'index) selon leur localisation dans les différentes couches (présumées) de CA1. Notons qu'il ne semble pas y avoir de différence entre les différentes populations.

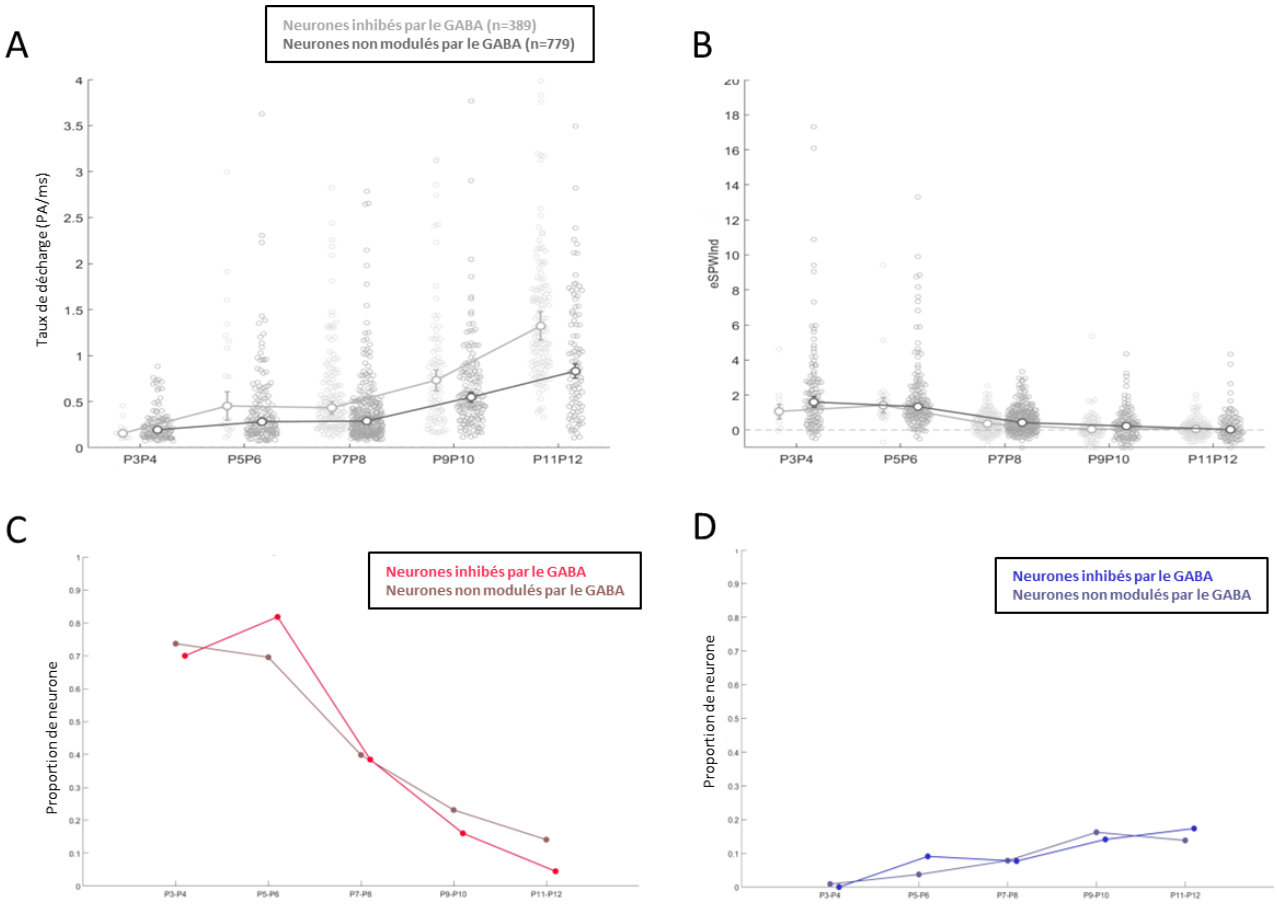


Figure annexe 5 : Activité des neurones inhibés par le GABA durant les eSPWs

A. Taux de décharge durant l'ensemble de la session d'enregistrement (PA/ms) des neurones inhibés par le GABA (en gris clair) et des neurones qui ne sont pas modulés par le GABA (en gris foncé). Notons que les neurones inhibés par le GABA semblent avoir une fréquence de décharge plus élevée que les autres.

B. Taux de décharge durant les eSPWs par rapport au taux de décharge durant l'ensemble de la session (représenté sous forme d'index). Notons qu'il ne semble pas y avoir de différence entre les deux populations.

C. Évolution de la proportion de neurones significativement excités ou (**D**) inhibés durant les eSPWs. Notons qu'il ne semble pas y avoir de différence entre les différentes populations.

RÉFÉRENCES

Acsády, L., Arabadzisz, D. and Freund, T.F. (1996) “Correlated morphological and neurochemical features identify different subsets of vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive interneurons in rat hippocampus,” *Neuroscience*, 73(2), pp. 299–315. Available at: https://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00610-9.

Adelsberger, H., Garaschuk, O. and Konnerth, A. (2005) “Cortical calcium waves in resting newborn mice,” *Nature Neuroscience*, 8(8), pp. 988–990. Available at: https://doi.org/10.1038/nn1502.

Agster, K.L. *et al.* (2016) “Subcortical connections of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat. II. efferents,” *Hippocampus*, 26(9), pp. 1213–1230. Available at: https://doi.org/10.1002/hipo.22600.

Aika, Y. *et al.* (1994) “Quantitative analysis of GABA-like-immunoreactive and parvalbumin-containing neurons in the CA1 region of the rat hippocampus using a stereological method, the disector,” *Experimental Brain Research*, 99(2). Available at: https://doi.org/10.1007/BF00239593.

Alger, B.E. and Nicoll, R.A. (1982) “Feed-forward dendritic inhibition in rat hippocampal pyramidal cells studied *in vitro*,” *The Journal of Physiology*, 328(1), pp. 105–123. Available at: https://doi.org/10.1113/jphysiol.1982.sp014255.

Allène, C. *et al.* (2008) “Sequential generation of two distinct synapse-driven network patterns in developing neocortex,” *Journal of Neuroscience*, 28(48), pp. 12851–12863. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3733-08.2008.

Allene, C. *et al.* (2012) “Dynamic changes in interneuron morphophysiological properties mark the maturation of hippocampal network activity,” *Journal of Neuroscience*, 32(19), pp. 6688–6698. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0081-12.2012.

Allene, C. and Cossart, R. (2010) “Early NMDA receptor-driven waves of activity in the developing neocortex: Physiological or pathological network oscillations?,” *Journal of Physiology*, pp. 83–91. Available at: https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.178798.

Alvarez-Buylla, A., García-Verdugo, J.M. and Tramontin, A.D. (2001) “A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells,” *Nature Reviews Neuroscience*, 2(4), pp. 287–293. Available at: https://doi.org/10.1038/35067582.

Amaral, D.G., Dolorfo, C. and Alvarez-Royo, P. (1991) “Organization of CA1 projections to the subiculum: A PHA-L analysis in the rat,” *Hippocampus*, 1(4), pp. 415–435. Available at: https://doi.org/10.1002/hipo.450010410.

Amaral, D.G. and Witter, M.P. (1989) “The three-dimensional organization of the hippocampal formation: A review of anatomical data,” *Neuroscience*, 31(3), pp. 571–591. Available at: https://doi.org/10.1016/0306-4522(89)90424-7.

Amilhon, B. *et al.* (2015) “Parvalbumin Interneurons of Hippocampus Tune Population Activity at Theta Frequency,” *Neuron*, 86(5), pp. 1277–1289. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.05.027.

Andersen, P., Morris, R., Amaral, D., O’Keefe, J., and Bliss, T. (2007). The hippocampus book. Neuron.

Ang, E.S.B.C. *et al.* (2003) “Four-Dimensional Migratory Coordinates of GABAergic Interneurons in the Developing Mouse Cortex,” *The Journal of Neuroscience*, 23(13), pp. 5805–5815. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-13-05805.2003.

Angevine, J.B. (1965) “Time of neuron origin in the hippocampal region. An autoradiographic study in the mouse.,” *Experimental neurology. Supplement*, p. Suppl 2:1-70.

Aniksztejn, L. *et al.* (2001) “Recurrent CA1 collateral axons in developing rat hippocampus,” *Brain Research*, 913(2), pp. 195–200. Available at: https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)02817-7.

Anstötz, M. *et al.* (2016) “Developmental Profile, Morphology, and Synaptic Connectivity of Cajal-Retzius Cells in the Postnatal Mouse Hippocampus,” *Cerebral Cortex*, 26(2), pp. 855–872. Available at: https://doi.org/10.1093/cercor/bhv271.

Anstötz, M. *et al.* (2018) “Experience-Dependent Regulation of Cajal-Retzius Cell Networks in the Developing and Adult Mouse Hippocampus,” *Cerebral Cortex*, 28(2), pp. 672–687. Available at: https://doi.org/10.1093/cercor/bhx153.

Anstötz, M. and Maccaferri, G. (2020) “A toolbox of criteria for distinguishing cajal–retzius cells from other neuronal types in the postnatal mouse hippocampus,” *eNeuro*, 7(1). Available at: https://doi.org/10.1523/ENEURO.0516-19.2019.

Anstötz, M., Quattrocolo, G. and Maccaferri, G. (2018) “Cajal-Retzius cells and GABAergic interneurons of the developing hippocampus: Close electrophysiological encounters of the third kind,” *Brain Research*. Elsevier B.V., pp. 124–133. Available at: https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.07.028.

Ascoli, G.A. *et al.* (2008) “Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex.,” *Nature reviews. Neuroscience*, 9(7), pp. 557–68. Available at: https://doi.org/10.1038/nrn2402.

Azouz, R., Jensen, M.S. and Yaari, Y. (1996) “Ionic basis of spike after-depolarization and burst generation in adult rat hippocampal CA1 pyramidal cells.,” *The Journal of Physiology*, 492(1), pp. 211–223. Available at: https://doi.org/10.1113/jphysiol.1996.sp021302.

Baimbridge, K.G. *et al.* (1991) “Bursting response to current-evoked depolarization in rat ca1 pyramidal neurons is correlated with lucifer yellow dye coupling but not with the presence of calbindin-D $_{28k}$,” *Synapse*, 7(4), pp. 269–277. Available at: https://doi.org/10.1002/syn.890070404.

Bandler, R.C., Mayer, C. and Fishell, G. (2017) “Cortical interneuron specification: the juncture of genes, time and geometry,” *Current Opinion in Neurobiology*, 42, pp. 17–24. Available at: https://doi.org/10.1016/j.conb.2016.10.003.

Bannister, N.J. and Larkman, A.U. (1995) “Dendritic morphology of CA1 pyramidal neurones from the rat hippocampus: I. Branching patterns,” *Journal of Comparative Neurology*, 360(1), pp. 150–160. Available at: https://doi.org/10.1002/cne.903600111.

Barry, J.M. and Holmes, G.L. (2016) “Why Are Children With Epileptic Encephalopathies Encephalopathic?,” *Journal of Child Neurology*, 31(13), pp. 1495–1504. Available at: https://doi.org/10.1177/0883073816662140.

Bartos, M., Vida, I. and Jonas, P. (2007) “Synaptic mechanisms of synchronized gamma oscillations in inhibitory interneuron networks,” *Nature Reviews Neuroscience*, 8(1), pp. 45–56. Available at: https://doi.org/10.1038/nrn2044.

Basu, J. *et al.* (2016) “Gating of hippocampal activity, plasticity, and memory by entorhinal cortex long-range inhibition,” *Science*, 351(6269). Available at: https://doi.org/10.1126/science.aaa5694.

Baude, A. *et al.* (1993) “The metabotropic glutamate receptor (mGluRlα) is concentrated at perisynaptic membrane of neuronal subpopulations as detected by immunogold reaction,” *Neuron*, 11(4), pp. 771–787. Available at: https://doi.org/10.1016/0896-6273(93)90086-7.

Baude, A. *et al.* (2007) “Immunoreactivity for the GABAA Receptor 1 Subunit, Somatostatin and Connexin36 Distinguishes Axoaxonic, Basket, and Bistratified Interneurons of the Rat Hippocampus,” *Cerebral Cortex*, 17(9), pp. 2094–2107. Available at: https://doi.org/10.1093/cercor/bhl117.

Bayer, S.A. (1980) “Development of the hippocampal region in the rat I. Neurogenesis examined with ^{3}H-thymidine autoradiography,” *Journal of Comparative Neurology*, 190(1), pp. 87–114. Available at: https://doi.org/10.1002/cne.901900107.

Bayer, S.A. and Altman, J. (1987) “Directions in neurogenetic gradients and patterns of anatomical connections in the telencephalon,” *Progress in Neurobiology*, 29(1), pp. 57–106. Available at: https://doi.org/10.1016/0301-0082(87)90015-3.

Behar, T.N. *et al.* (1999) “Glutamate Acting at NMDA Receptors Stimulates Embryonic Cortical Neuronal Migration,” *The Journal of Neuroscience*, 19(11), pp. 4449–4461. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-11-04449.1999.

Bell, K.A. *et al.* (2021) “The Entorhinal Cortical Alvear Pathway Differentially Excites Pyramidal Cells and Interneuron Subtypes in Hippocampal CA1,” *Cerebral Cortex*, 31(5), pp. 2382–2401. Available at: https://doi.org/10.1093/cercor/bhaa359.

Ben-Ari, Y. *et al.* (1989) *303 With 13 text-figures GIANT SYNAPTIC POTENTIALS IN IMMATURE RAT CA3 HIPPOCAMPAL NEURONES*, *Journal of Physiology*.

Ben-Ari, Y. *et al.* (2007) “GABA: A pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations,” *Physiological Reviews*, pp. 1215–1284. Available at: https://doi.org/10.1152/physrev.00017.2006.

Bertram, E.H. and Zhang, D.X. (1999) “Thalamic excitation of hippocampal CA1 neurons: a comparison with the effects of CA3 stimulation,” *Neuroscience*, 92(1), pp. 15–26. Available at: https://doi.org/10.1016/S0306-4522(98)00712-X.

Bezaire, M.J. and Soltesz, I. (2013) “Quantitative assessment of CA1 local circuits: Knowledge base for interneuron-pyramidal cell connectivity,” *Hippocampus*, 23(9), pp. 751–785. Available at: https://doi.org/10.1002/hipo.22141.

Bieri, K.W., Bobbitt, K.N. and Colgin, L.L. (2014) “Slow and Fast Gamma Rhythms Coordinate Different Spatial Coding Modes in Hippocampal Place Cells,” *Neuron*, 82(3), pp. 670–681. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.03.013.

Bir, S.C. *et al.* (2015) “Julius Caesar Arantius (Giulio Cesare Aranzi, 1530–1589) and the hippocampus of the human brain: history behind the discovery,” *Journal of Neurosurgery*, 122(4), pp. 971–975. Available at: https://doi.org/10.3171/2014.11.JNS132402.

Bittencourt, J.C. *et al.* (1992) “The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: An immuno- and hybridization histochemical characterization,” *Journal of Comparative Neurology*, 319(2), pp. 218–245. Available at: https://doi.org/10.1002/cne.903190204.

Blanquie, O. *et al.* (2017) “Electrical activity controls area-specific expression of neuronal apoptosis in the mouse developing cerebral cortex,” *eLife*, 6. Available at: https://doi.org/10.7554/eLife.27696.

Bocchio, M. *et al.* (2020) “Hippocampal hub neurons maintain distinct connectivity throughout their lifetime,” *Nature Communications*, 11(1), p. 4559. Available at: https://doi.org/10.1038/s41467-020-18432-6.

Bokor, H. *et al.* (2002) “Cellular architecture of the nucleus reuniens thalami and its putative aspartatergic/glutamatergic projection to the hippocampus and medial septum in the rat,” *European Journal of Neuroscience*, 16(7), pp. 1227–1239. Available at: https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02189.x.

Bonifazi, P. *et al.* (2009) *GABAergic Hub Neurons Orchestrate Synchrony in Developing Hippocampal Networks*. Available at: www.sciencemag.org.

Borrell, V. *et al.* (1999) “Reelin Regulates the Development and Synaptogenesis of the Layer-Specific Entorhino-Hippocampal Connections,” *The Journal of Neuroscience*, 19(4), pp. 1345–1358. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-04-01345.1999.

Bortone, D. and Polleux, F. (2009) “KCC2 Expression Promotes the Termination of Cortical Interneuron Migration in a Voltage-Sensitive Calcium-Dependent Manner,” *Neuron*, 62(1), pp. 53–71. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.01.034.

Bowery, N.G. (1993) “GABA $_B$ Receptor Pharmacology,” *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 33(1), pp. 109–147. Available at: https://doi.org/10.1146/annurev.pa.33.040193.000545.

Bowery, N.G. *et al.* (2002) “International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian γ-Aminobutyric AcidB Receptors: Structure and Function,” *Pharmacological Reviews*, 54(2), pp. 247–264. Available at: https://doi.org/10.1124/pr.54.2.247.

Bragin, A. *et al.* (1995) “Gamma (40-100 Hz) oscillation in the hippocampus of the behaving rat,” *The Journal of Neuroscience*, 15(1), pp. 47–60. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-01-00047.1995.

Buhl, D.L. and Buzsáki, G. (2005) “Developmental emergence of hippocampal fast-field ‘ripple’ oscillations in the behaving rat pups,” *Neuroscience*, 134(4), pp. 1423–1430. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.05.030.

Buhl, E.H. *et al.* (1994) “Physiological properties of anatomically identified axo-axonic cells in the rat hippocampus,” *Journal of Neurophysiology*, 71(4), pp. 1289–1307. Available at: https://doi.org/10.1152/jn.1994.71.4.1289.

Buhl, E.H., Halasy, K. and Somogyi, P. (1994) “Diverse sources of hippocampal unitary inhibitory postsynaptic potentials and the number of synaptic release sites,” *Nature*, 368(6474), pp. 823–828. Available at: https://doi.org/10.1038/368823a0.

Burwell, R.D. and Amaral, D.G. (1998) “Cortical afferents of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat,” *The Journal of Comparative Neurology*, 398(2), pp. 179–205. Available at: https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19980824)398:2<179::AID-CNE3>3.0.CO;2-Y.

Butt, S.J.B. *et al.* (2008) “The Requirement of Nkx2-1 in the Temporal Specification of Cortical Interneuron Subtypes,” *Neuron*, 59(5), pp. 722–732. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.07.031.

Buzsáki, G. (2002) “Theta Oscillations in the Hippocampus,” *Neuron*, 33(3), pp. 325–340. Available at: https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00586-X.

Buzsáki, G. (2010) “Neural Syntax: Cell Assemblies, Synapsembles, and Readers,” *Neuron*, 68(3), pp. 362–385. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.09.023.

Buzsáki, G. (2015) “Hippocampal sharp wave-ripple: A cognitive biomarker for episodic memory and planning,” *Hippocampus*, 25(10), pp. 1073–1188. Available at: https://doi.org/10.1002/hipo.22488.

Cancedda, L. *et al.* (2007) “Excitatory GABA Action Is Essential for Morphological Maturation of Cortical Neurons *In Vivo*,” *The Journal of Neuroscience*, 27(19), pp. 5224–5235. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5169-06.2007.

Canolty, R.T. *et al.* (2006) “High Gamma Power Is Phase-Locked to Theta Oscillations in Human Neocortex,” *Science*, 313(5793), pp. 1626–1628. Available at: https://doi.org/10.1126/science.1128115.

Canto, C.B., Wouterlood, F.G. and Witter, M.P. (2008) “What Does the Anatomical Organization of the Entorhinal Cortex Tell Us?,” *Neural Plasticity*, 2008, pp. 1–18. Available at: https://doi.org/10.1155/2008/381243.

Cassel, J.-C. *et al.* (2021) “The reuniens and rhomboid nuclei of the thalamus: A crossroads for cognition-relevant information processing?,” *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 126, pp. 338–360. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.03.023.

Causeret, F., Coppola, E. and Pierani, A. (2018) “Cortical developmental death: selected to survive or fated to die,” *Current Opinion in Neurobiology*, 53, pp. 35–42. Available at: https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.04.022.

Cavalieri, D. *et al.* (2021) “CA1 pyramidal cell diversity is rooted in the time of neurogenesis,” *eLife*, 10. Available at: https://doi.org/10.7554/eLife.69270.

Cembrowski, M.S. *et al.* (2016) “Spatial Gene-Expression Gradients Underlie Prominent Heterogeneity of CA1 Pyramidal Neurons,” *Neuron*, 89(2), pp. 351–368. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.12.013.

Cembrowski, M.S. and Spruston, N. (2019) “Heterogeneity within classical cell types is the rule: lessons from hippocampal pyramidal neurons,” *Nature Reviews Neuroscience*, 20(4), pp. 193–204. Available at: https://doi.org/10.1038/s41583-019-0125-5.

Ceranik, K. *et al.* (1999) “Hippocampal Cajal–Retzius cells project to the entorhinal cortex: retrograde tracing and intracellular labelling studies,” *European Journal of Neuroscience*, 11(12), pp. 4278–4290. Available at: https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1999.00860.x.

Chamberland, S. (2010) “Synapse-specific inhibitory control of hippocampal feedback inhibitory circuit,” *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 4. Available at: https://doi.org/10.3389/fncel.2010.00130.

Chapuis, J. *et al.* (2013) “Lateral Entorhinal Modulation of Piriform Cortical Activity and Fine Odor Discrimination,” *The Journal of Neuroscience*, 33(33), pp. 13449–13459. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1387-13.2013.

Chauvière, L. *et al.* (2009) “Early Deficits in Spatial Memory and Theta Rhythm in Experimental Temporal Lobe Epilepsy,” *The Journal of Neuroscience*, 29(17), pp. 5402–5410. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4699-08.2009.

Chevaleyre, V. and Siegelbaum, S.A. (2010) “Strong CA2 Pyramidal Neuron Synapses Define a Powerful Disynaptic Cortico-Hippocampal Loop,” *Neuron*, 66(4), pp. 560–572. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.04.013.

Chittajallu, R. *et al.* (2013) “Dual origins of functionally distinct O-LM interneurons revealed by differential 5-HT3AR expression,” *Nature Neuroscience*, 16(11), pp. 1598–1607. Available at: https://doi.org/10.1038/nn.3538.

Chittajallu, R. *et al.* (2017) “Afferent specific role of NMDA receptors for the circuit integration of hippocampal neurogliaform cells,” *Nature Communications*, 8(1), p. 152. Available at: https://doi.org/10.1038/s41467-017-00218-y.

Cholvin, T. *et al.* (2018) “Ventral Midline Thalamus Is Necessary for Hippocampal Place Field Stability and Cell Firing Modulation,” *The Journal of Neuroscience*, 38(1), pp. 158–172. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2039-17.2017.

Chowdhury (2010) “Fate of Cajal-Retzius neurons in the postnatal mouse neocortex,” *Frontiers in Neuroanatomy* [Preprint]. Available at: https://doi.org/10.3389/neuro.05.010.2010.

Chudotvorova, I. *et al.* (2005) “Early expression of KCC2 in rat hippocampal cultures augments expression of functional GABA synapses,” *The Journal of Physiology*, 566(3), pp. 671–679. Available at: https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.089821.

Colbert, C.M. and Levy, W.B. (1992) “Electrophysiological and pharmacological characterization of perforant path synapses in CA1: mediation by glutamate receptors,” *Journal of Neurophysiology*, 68(1), pp. 1–8. Available at: https://doi.org/10.1152/jn.1992.68.1.1.

Colgin, L.L. *et al.* (2009) “Frequency of gamma oscillations routes flow of information in the hippocampus,” *Nature*, 462(7271), pp. 353–357. Available at: https://doi.org/10.1038/nature08573.

Colgin, L.L. (2016) “Rhythms of the hippocampal network,” *Nature Reviews Neuroscience*, 17(4), pp. 239–249. Available at: https://doi.org/10.1038/nrn.2016.21.

Colonnese, M.T. *et al.* (2010) “A Conserved Switch in Sensory Processing Prepares Developing Neocortex for Vision,” *Neuron*, 67(3), pp. 480–498. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.07.015.

Commins, S., Aggleton, J.P. and O’Mara, S.M. (2002) “Physiological evidence for a possible projection from dorsal subiculum to hippocampal area CA1,” *Experimental Brain Research*, 146(2), pp. 155–160. Available at: https://doi.org/10.1007/s00221-002-1158-x.

Cossart, R. *et al.* (2001) “Dendritic but not somatic GABAergic inhibition is decreased in experimental epilepsy,” *Nature Neuroscience*, 4(1), pp. 52–62. Available at: https://doi.org/10.1038/82900.

Cossart, R. and Khazipov, R. (2022) “HOW DEVELOPMENT SCULPTS HIPPOCAMPAL CIRCUITS AND FUNCTION,” *Physiological Reviews*, 102(1), pp. 343–378. Available at: https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2020.

Crépel, V. *et al.* (2007) “A Parturition-Associated Nonsynaptic Coherent Activity Pattern in the Developing Hippocampus,” *Neuron*, 54(1), pp. 105–120. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.03.007.

Crunelli, V. and Mayer, M.L. (1984) “Mg2+ dependence of membrane resistance increases evoked by NMDA in hippocampal neurones,” *Brain Research*, 311(2), pp. 392–396. Available at: https://doi.org/10.1016/0006-8993(84)90107-0.

Csicsvari, J. *et al.* (2000) “Ensemble Patterns of Hippocampal CA3-CA1 Neurons during Sharp Wave–Associated Population Events,” *Neuron*, 28(2), pp. 585–594. Available at: https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)00135-5.

Czurkó, A. *et al.* (2011) “Theta Phase Classification of Interneurons in the Hippocampal Formation of Freely Moving Rats,” *The Journal of Neuroscience*, 31(8), pp. 2938–2947. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5037-10.2011.

Danglot, L., Triller, A. and Marty, S. (2006) “The development of hippocampal interneurons in rodents,” *Hippocampus*, 16(12), pp. 1032–1060. Available at: https://doi.org/10.1002/hipo.20225.

Danielson, N.B. *et al.* (2016) “Sublayer-Specific Coding Dynamics during Spatial Navigation and Learning in Hippocampal Area CA1,” *Neuron*, 91(3), pp. 652–665. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.06.020.

Dard, R.F. *et al.* (2022) “The rapid developmental rise of somatic inhibition disengages hippocampal dynamics from self-motion,” *eLife*, 11. Available at: https://doi.org/10.7554/ELIFE.78116.

Deguchi, Y. *et al.* (2011) “Temporally matched subpopulations of selectively interconnected principal neurons in the hippocampus,” *Nature Neuroscience*, 14(4), pp. 495–504. Available at: https://doi.org/10.1038/nn.2768.

Dehorter, N. (2011) “Onset of pup locomotion coincides with loss of NR2C/D-mediated cortico-striatal EPSCs and dampening of striatal network immature activity,” *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 5. Available at: https://doi.org/10.3389/fncel.2011.00024.

Deidda, G. *et al.* (2015) “Reversing excitatory GABAAR signaling restores synaptic plasticity and memory in a mouse model of Down syndrome,” *Nature Medicine*, 21(4), pp. 318–326. Available at: https://doi.org/10.1038/nm.3827.

Deller, T. *et al.* (1996) “The alvear pathway of the rat hippocampus,” *Cell and Tissue Research*, 286(3), pp. 293–303. Available at: https://doi.org/10.1007/s004410050699.

Deller, T. *et al.* (1999) “The Hippocampus of the Reeler Mutant Mouse: Fiber Segregation in Area CA1 Depends on the Position of the Postsynaptic Target Cells,” *Experimental Neurology*, 156(2), pp. 254–267. Available at: https://doi.org/10.1006/exnr.1999.7021.

Demarque, M. *et al.* (2002) “Paracrine Intercellular Communication by a Ca2+- and SNARE-Independent Release of GABA and Glutamate Prior to Synapse Formation,” *Neuron*, 36(6), pp. 1051–1061. Available at: https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)01053-X.

Deng, J. *et al.* (2007) “The tracing study of developing entorhino-hippocampal pathway,” *International Journal of Developmental Neuroscience*, 25(4), pp. 251–258. Available at: https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2007.03.002.

Devaux, J. *et al.* (2017) “A possible link between *<scp>KCNQ</scp> 2* - and *<scp>STXBP</scp> 1* -related encephalopathies: <scp>STXBP</scp> 1 reduces the inhibitory impact of syntaxin-1A on M current,” *Epilepsia*, 58(12), pp. 2073–2084. Available at: https://doi.org/10.1111/epi.13927.

Diba, K. and Buzsáki, G. (2007) “Forward and reverse hippocampal place-cell sequences during ripples,” *Nature Neuroscience*, 10(10), pp. 1241–1242. Available at: https://doi.org/10.1038/nn1961.

Dolleman-van der Weel, M.J. *et al.* (2019) “The nucleus reuniens of the thalamus sits at the nexus of a hippocampus and medial prefrontal cortex circuit enabling memory and behavior,” *Learning & Memory*, 26(7), pp. 191–205. Available at: https://doi.org/10.1101/lm.048389.118.

Dolleman-Van der Weel, M.J., Lopes da Silva, F.H. and Witter, M.P. (1997) “Nucleus Reuniens Thalami Modulates Activity in Hippocampal Field CA1 through Excitatory and Inhibitory Mechanisms,” *The Journal of Neuroscience*, 17(14), pp. 5640–5650. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-14-05640.1997.

Dolleman-van der Weel, M.J., Lopes da Silva, F.H. and Witter, M.P. (2017) “Interaction of nucleus reuniens and entorhinal cortex projections in hippocampal field CA1 of the rat,” *Brain Structure and Function*, 222(5), pp. 2421–2438. Available at: https://doi.org/10.1007/s00429-016-1350-6.

Dolorfo, C.L. and Amaral, D.G. (1998) “Entorhinal cortex of the rat: topographic organization of the cells of origin of the perforant path projection to the dentate gyrus.,” *The Journal of comparative neurology*, 398(1), pp. 25–48.

Donato, F. *et al.* (2015) “Early- and Late-Born Parvalbumin Basket Cell Subpopulations Exhibiting Distinct Regulation and Roles in Learning,” *Neuron*, 85(4), pp. 770–786. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.01.011.

Donato, F. *et al.* (2017) “Stellate cells drive maturation of the entorhinal-hippocampal circuit,” *Science*, 355(6330). Available at: https://doi.org/10.1126/science.aai8178.

Dragoi, G., Harris, K.D. and Buzsáki, G. (2003) “Place Representation within Hippocampal Networks Is Modified by Long-Term Potentiation,” *Neuron*, 39(5), pp. 843–853. Available at: https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00465-3.

Drieu, C. and Zugaro, M. (2019a) “Hippocampal Sequences During Exploration: Mechanisms and Functions,” *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13. Available at: https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00232.

Drieu, C. and Zugaro, M. (2019b) “Hippocampal Sequences During Exploration: Mechanisms and Functions,” *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13. Available at: https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00232.

Duan, Z.R.S. *et al.* (2020) “GABAergic Restriction of Network Dynamics Regulates Interneuron Survival in the Developing Cortex,” *Neuron*, 105(1), pp. 75-92.e5. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.10.008.

Dugladze, T. *et al.* (2007) “Impaired hippocampal rhythmogenesis in a mouse model of mesial temporal lobe epilepsy,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(44), pp. 17530–17535. Available at: https://doi.org/10.1073/pnas.0708301104.

Durand, G.M., Kovalchuk, Y. and Konnerth, A. (1996) “Long-term potentiation and functional synapse induction in developing hippocampus,” *Nature*, 381(6577), pp. 71–75. Available at: https://doi.org/10.1038/381071a0.

Dzhala, V. *et al.* (2012) “Traumatic Alterations in GABA Signaling Disrupt Hippocampal Network Activity in the Developing Brain,” *The Journal of Neuroscience*, 32(12), pp. 4017–4031. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5139-11.2012.

Dzhala, V.I. *et al.* (2005) “NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain,” *Nature Medicine*, 11(11), pp. 1205–1213. Available at: https://doi.org/10.1038/nm1301.

Eichenbaum, H. (2014) “Time cells in the hippocampus: a new dimension for mapping memories,” *Nature Reviews Neuroscience*, 15(11), pp. 732–744. Available at: https://doi.org/10.1038/nrn3827.

Engelhardt, E. (2016) “Hippocampus discovery First steps,” *Dementia & Neuropsychologia*, 10(1), pp. 58–62. Available at: https://doi.org/10.1590/s1980-57642016dn10100011.

Fanselow, M.S. and Dong, H.-W. (2010) “Are the Dorsal and Ventral Hippocampus Functionally Distinct Structures?,” *Neuron*, 65(1), pp. 7–19. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.11.031.

Farooq, U. and Dragoi, G. (2019) “Emergence of preconfigured and plastic time-compressed sequences in early postnatal development,” *Science*, 363(6423), pp. 168–173. Available at: https://doi.org/10.1126/science.aav0502.

Fernández-Ruiz, A. *et al.* (2017) “Entorhinal-CA3 Dual-Input Control of Spike Timing in the Hippocampus by Theta-Gamma Coupling,” *Neuron*, 93(5), pp. 1213-1226.e5. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.02.017.

Ferraguti, F. *et al.* (2005) “Metabotropic Glutamate Receptor 8-Expressing Nerve Terminals Target Subsets of GABAergic Neurons in the Hippocampus,” *The Journal of Neuroscience*, 25(45), pp. 10520–10536. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2547-05.2005.

Ferraris, M. *et al.* (2018) “The Nucleus Reuniens Controls Long-Range Hippocampo–Prefrontal Gamma Synchronization during Slow Oscillations,” *The Journal of Neuroscience*, 38(12), pp. 3026–3038. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3058-17.2018.

Ferrer, I., Serrano, T. and Soriano, E. (1990) “Naturally occurring cell death in the subicular complex and hippocampus in the rat during development,” *Neuroscience Research*, 8(1), pp. 60–66. Available at: https://doi.org/10.1016/0168-0102(90)90058-M.

Fleck, M.W. *et al.* (2000) “Hippocampal Abnormalities and Enhanced Excitability in a Murine Model of Human Lissencephaly,” *The Journal of Neuroscience*, 20(7), pp. 2439–2450. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-07-02439.2000.

Foffani, G. *et al.* (2007) “Reduced Spike-Timing Reliability Correlates with the Emergence of Fast Ripples in the Rat Epileptic Hippocampus,” *Neuron*, 55(6), pp. 930–941. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.07.040.

Foster, D.J. and Wilson, M.A. (2006) “Reverse replay of behavioural sequences in hippocampal place cells during the awake state,” *Nature*, 440(7084), pp. 680–683. Available at: https://doi.org/10.1038/nature04587.

Freund, T.F. *et al.* (1990) “Serotonergic control of the hippocampus via local inhibitory interneurons.,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(21), pp. 8501–8505. Available at: https://doi.org/10.1073/pnas.87.21.8501.

Freund, T.F. and Antal, M. (1988a) “GABA-containing neurons in the septum control inhibitory interneurons in the hippocampus,” *Nature*, 336(6195), pp. 170–173. Available at: https://doi.org/10.1038/336170a0.

Freund, T.F. and Antal, M. (1988b) “GABA-containing neurons in the septum control inhibitory interneurons in the hippocampus,” *Nature*, 336(6195), pp. 170–173. Available at: https://doi.org/10.1038/336170a0.

Freund, T.F. and Buzsáki, G. (1998) “Interneurons of the hippocampus,” *Hippocampus*, 6(4), pp. 347–470. Available at: https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(1996)6:4<347::AID-HIPO1>3.0.CO;2-I.

Fricker, D. and Miles, R. (2000) “EPSP Amplification and the Precision of Spike Timing in Hippocampal Neurons,” *Neuron*, 28(2), pp. 559–569. Available at: https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)00133-1.

Fries, P. (2009) “Neuronal Gamma-Band Synchronization as a Fundamental Process in Cortical Computation,” *Annual Review of Neuroscience*, 32(1), pp. 209–224. Available at: https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.051508.135603.

Fukuda, A. *et al.* (1998) “Changes in Intracellular Ca $^{2+}$ Induced by GABA $_{A}$ Receptor Activation and Reduction in Cl $^{-}$ Gradient in Neonatal Rat Neocortex,” *Journal of Neurophysiology*, 79(1), pp. 439–446. Available at: https://doi.org/10.1152/jn.1998.79.1.439.

Fyhn, M. *et al.* (2004) “Spatial Representation in the Entorhinal Cortex,” *Science*, 305(5688), pp. 1258–1264. Available at: https://doi.org/10.1126/science.1099901.

Gähwiler, B.H. and Brown, D.A. (1985) “GABAB-receptor-activated K+ current in voltage-clamped CA3 pyramidal cells in hippocampal cultures.,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(5), pp. 1558–1562. Available at: https://doi.org/10.1073/pnas.82.5.1558.

Gaiarsa, J. *et al.* (1995) “Postnatal maturation of gamma-aminobutyric acid $_{A \text{ and } B}$ -mediated inhibition in the CA3 hippocampal region of the rat,” *Journal of Neurobiology*, 26(3), pp. 339–349. Available at: https://doi.org/10.1002/neu.480260306.

Gaiarsa, J.L. and Porcher, C. (2013a) “Emerging neurotrophic role of GABAB receptors in neuronal circuit development,” *Frontiers in Cellular Neuroscience*. Available at: https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00206.

Gaiarsa, J.L. and Porcher, C. (2013b) “Emerging neurotrophic role of GABAB receptors in neuronal circuit development,” *Frontiers in Cellular Neuroscience*. Available at: https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00206.

Ganguly, K. *et al.* (2001) “GABA Itself Promotes the Developmental Switch of Neuronal GABAergic Responses from Excitation to Inhibition,” *Cell*, 105(4), pp. 521–532. Available at: https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00341-5.

Gao, X. and van den Pol, A.N. (2000) “GABA release from mouse axonal growth cones,” *The Journal of Physiology*, 523(3), pp. 629–637. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.t01-1-00629.x.

Garaschuk O *et al.* (2000) “Large-scale oscillatory calcium waves in the immature cortex,” *Nat Neurosci.* [Preprint].

Garaschuk, O., Hanse, E. and Konnerth, A. (1998) *Developmental profile and synaptic origin of early network oscillations in the CA1 region of rat neonatal hippocampus*, *Journal of Physiology*.

Gelman, D. *et al.* (2011) “A Wide Diversity of Cortical GABAergic Interneurons Derives from the Embryonic Preoptic Area,” *The Journal of Neuroscience*, 31(46), pp. 16570–16580. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4068-11.2011.

Gelman, D.M. *et al.* (2009) “The Embryonic Preoptic Area Is a Novel Source of Cortical GABAergic Interneurons,” *The Journal of Neuroscience*, 29(29), pp. 9380–9389. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0604-09.2009.

Girardeau, G. *et al.* (2009) “Selective suppression of hippocampal ripples impairs spatial memory,” *Nature Neuroscience*, 12(10), pp. 1222–1223. Available at: https://doi.org/10.1038/nn.2384.

Glykys, J. and Staley, K.J. (2016) “Developmental Decrease of Neuronal Chloride Concentration Is Independent of Trauma in Thalamocortical Brain Slices,” *PLOS ONE*, 11(6), p. e0158012. Available at: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158012.

Godbole, G. *et al.* (2018) “Hierarchical genetic interactions between FOXG1 and LHX2 regulate the formation of the cortical hem in the developing telencephalon,” *Development*, 145(1). Available at: https://doi.org/10.1242/dev.154583.

Góis, Z.H.T.D. and Tort, A.B.L. (2018) “Characterizing Speed Cells in the Rat Hippocampus,” *Cell Reports*, 25(7), pp. 1872-1884.e4. Available at: https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.10.054.

Goldin, M. *et al.* (2007) “Synaptic Kainate Receptors Tune Oriens-Lacunosum Moleculare Interneurons to Operate at Theta Frequency,” *The Journal of Neuroscience*, 27(36), pp. 9560–9572. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1237-07.2007.

Gomez-Di Cesare, C.M. *et al.* (1997) “Axonal remodeling during postnatal maturation of CA3 hippocampal pyramidal neurons.,” *The Journal of comparative neurology*, 384(2), pp. 165–80.

Götz, M. and Huttner, W.B. (2005) “The cell biology of neurogenesis,” *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(10), pp. 777–788. Available at: https://doi.org/10.1038/nrm1739.

Gouwens, N.W. *et al.* (2020) “Integrated Morphoelectric and Transcriptomic Classification of Cortical GABAergic Cells,” *Cell*, 183(4), pp. 935-953.e19. Available at: https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.057.

Graf, J. *et al.* (2021) “A limited role of NKCC1 in telencephalic glutamatergic neurons for developing hippocampal network dynamics and behavior,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(14). Available at: https://doi.org/10.1073/pnas.2014784118.

Greer, P.L. and Greenberg, M.E. (2008) “From Synapse to Nucleus: Calcium-Dependent Gene Transcription in the Control of Synapse Development and Function,” *Neuron*, 59(6), pp. 846–860. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.09.002.

Griguoli, M. and Cherubini, E. (2017) “Early correlated network activity in the hippocampus: Its putative role in shaping neuronal circuits,” *Frontiers in Cellular Neuroscience*. Frontiers Media S.A. Available at: https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00255.

Gulyás, A.I., Hájos, N. and Freund, T.F. (1996) “Interneurons Containing Calretinin Are Specialized to Control Other Interneurons in the Rat Hippocampus,” *The Journal of Neuroscience*, 16(10), pp. 3397–3411. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-10-03397.1996.

Gupta, A.S. *et al.* (2010) “Hippocampal Replay Is Not a Simple Function of Experience,” *Neuron*, 65(5), pp. 695–705. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.01.034.

Gupta, A.S. *et al.* (2012) “Segmentation of spatial experience by hippocampal theta sequences,” *Nature Neuroscience*, 15(7), pp. 1032–1039. Available at: https://doi.org/10.1038/nn.3138.

Hafting, T. *et al.* (2005) “Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex,” *Nature*, 436(7052), pp. 801–806. Available at: https://doi.org/10.1038/nature03721.

Hanganu, I.L., Ben-Ari, Y. and Khazipov, R. (2006) “Retinal Waves Trigger Spindle Bursts in the Neonatal Rat Visual Cortex,” *Journal of Neuroscience*, 26(25), pp. 6728–6736. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0752-06.2006.

Hargreaves, E.L. *et al.* (2005) “Major Dissociation Between Medial and Lateral Entorhinal Input to Dorsal Hippocampus,” *Science*, 308(5729), pp. 1792–1794. Available at: https://doi.org/10.1126/science.1110449.

Harris, K.D. *et al.* (2018) “Classes and continua of hippocampal CA1 inhibitory neurons revealed by single-cell transcriptomics,” *PLOS Biology*, 16(6), p. e2006387. Available at: https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2006387.

Hartung, H. *et al.* (2016) “Thalamic and Entorhinal Network Activity Differently Modulates the Functional Development of Prefrontal–Hippocampal Interactions,” *The Journal of Neuroscience*, 36(13), pp. 3676–3690. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3232-15.2016.

Hayashi, K. *et al.* (2015) “Cellular dynamics of neuronal migration in the hippocampus,” *Frontiers in Neuroscience*, 9. Available at: https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00135.

Hébert, J.M. and Fishell, G. (2008) “The genetics of early telencephalon patterning: some assembly required,” *Nature Reviews Neuroscience*, 9(9), pp. 678–685. Available at: https://doi.org/10.1038/nrn2463.

Heidbreder, C.A. and Groenewegen, H.J. (2003) “The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics,” *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 27(6), pp. 555–579. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2003.09.003.

Herkenham, M. (1978) “The connections of the nucleus reuniens thalami: Evidence for a direct thalamo-hippocampal pathway in the rat,” *Journal of Comparative Neurology*, 177(4), pp. 589–609. Available at: https://doi.org/10.1002/cne.901770405.

Hevner, R.F. *et al.* (2003) “Cajal–Retzius cells in the mouse: transcription factors, neurotransmitters, and birthdays suggest a pallial origin,” *Developmental Brain Research*, 141(1–2), pp. 39–53. Available at: https://doi.org/10.1016/S0165-3806(02)00641-7.

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), pp. 219–231. Available at: https://doi.org/10.1002/cne.901460206.

Hjorth-Simonsen, A. and Jeune, B. (1972) “Origin and termination of the hippocampal perforant path in the rat studied by silver impregnation,” *Journal of Comparative Neurology*, 144(2), pp. 215–231. Available at: https://doi.org/10.1002/cne.901440206.

Honda, Y. *et al.* (2012) “Zonal distribution of perforant path cells in layer III of the entorhinal area projecting to CA1 and subiculum in the rat,” *Neuroscience Research*, 74(3–4), pp. 200–209. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neures.2012.10.005.

Hoover, W.B. and Vertes, R.P. (2007) “Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat,” *Brain Structure and Function*, 212(2), pp. 149–179. Available at: https://doi.org/10.1007/s00429-007-0150-4.

Hoover, W.B. and Vertes, R.P. (2012) “Collateral projections from nucleus reuniens of thalamus to hippocampus and medial prefrontal cortex in the rat: a single and double retrograde fluorescent labeling study,” *Brain Structure and Function*, 217(2), pp. 191–209. Available at: https://doi.org/10.1007/s00429-011-0345-6.

Huh, C.Y.L. *et al.* (2016) “Excitatory Inputs Determine Phase-Locking Strength and Spike-Timing of CA1 Stratum Oriens/Alveus Parvalbumin and Somatostatin Interneurons during Intrinsically Generated Hippocampal Theta Rhythm,” *The Journal of Neuroscience*, 36(25), pp. 6605–6622. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3951-13.2016.

Hur, E.E. and Zaborszky, L. (2005) “Vglut2 afferents to the medial prefrontal and primary somatosensory cortices: A combined retrograde tracing in situ hybridization,” *Journal of Comparative Neurology*, 483(3), pp. 351–373. Available at: https://doi.org/10.1002/cne.20444.

Igarashi, K.M. *et al.* (2014) “Coordination of entorhinal–hippocampal ensemble activity during associative learning,” *Nature*, 510(7503), pp. 143–147. Available at: https://doi.org/10.1038/nature13162.

Ikonomidou, C. *et al.* (2000) “Ethanol-Induced Apoptotic Neurodegeneration and Fetal Alcohol Syndrome,” *Science*, 287(5455), pp. 1056–1060. Available at: https://doi.org/10.1126/science.287.5455.1056.

Inácio, A.R. *et al.* (2016) “Sensory feedback synchronizes motor and sensory neuronal networks in the neonatal rat spinal cord,” *Nature Communications*, 7(1), p. 13060. Available at: https://doi.org/10.1038/ncomms13060.

Inan, M., Welagen, J. and Anderson, S.A. (2012) “Spatial and Temporal Bias in the Mitotic Origins of Somatostatin- and Parvalbumin-Expressing Interneuron Subgroups and the Chandelier Subtype in the Medial Ganglionic Eminence,” *Cerebral Cortex*, 22(4), pp. 820–827. Available at: https://doi.org/10.1093/cercor/bhr148.

Inostroza, M. *et al.* (2013) “Specific Impairment of ‘What-Where-When’ Episodic-Like Memory in Experimental Models of Temporal Lobe Epilepsy,” *The Journal of Neuroscience*, 33(45), pp. 17749–17762. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0957-13.2013.

Ishizuka, N., Cowan, W.M. and Amaral, D.G. (1995) “A quantitative analysis of the dendritic organization of pyramidal cells in the rat hippocampus,” *Journal of Comparative Neurology*, 362(1), pp. 17–45. Available at: https://doi.org/10.1002/cne.903620103.

Ishizuka, N., Weber, J. and Amaral, D.G. (1990) “Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat,” *Journal of Comparative Neurology*, 295(4), pp. 580–623. Available at: https://doi.org/10.1002/cne.902950407.

Ito, H.T. *et al.* (2015) “A prefrontal–thalamo–hippocampal circuit for goal-directed spatial navigation,” *Nature*, 522(7554), pp. 50–55. Available at: https://doi.org/10.1038/nature14396.

Izawa, S. *et al.* (2019) “REM sleep–active MCH neurons are involved in forgetting hippocampus-dependent memories,” *Science*, 365(6459), pp. 1308–1313. Available at: https://doi.org/10.1126/science.aax9238.

Jadhav, S.P. *et al.* (2012) “Awake Hippocampal Sharp-Wave Ripples Support Spatial Memory,” *Science*, 336(6087), pp. 1454–1458. Available at: https://doi.org/10.1126/science.1217230.

Jarsky, T. *et al.* (2008) “Distribution of bursting neurons in the CA1 region and the subiculum of the rat hippocampus,” *Journal of Comparative Neurology*, 506(4), pp. 535–547. Available at: https://doi.org/10.1002/cne.21564.

Jay, T.M. and Witter, M.P. (1991) “Distribution of hippocampal CA1 and subicular efferents in the prefrontal cortex of the rat studied by means of anterograde transport of *Phaseolus vulgaris* -leucoagglutinin,” *Journal of Comparative Neurology*, 313(4), pp. 574–586. Available at: https://doi.org/10.1002/cne.903130404.

Jiang, M. *et al.* (2001) “GABAergic neurons that pioneer hippocampal area CA1 of the mouse: Morphologic features and multiple fates,” *Journal of Comparative Neurology*, 439(2), pp. 176–192. Available at: https://doi.org/10.1002/cne.1341.

Jimenez, J.C. *et al.* (2018) “Anxiety Cells in a Hippocampal-Hypothalamic Circuit,” *Neuron*, 97(3), pp. 670-683.e6. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.01.016.

Jinno, S. *et al.* (2007) “Neuronal Diversity in GABAergic Long-Range Projections from the Hippocampus,” *The Journal of Neuroscience*, 27(33), pp. 8790–8804. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1847-07.2007.

Jinno, S. and Kosaka, T. (2002) “Immunocytochemical characterization of hippocamposeptal projecting GABAergic nonprincipal neurons in the mouse brain: a retrograde labeling study,” *Brain Research*, 945(2), pp. 219–231. Available at: https://doi.org/10.1016/S0006-8993(02)02804-4.

Jozsef Csicsvari *et al.* (1998) “Reliability and State Dependence of Pyramidal Cell-Interneuron Synapses in the Hippocampus: an Ensemble Approach in the Behaving Rat,” *Neuron*, Vol. 21, 179-189,.

Kajiwara, R. *et al.* (2008) “Convergence of entorhinal and CA3 inputs onto pyramidal neurons and interneurons in hippocampal area CA1—An anatomical study in the rat,” *Hippocampus*, 18(3), pp. 266–280. Available at: https://doi.org/10.1002/hipo.20385.

Kamondi, A. *et al.* (1998) “Theta oscillations in somata and dendrites of hippocampal pyramidal cells in vivo: Activity-dependent phase-precession of action potentials,” *Hippocampus*, 8(3), pp. 244–261. Available at: https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(1998)8:3<244::AID-HIPO7>3.0.CO;2-J.

Kanatani, S. *et al.* (2008) “COUP-TFII Is Preferentially Expressed in the Caudal Ganglionic Eminence and Is Involved in the Caudal Migratory Stream,” *The Journal of Neuroscience*, 28(50), pp. 13582–13591. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2132-08.2008.

Karlsson, K. *et al.* (2006) “On the co-occurrence of startles and hippocampal sharp waves in newborn rats,” *Hippocampus*, 16(11), pp. 959–965. Available at: https://doi.org/10.1002/hipo.20224.

Kasyanov, A.M. *et al.* (2004) “GABA-mediated giant depolarizing potentials as coincidence detectors for enhancing synaptic efficacy in the developing hippocampus,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(11), pp. 3967–3972. Available at: https://doi.org/10.1073/pnas.0305974101.

Katona, I. *et al.* (1999) “Presynaptically Located CB1 Cannabinoid Receptors Regulate GABA Release from Axon Terminals of Specific Hippocampal Interneurons,” *The Journal of Neuroscience*, 19(11), pp. 4544–4558. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-11-04544.1999.

Katona, L. *et al.* (2016) “Sleep and Movement Differentiates Actions of Two Types of Somatostatin-Expressing GABAergic Interneuron in Rat Hippocampus,” *Neuron*, 91(5), p. 1183. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.08.023.

Katona, L. *et al.* (2017) “Behavior-dependent activity patterns of GABAergic long-range projecting neurons in the rat hippocampus,” *Hippocampus*, 27(4), pp. 359–377. Available at: https://doi.org/10.1002/hipo.22696.

Kawaguchi, Y. *et al.* (1987) “Fast spiking cells in rat hippocampus (CA1 region) contain the calcium-binding protein parvalbumin,” *Brain Research*, 416(2), pp. 369–374. Available at: https://doi.org/10.1016/0006-8993(87)90921-8.

Kay, K. *et al.* (2020) “Constant Sub-second Cycling between Representations of Possible Futures in the Hippocampus,” *Cell*, 180(3), pp. 552-567.e25. Available at: https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.01.014.

Kerr, K.M. *et al.* (2007) “Functional neuroanatomy of the parahippocampal region: The lateral and medial entorhinal areas,” *Hippocampus*, 17(9), pp. 697–708. Available at: https://doi.org/10.1002/hipo.20315.

Kilb, W., Kirischuk, S. and Luhmann, H.J. (2011) “Electrical activity patterns and the functional maturation of the neocortex,” *European Journal of Neuroscience*, pp. 1677–1686. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07878.x.

King, C., Recce, M. and O’Keefe, J. (1998) “The rhythmicity of cells of the medial septum/diagonal band of Broca in the awake freely moving rat: relationships with behaviour and hippocampal theta,” *European Journal of Neuroscience*, 10(2), pp. 464–477. Available at: https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1998.00026.x.

Kirkby, L.A. *et al.* (2013) “A role for correlated spontaneous activity in the assembly of neural circuits,” *Neuron*, pp. 1129–1144. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.030.

Kirmse, K. *et al.* (2015) “GABA depolarizes immature neurons and inhibits network activity in the neonatal neocortex in vivo,” *Nature Communications*, 6. Available at: https://doi.org/10.1038/ncomms8750.

Kirmse, K. and Kirischuk, S. (2006) “Ambient GABA Constrains the Strength of GABAergic Synapses at Cajal-Retzius Cells in the Developing Visual Cortex,” *The Journal of Neuroscience*, 26(16), pp. 4216–4227. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0589-06.2006.

Kiss, J. *et al.* (1990) “Topographical localization of neurons containing parvalbumin and choline acetyltransferase in the medial septum-diagonal band region of the rat,” *Neuroscience*, 36(1), pp. 61–72. Available at: https://doi.org/10.1016/0306-4522(90)90351-4.

Kitamura, T. *et al.* (2014) “Island Cells Control Temporal Association Memory,” *Science*, 343(6173), pp. 896–901. Available at: https://doi.org/10.1126/science.1244634.

Kitazawa, A. *et al.* (2014) “Hippocampal Pyramidal Neurons Switch from a Multipolar Migration Mode to a Novel ‘Climbing’ Migration Mode during Development,” *The Journal of Neuroscience*, 34(4), pp. 1115–1126. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2254-13.2014.

Klausberger, T. *et al.* (2003) “Brain-state- and cell-type-specific firing of hippocampal interneurons in vivo,” *Nature*, 421(6925), pp. 844–848. Available at: https://doi.org/10.1038/nature01374.

Klausberger, T. *et al.* (2004) “Spike timing of dendrite-targeting bistratified cells during hippocampal network oscillations in vivo,” *Nature Neuroscience*, 7(1), pp. 41–47. Available at: https://doi.org/10.1038/nn1159.

Klausberger, T. *et al.* (2005) “Complementary Roles of Cholecystokinin- and Parvalbumin-Expressing GABAergic Neurons in Hippocampal Network Oscillations,” *The Journal of Neuroscience*, 25(42), pp. 9782–9793. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3269-05.2005.

Klausberger, T. (2009) “GABAergic interneurons targeting dendrites of pyramidal cells in the CA1 area of the hippocampus,” *European Journal of Neuroscience*, 30(6), pp. 947–957. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06913.x.

Klausberger, T. and Somogyi, P. (2008) “Neuronal Diversity and Temporal Dynamics: The Unity of Hippocampal Circuit Operations,” *Science*, 321(5885), pp. 53–57. Available at: https://doi.org/10.1126/science.1149381.

Klink, R. and Alonso, A. (1997) “Morphological characteristics of layer II projection neurons in the rat medial entorhinal cortex,” *Hippocampus*, 7(5), pp. 571–583. Available at: https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(1997)7:5<571::AID-HIPO12>3.0.CO;2-Y.

Kohara, K. *et al.* (2014) “Cell type–specific genetic and optogenetic tools reveal hippocampal CA2 circuits,” *Nature Neuroscience*, 17(2), pp. 269–279. Available at: https://doi.org/10.1038/nn.3614.

Komuro, H. and Rakic, P. (1996) “Intracellular Ca2+ Fluctuations Modulate the Rate of Neuronal Migration,” *Neuron*, 17(2), pp. 275–285. Available at: https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80159-2.

Kowalski, T.J. *et al.* (2004) “Melanin-concentrating hormone-1 receptor antagonism decreases feeding by reducing meal size,” *European Journal of Pharmacology*, 497(1), pp. 41–47. Available at: https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.06.027.

Kriegstein, A. and Alvarez-Buylla, A. (2009) “The Glial Nature of Embryonic and Adult Neural Stem Cells,” *Annual Review of Neuroscience*, 32(1), pp. 149–184. Available at: https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.051508.135600.

Kullmann, D.M. (2011) “Interneuron networks in the hippocampus,” *Current Opinion in Neurobiology*, 21(5), pp. 709–716. Available at: https://doi.org/10.1016/j.conb.2011.05.006.

de La Prida, L.M., Bolea and Sanchez-Andres (1998) “Origin of the synchronized network activity in the rabbit developing hippocampus,” *European Journal of Neuroscience*, 10(3), pp. 899–906. Available at: https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1998.00097.x.

Lahtinen, H. *et al.* (2002) “Postnatal Development of Rat Hippocampal Gamma Rhythm In Vivo,” *Journal of Neurophysiology*, 88(3), pp. 1469–1474. Available at: https://doi.org/10.1152/jn.2002.88.3.1469.

Langston, R.F. *et al.* (2010) “Development of the Spatial Representation System in the Rat,” *Science*, 328(5985), pp. 1576–1580. Available at: https://doi.org/10.1126/science.1188210.

Leão, R.N. *et al.* (2012) “OLM interneurons differentially modulate CA3 and entorhinal inputs to hippocampal CA1 neurons,” *Nature Neuroscience*, 15(11), pp. 1524–1530. Available at: https://doi.org/10.1038/nn.3235.

Leão, R.N. *et al.* (2015) “Interconnection and synchronization of neuronal populations in the mouse medial septum/diagonal band of Broca,” *Journal of Neurophysiology*, 113(3), pp. 971–980. Available at: https://doi.org/10.1152/jn.00367.2014.

Lee, G.H. and D’Arcangelo, G. (2016) “New insights into reelin-mediated signaling pathways,” *Frontiers in Cellular Neuroscience*. Frontiers Media S.A. Available at: https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00122.

Lee, S.-H. *et al.* (2014) “Parvalbumin-Positive Basket Cells Differentiate among Hippocampal Pyramidal Cells,” *Neuron*, 82(5), pp. 1129–1144. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.03.034.

Lega, B. *et al.* (2015) “The gamma band effect for episodic memory encoding is absent in epileptogenic hippocampi,” *Clinical Neurophysiology*, 126(5), pp. 866–872. Available at: https://doi.org/10.1016/j.clinph.2014.07.035.

Leinekugel, X. *et al.* (1997) “Ca2+ Oscillations Mediated by the Synergistic Excitatory Actions of GABAA and NMDA Receptors in the Neonatal Hippocampus,” *Neuron*, 18(2), pp. 243–255. Available at: https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80265-2.

Lemon, N. and Manahan-Vaughan, D. (2012) “Dopamine D1/D5 Receptors Contribute to De Novo Hippocampal LTD Mediated by Novel Spatial Exploration or Locus Coeruleus Activity,” *Cerebral Cortex*, 22(9), pp. 2131–2138. Available at: https://doi.org/10.1093/cercor/bhr297.

Lenck-Santini, P.-P. (2021) “Bad Timing for Epileptic Networks: Role of Temporal Dynamics in Seizures and Cognitive Deficits,” *Epilepsy Currents*, 21(3), pp. 177–182. Available at: https://doi.org/10.1177/15357597211001877.

Lenck-Santini, P.-P. and Holmes, G.L. (2008) “Altered Phase Precession and Compression of Temporal Sequences by Place Cells in Epileptic Rats,” *The Journal of Neuroscience*, 28(19), pp. 5053–5062. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5024-07.2008.

Lenck-Santini, P.-P. and Sakkaki, S. (2020) “Alterations of Neuronal Dynamics as a Mechanism for Cognitive Impairment in Epilepsy,” in, pp. 65–106. Available at: https://doi.org/10.1007/7854_2020_193.

Leprince, E. *et al.* (2023) “Extrinsic control of the early postnatal CA1 hippocampal circuits,” *Neuron*, 111(6), pp. 888-902.e8. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.12.013.

Lever, C. *et al.* (2009) “Boundary Vector Cells in the Subiculum of the Hippocampal Formation,” *The Journal of Neuroscience*, 29(31), pp. 9771–9777. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1319-09.2009.

Li, S. *et al.* (2003a) “Dopamine-dependent facilitation of LTP induction in hippocampal CA1 by exposure to spatial novelty,” *Nature Neuroscience*, 6(5), pp. 526–531. Available at: https://doi.org/10.1038/nn1049.

Li, S. *et al.* (2003b) “Dopamine-dependent facilitation of LTP induction in hippocampal CA1 by exposure to spatial novelty,” *Nature Neuroscience*, 6(5), pp. 526–531. Available at: https://doi.org/10.1038/nn1049.

Li, Y. *et al.* (2017) “A distinct entorhinal cortex to hippocampal CA1 direct circuit for olfactory associative learning,” *Nature Neuroscience*, 20(4), pp. 559–570. Available at: https://doi.org/10.1038/nn.4517.

Lingenh□hl, K. and Finch, D.M. (1991) “Morphological characterization of rat entorhinal neurons in vivo: soma-dendritic structure and axonal domains,” *Experimental Brain Research*, 84(1). Available at: https://doi.org/10.1007/BF00231762.

Lisman, J.E. and Grace, A.A. (2005) “The Hippocampal-VTA Loop: Controlling the Entry of Information into Long-Term Memory,” *Neuron*, 46(5), pp. 703–713. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.05.002.

Llinás, R. and Ribary, U. (1993) “Coherent 40-Hz oscillation characterizes dream state in humans.,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(5), pp. 2078–2081. Available at: https://doi.org/10.1073/pnas.90.5.2078.

Lopez-Pigozzi, D. *et al.* (2016) “Altered Oscillatory Dynamics of CA1 Parvalbumin Basket Cells during Theta–Gamma Rhythmopathies of Temporal Lobe Epilepsy,” *eneuro*, 3(6), p. ENEURO.0284-16.2016. Available at: https://doi.org/10.1523/ENEURO.0284-16.2016.

Luchetti, A. *et al.* (2020) “Two Functionally Distinct Serotonergic Projections into Hippocampus,” *The Journal of Neuroscience*, 40(25), pp. 4936–4944. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2724-19.2020.

Luhmann, H.J. *et al.* (2016) “Spontaneous neuronal activity in developing neocortical networks: From single cells to large-scale interactions,” *Frontiers in Neural Circuits*. Frontiers Media S.A. Available at: https://doi.org/10.3389/fncir.2016.00040.

Luhmann, H.J. and Prince, D.A. (1991) “Postnatal maturation of the GABAergic system in rat neocortex,” *Journal of Neurophysiology*, 65(2), pp. 247–263. Available at: https://doi.org/10.1152/jn.1991.65.2.247.

Luo, X. *et al.* (2020) “Synaptic Mechanisms Underlying the Network State-Dependent Recruitment of VIP-Expressing Interneurons in the CA1 Hippocampus,” *Cerebral Cortex*, 30(6), pp. 3667–3685. Available at: https://doi.org/10.1093/cercor/bhz334.

Maddaloni, G. *et al.* (2017) “Development of Serotonergic Fibers in the Post-Natal Mouse Brain,” *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11. Available at: https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00202.

le Magueresse, C. *et al.* (2006) “Nicotinic modulation of network and synaptic transmission in the immature hippocampus investigated with genetically modified mice,” *The Journal of Physiology*, 576(2), pp. 533–546. Available at: https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.117572.

Manent, J.B. *et al.* (2005) “A noncanonical release of GABA and glutamate modulates neuronal migration,” *Journal of Neuroscience*, 25(19), pp. 4755–4765. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0553-05.2005.

Manent, J.B. *et al.* (2006) “Glutamate acting on AMPA but not NMDA receptors modulates the migration of hippocampal interneurons,” *Journal of Neuroscience*, 26(22), pp. 5901–5909. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1033-06.2006.

Mangale, V.S. *et al.* (2008) “Lhx2 Selector Activity Specifies Cortical Identity and Suppresses Hippocampal Organizer Fate,” *Science*, 319(5861), pp. 304–309. Available at: https://doi.org/10.1126/science.1151695.

Marchionni, I. *et al.* (2010) “Distinctive properties of CXC chemokine receptor 4-expressing Cajal–Retzius cells *versus* GABAergic interneurons of the postnatal hippocampus,” *The Journal of Physiology*, 588(15), pp. 2859–2878. Available at: https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.190868.

Marchionni, I. *et al.* (2019) “Ripple-related firing of identified deep CA1 pyramidal cells in chronic temporal lobe epilepsy in mice,” *Epilepsia Open*, 4(2), pp. 254–263. Available at: https://doi.org/10.1002/epi4.12310.

Marguet, S.L. *et al.* (2015) “Treatment during a vulnerable developmental period rescues a genetic epilepsy,” *Nature Medicine*, 21(12), pp. 1436–1444. Available at: https://doi.org/10.1038/nm.3987.

Marín, O. and Rubenstein, J.L.R. (2003) “C <scp>ELL</scp> M <scp>IGRATION IN THE</scp> F <scp>OREBRAIN</scp>,” *Annual Review of Neuroscience*, 26(1), pp. 441–483. Available at: https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.26.041002.131058.

Marques-Smith, A. *et al.* (2016) “A Transient Translaminar GABAergic Interneuron Circuit Connects Thalamocortical Recipient Layers in Neonatal Somatosensory Cortex,” *Neuron*, 89(3), pp. 536–549. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.01.015.

Martini, F.J. *et al.* (2021) “Spontaneous activity in developing thalamic and cortical sensory networks,” *Neuron*. Cell Press, pp. 2519–2534. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.06.026.

Marty, S. *et al.* (2002) “Postnatal maturation of Na^+, K^+, $2Cl^-$ cotransporter expression and inhibitory synaptogenesis in the rat hippocampus: an immunocytochemical analysis,” *European Journal of Neuroscience*, 15(2), pp. 233–245. Available at: https://doi.org/10.1046/j.0953-816x.2001.01854.x.

Masurkar, A. v. *et al.* (2017) “Medial and Lateral Entorhinal Cortex Differentially Excite Deep versus Superficial CA1 Pyramidal Neurons,” *Cell Reports*, 18(1), pp. 148–160. Available at: https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.012.

Mathiasen, M.L. *et al.* (2019) “Separate cortical and hippocampal cell populations target the rat nucleus reuniens and mammillary bodies,” *European Journal of Neuroscience*, 49(12), pp. 1649–1672. Available at: https://doi.org/10.1111/ejn.14341.

Matsumoto, N., Kitanishi, T. and Mizuseki, K. (2019) “The subiculum: Unique hippocampal hub and more,” *Neuroscience Research*, 143, pp. 1–12. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neures.2018.08.002.

McKenna, J.T. and Vertes, R.P. (2004) “Afferent projections to nucleus reuniens of the thalamus,” *Journal of Comparative Neurology*, 480(2), pp. 115–142. Available at: https://doi.org/10.1002/cne.20342.

McNamara, C.G. *et al.* (2014) “Dopaminergic neurons promote hippocampal reactivation and spatial memory persistence,” *Nature Neuroscience*, 17(12), pp. 1658–1660. Available at: https://doi.org/10.1038/nn.3843.

Melzer, S. *et al.* (2012) “Long-Range–Projecting GABAergic Neurons Modulate Inhibition in Hippocampus and Entorhinal Cortex,” *Science*, 335(6075), pp. 1506–1510. Available at: https://doi.org/10.1126/science.1217139.

Melzer, S. and Monyer, H. (2020) “Diversity and function of corticopetal and corticofugal GABAergic projection neurons,” *Nature Reviews Neuroscience*, 21(9), pp. 499–515. Available at: https://doi.org/10.1038/s41583-020-0344-9.

Meyer, G. *et al.* (2002) “Expression of p73 and Reelin in the Developing Human Cortex,” *The Journal of Neuroscience*, 22(12), pp. 4973–4986. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-12-04973.2002.

Michael Wyss, J. (1981) “An autoradiographic study of the efferent connections of the entorhinal cortex in the rat,” *Journal of Comparative Neurology*, 199(4), pp. 495–512. Available at: https://doi.org/10.1002/cne.901990405.

Miyoshi, G. *et al.* (2007) “Physiologically Distinct Temporal Cohorts of Cortical Interneurons Arise from Telencephalic *Olig2* -Expressing Precursors,” *The Journal of Neuroscience*, 27(29), pp. 7786–7798. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1807-07.2007.

Miyoshi, G. *et al.* (2010) “Genetic Fate Mapping Reveals That the Caudal Ganglionic Eminence Produces a Large and Diverse Population of Superficial Cortical Interneurons,” *The Journal of Neuroscience*, 30(5), pp. 1582–1594. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4515-09.2010.

Mizuseki, K. *et al.* (2011) “Hippocampal CA1 pyramidal cells form functionally distinct sublayers,” *Nature Neuroscience*, 14(9), pp. 1174–1181. Available at: https://doi.org/10.1038/nn.2894.

Mòdol, L. *et al.* (2017) “Spatial Embryonic Origin Delineates GABAergic Hub Neurons Driving Network Dynamics in the Developing Entorhinal Cortex,” *Cerebral Cortex*, 27(9), pp. 4649–4661. Available at: https://doi.org/10.1093/cercor/bhx198.

Mohajerani, M.H. *et al.* (2007) “Correlated network activity enhances synaptic efficacy via BDNF and the ERK pathway at immature CA3–CA1 connections in the hippocampus,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(32), pp. 13176–13181. Available at: https://doi.org/10.1073/pnas.0704533104.

Mohns, E.J. and Blumberg, M.S. (2008) “Synchronous bursts of neuronal activity in the developing hippocampus: Modulation by active sleep and association with emerging gamma and theta rhythms,” *Journal of Neuroscience*, 28(40), pp. 10134–10144. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1967-08.2008.

Mohns, E.J. and Blumberg, M.S. (2010) “Neocortical activation of the hippocampus during sleep in infant rats,” *Journal of Neuroscience*, 30(9), pp. 3438–3449. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4832-09.2010.

Mohns, E.J., Karlsson, K.Æ. and Blumberg, M.S. (2007) “Developmental emergence of transient and persistent hippocampal events and oscillations and their association with infant seizure susceptibility,” *European Journal of Neuroscience*, 26(10), pp. 2719–2730. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05928.x.

Montgomery, S.M. and Buzsáki, G. (2007) “Gamma oscillations dynamically couple hippocampal CA3 and CA1 regions during memory task performance,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(36), pp. 14495–14500. Available at: https://doi.org/10.1073/pnas.0701826104.

Montijn, J.S. *et al.* (2020) “ZETA: a parameter-free statistical test for neuronal responsiveness.” Available at: https://doi.org/10.1101/2020.09.24.311118.

Monuki, E.S., Porter, F.D. and Walsh, C.A. (2001) “Patterning of the Dorsal Telencephalon and Cerebral Cortex by a Roof Plate-Lhx2 Pathway,” *Neuron*, 32(4), pp. 591–604. Available at: https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00504-9.

Morales, G.J. *et al.* (2007) “Analysis of the Actions of Nucleus Reuniens and the Entorhinal Cortex on EEG and Evoked Population Behavior of the Hippocampus,” in *2007 29th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*. IEEE, pp. 2480–2484. Available at: https://doi.org/10.1109/IEMBS.2007.4352831.

Morozov, Y.M. and Freund, T.F. (2003) “Postnatal development and migration of cholecystokinin-immunoreactive interneurons in rat hippocampus,” *Neuroscience*, 120(4), pp. 923–939. Available at: https://doi.org/10.1016/S0306-4522(03)00409-3.

Morris, R.G.M. *et al.* (1982) “Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions,” *Nature*, 297(5868), pp. 681–683. Available at: https://doi.org/10.1038/297681a0.

Moudy, A.M., Kunkel, D.D. and Schwartzkroin, P.A. (1993) “Development of dopamine-beta hydroxylase—positive fiber innervation of the rat hippocampus,” *Synapse*, 15(4), pp. 307–318. Available at: https://doi.org/10.1002/syn.890150407.

Muessig, L. *et al.* (2019) “Coordinated Emergence of Hippocampal Replay and Theta Sequences during Post-natal Development,” *Current Biology*, 29(5), pp. 834-840.e4. Available at: https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.01.005.

Muller, R., Kubie, J. and Ranck, J. (1987) “Spatial firing patterns of hippocampal complex-spike cells in a fixed environment,” *The Journal of Neuroscience*, 7(7), pp. 1935–1950. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.07-07-01935.1987.

Muller, R.U., Ranck, J.B. and Taube, J.S. (1996) “Head direction cells: properties and functional significance,” *Current Opinion in Neurobiology*, 6(2), pp. 196–206. Available at: https://doi.org/10.1016/S0959-4388(96)80073-0.

Murase, S. (2014) “A New Model for Developmental Neuronal Death and Excitatory/Inhibitory Balance in Hippocampus,” *Molecular Neurobiology*, 49(1), pp. 316–325. Available at: https://doi.org/10.1007/s12035-013-8521-8.

Murata, Y. and Colonnese, M.T. (2020) *GABAergic interneurons excite neonatal hippocampus in vivo*.

Noctor, S.C. *et al.* (2001) “Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex,” *Nature*, 409(6821), pp. 714–720. Available at: https://doi.org/10.1038/35055553.

Nurse, S. (1999) “Late maturation of GABAB synaptic transmission in area CA1 of the rat hippocampus,” *Neuropharmacology*, 38(11), pp. 1733–1742. Available at: https://doi.org/10.1016/S0028-3908(99)00122-7.

O’Donovan, M.J. (1999) “The origin of spontaneous activity in developing networks of the vertebrate nervous system,” *Current Opinion in Neurobiology*, 9(1), pp. 94–104. Available at: https://doi.org/10.1016/S0959-4388(99)80012-9.

O’Keefe, J. (1976) “Place units in the hippocampus of the freely moving rat,” *Experimental Neurology*, 51(1), pp. 78–109. Available at: https://doi.org/10.1016/0014-4886(76)90055-8.

O’Keefe, J. and Dostrovsky, J. (1971) “The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat,” *Brain Research*, 34(1), pp. 171–175. Available at: https://doi.org/10.1016/0006-8993(71)90358-1.

Oliva, A. *et al.* (2016) “Role of Hippocampal CA2 Region in Triggering Sharp-Wave Ripples,” *Neuron*, 91(6), pp. 1342–1355. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.08.008.

O’Mara, S. (2005) “The subiculum: what it does, what it might do, and what neuroanatomy has yet to tell us,” *Journal of Anatomy*, 207(3), pp. 271–282. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2005.00446.x.

Owens, D.F. *et al.* (2000) *Calcium Dynamics of Neocortical Ventricular Zone Cells*, *Dev Neurosci*.

Parra, P., Gulyás, A.I. and Miles, R. (1998) “How Many Subtypes of Inhibitory Cells in the Hippocampus?,” *Neuron*, 20(5), pp. 983–993. Available at: https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80479-1.

Pawelzik, H., Hughes, D.I. and Thomson, A.M. (2002) “Physiological and morphological diversity of immunocytochemically defined parvalbumin- and cholecystokinin-positive interneurones in CA1 of the adult rat hippocampus,” *Journal of Comparative Neurology*, 443(4), pp. 346–367. Available at: https://doi.org/10.1002/cne.10118.

Pelkey, K.A. *et al.* (2017) “Hippocampal GABAergic Inhibitory Interneurons,” *Physiological Reviews*, 97(4), pp. 1619–1747. Available at: https://doi.org/10.1152/physrev.00007.2017.

Petersson, P. *et al.* (2003) “Spontaneous muscle twitches during sleep guide spinal self-organization,” *Nature*, 424(6944), pp. 72–75. Available at: https://doi.org/10.1038/nature01719.

Petrovich, G.D., Risold, P.Y. and Swanson, L.W. (1996) “Organization of projections from the basomedial nucleus of the amygdala: A PHAL study in the rat,” *The Journal of Comparative Neurology*, 374(3), pp. 387–420. Available at: https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19961021)374:3<387::AID-CNE6>3.0.CO;2-Y.

Pfeiffer, B.E. and Foster, D.J. (2013) “Hippocampal place-cell sequences depict future paths to remembered goals,” *Nature*, 497(7447), pp. 74–79. Available at: https://doi.org/10.1038/nature12112.

Phillips, R.G. and LeDoux, J.E. (1992) “Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning.,” *Behavioral Neuroscience*, 106(2), pp. 274–285. Available at: https://doi.org/10.1037/0735-7044.106.2.274.

Picardo, M.A. *et al.* (2011) “Pioneer GABA cells comprise a subpopulation of hub neurons in the developing hippocampus,” *Neuron*, 71(4), pp. 695–709. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.06.018.

Pikkarainen, M. *et al.* (1999) “Projections from the lateral, basal, and accessory basal nuclei of the amygdala to the hippocampal formation in rat.,” *The Journal of comparative neurology*, 403(2), pp. 229–60.

Pin, J.-P. and Acher, F. (2002) “The Metabotropic Glutamate Receptors: Structure, Activation Mechanism and Pharmacology,” *Current Drug Target -CNS & Neurological Disorders*, 1(3), pp. 297–317. Available at: https://doi.org/10.2174/1568007023339328.

PITKÄNEN, A. *et al.* (2000) “Reciprocal Connections between the Amygdala and the Hippocampal Formation, Perirhinal Cortex, and Postrhinal Cortex in Rat: A Review,” *Annals of the New York Academy of Sciences*, 911(1), pp. 369–391. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06738.x.

Pleasure, S.J. *et al.* (2000) “Cell Migration from the Ganglionic Eminences Is Required for the Development of Hippocampal GABAergic Interneurons,” *Neuron*, 28(3), pp. 727–740. Available at: https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)00149-5.

Pochinok, I. *et al.* (2023) “A developmental increase of inhibition promotes the emergence of hippocampal ripples.” Available at: https://doi.org/10.1101/2023.08.11.552951.

Porcher, C., Medina, I. and Gaiarsa, J.L. (2018a) “Mechanism of BDNF modulation in GABAergic synaptic transmission in healthy and disease brains,” *Frontiers in Cellular Neuroscience*. Frontiers Media S.A. Available at: https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00273.

Porcher, C., Medina, I. and Gaiarsa, J.L. (2018b) “Mechanism of BDNF modulation in GABAergic synaptic transmission in healthy and disease brains,” *Frontiers in Cellular Neuroscience*. Frontiers Media S.A. Available at: https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00273.

Povysheva, N. v. *et al.* (2013) “Electrophysiological Heterogeneity of Fast-Spiking Interneurons: Chandelier versus Basket Cells,” *PLoS ONE*, 8(8), p. e70553. Available at: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070553.

Price, C.J. *et al.* (2005) “Neurogliaform Neurons Form a Novel Inhibitory Network in the Hippocampal CA1 Area,” *The Journal of Neuroscience*, 25(29), pp. 6775–6786. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1135-05.2005.

Priya, R. *et al.* (2018) “Activity Regulates Cell Death within Cortical Interneurons through a Calcineurin-Dependent Mechanism,” *Cell Reports*, 22(7), pp. 1695–1709. Available at: https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.01.007.

Pyapali, G.K. *et al.* (1998) “Dendritic properties of hippocampal CA1 pyramidal neurons in the rat: Intracellular staining in vivo and in vitro,” *The Journal of Comparative Neurology*, 391(3), pp. 335–352. Available at: https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19980216)391:3<335::AID-CNE4>3.0.CO;2-2.

Quattrocolo, G. and Maccaferri, G. (2013) “Novel GABAergic circuits mediating excitation/inhibition of Cajal-Retzius cells in the developing hippocampus,” *Journal of Neuroscience*, 33(13), pp. 5486–5498. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5680-12.2013.

Quattrocolo, G. and Maccaferri, G. (2014) “Optogenetic activation of cajal-retzius cells reveals their glutamatergic output and a novel feedforward circuit in the developing mouse hippocampus,” *Journal of Neuroscience*, 34(39), pp. 13018–13032. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1407-14.2014.

Rajasethupathy, P. *et al.* (2015) “Projections from neocortex mediate top-down control of memory retrieval,” *Nature*, 526(7575), pp. 653–659. Available at: https://doi.org/10.1038/nature15389.

Reiner, A. and Levitz, J. (2018) “Glutamatergic Signaling in the Central Nervous System: Ionotropic and Metabotropic Receptors in Concert,” *Neuron*, 98(6), pp. 1080–1098. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.05.018.

Represa, A. and Ben-Ari, Y. (2005) “Trophic actions of GABA on neuronal development,” *Trends in Neurosciences*. Elsevier Ltd, pp. 278–283. Available at: https://doi.org/10.1016/j.tins.2005.03.010.

Richard, G.R. *et al.* (2013) “Speed modulation of hippocampal theta frequency correlates with spatial memory performance,” *Hippocampus*, 23(12), pp. 1269–1279. Available at: https://doi.org/10.1002/hipo.22164.

del Río, J.A. *et al.* (1997) “A role for Cajal–Retzius cells and reelin in the development of hippocampal connections,” *Nature*, 385(6611), pp. 70–74. Available at: https://doi.org/10.1038/385070a0.

Risold, P.Y. and Swanson, L.W. (1997) “Connections of the rat lateral septal complex 1Published on the World Wide Web on 2 June 1997. 1,” *Brain Research Reviews*, 24(2–3), pp. 115–195. Available at: https://doi.org/10.1016/S0165-0173(97)00009-X.

Rivera, C. *et al.* (1999) “The K+/Cl− co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation,” *Nature*, 397(6716), pp. 251–255. Available at: https://doi.org/10.1038/16697.

del Río, J.A. *et al.* (1996) “Differential Survival of Cajal–Retzius Cells in Organotypic Cultures of Hippocampus and Neocortex,” *The Journal of Neuroscience*, 16(21), pp. 6896–6907. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-21-06896.1996.

Roux, L. *et al.* (2014) “In vivo optogenetic identification and manipulation of GABAergic interneuron subtypes,” *Current Opinion in Neurobiology*, pp. 88–95. Available at: https://doi.org/10.1016/j.conb.2013.12.013.

Roux, L. and Buzsáki, G. (2015) “Tasks for inhibitory interneurons in intact brain circuits,” *Neuropharmacology*, 88, pp. 10–23. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.09.011.

Roy, A. *et al.* (2017) “Prefrontal-hippocampal coupling by theta rhythm and by 2–5 Hz oscillation in the delta band: The role of the nucleus reuniens of the thalamus,” *Brain Structure and Function*, 222(6), pp. 2819–2830. Available at: https://doi.org/10.1007/s00429-017-1374-6.

Royer, S. *et al.* (2010) “Multi-array silicon probes with integrated optical fibers: light-assisted perturbation and recording of local neural circuits in the behaving animal,” *Eur J Neurosci.* [Preprint].

Rubenstein, J.L.R. and Merzenich, M.M. (2003) “Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems,” *Genes, Brain and Behavior*, 2(5), pp. 255–267. Available at: https://doi.org/10.1034/j.1601-183X.2003.00037.x.

Sánchez-Aguilera, A. *et al.* (2020) “Development of Action Potential Waveform in Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons,” *Neuroscience*, 442, pp. 151–167. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.06.042.

Sargolini, F. *et al.* (2006) “Conjunctive Representation of Position, Direction, and Velocity in Entorhinal Cortex,” *Science*, 312(5774), pp. 758–762. Available at: https://doi.org/10.1126/science.1125572.

Save, L., Baude, A. and Cossart, R. (2019) “Temporal Embryonic Origin Critically Determines Cellular Physiology in the Dentate Gyrus,” *Cerebral Cortex*, 29(6), pp. 2639–2652. Available at: https://doi.org/10.1093/cercor/bhy132.

Sederberg, P.B. *et al.* (2003) “Theta and Gamma Oscillations during Encoding Predict Subsequent Recall,” *The Journal of Neuroscience*, 23(34), pp. 10809–10814. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-34-10809.2003.

Sederberg, P.B. *et al.* (2006) “Hippocampal and Neocortical Gamma Oscillations Predict Memory Formation in Humans,” *Cerebral Cortex*, 17(5), pp. 1190–1196. Available at: https://doi.org/10.1093/cercor/bhl030.

Sernagor, E. (2010) “GABAergic control of neurite outgrowth and remodeling during development and adult neurogenesis: general rules and differences in diverse systems,” *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 4. Available at: https://doi.org/10.3389/fncel.2010.00011.

Sesack, S.R. *et al.* (1989) “Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: An anterograde tract-tracing study with *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin,” *Journal of Comparative Neurology*, 290(2), pp. 213–242. Available at: https://doi.org/10.1002/cne.902900205.

Sheffield, M.E.J. *et al.* (2013) “Mechanisms of retroaxonal barrage firing in hippocampal interneurons,” *The Journal of Physiology*, 591(19), pp. 4793–4805. Available at: https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.258418.

Shuman, T. *et al.* (2020) “Breakdown of spatial coding and interneuron synchronization in epileptic mice,” *Nature Neuroscience*, 23(2), pp. 229–238. Available at: https://doi.org/10.1038/s41593-019-0559-0.

Sik, A. *et al.* (1994) “Inhibitory CA1-CA3-Hilar Region Feedback in the Hippocampus,” *Science*, 265(5179), pp. 1722–1724. Available at: https://doi.org/10.1126/science.8085161.

Sik, A. *et al.* (1995) “Hippocampal CA1 interneurons: an in vivo intracellular labeling study,” *The Journal of Neuroscience*, 15(10), pp. 6651–6665. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-10-06651.1995.

Sipilä, S.T. *et al.* (2005) “Depolarizing GABA Acts on Intrinsically Bursting Pyramidal Neurons to Drive Giant Depolarizing Potentials in the Immature Hippocampus,” *The Journal of Neuroscience*, 25(22), pp. 5280–5289. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0378-05.2005.

Sipilä, S.T. *et al.* (2006) “Intrinsic bursting of immature CA3 pyramidal neurons and consequent giant depolarizing potentials are driven by a persistent Na^+ current and terminated by a slow Ca^{2+} -activated K^+ current,” *European Journal of Neuroscience*, 23(9), pp. 2330–2338. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04757.x.

Skaggs, W.E. *et al.* (1996) “Theta phase precession in hippocampal neuronal populations and the compression of temporal sequences,” *Hippocampus*, 6(2), pp. 149–172. Available at: https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(1996)6:2<149::AID-HIPO6>3.0.CO;2-K.

Slomianka, L. (1992) “Neurons of origin of zinc-containing pathways and the distribution of zinc-containing boutons in the hippocampal region of the rat,” *Neuroscience*, 48(2), pp. 325–352. Available at: https://doi.org/10.1016/0306-4522(92)90494-M.

Slomianka, L. *et al.* (2011) “Hippocampal pyramidal cells: the reemergence of cortical lamination,” *Brain Structure and Function*, 216(4), pp. 301–317. Available at: https://doi.org/10.1007/s00429-011-0322-0.

Soltesz, I. and Losonczy, A. (2018) “CA1 pyramidal cell diversity enabling parallel information processing in the hippocampus,” *Nature Neuroscience*. Nature Publishing Group, pp. 484–493. Available at: https://doi.org/10.1038/s41593-018-0118-0.

Somogyi, J. *et al.* (2004) “GABAergic basket cells expressing cholecystokinin contain vesicular glutamate transporter type 3 (VGLUT3) in their synaptic terminals in hippocampus and isocortex of the rat,” *European Journal of Neuroscience*, 19(3), pp. 552–569. Available at: https://doi.org/10.1111/j.0953-816X.2003.03091.x.

Somogyi, J. *et al.* (2012) “Molecular analysis of ivy cells of the hippocampal CA1 stratum radiatum using spectral identification of immunofluorophores,” *Frontiers in Neural Circuits*, 6. Available at: https://doi.org/10.3389/fncir.2012.00035.

Somogyi, P. *et al.* (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), pp. 137–142. Available at: https://doi.org/10.1016/0006-8993(83)91076-4.

Somogyi, P. *et al.* (1985) “Identified axo-axonic cells are immunoreactive for GABA in the hippocampus visual cortex of the cat,” *Brain Research*, 332(1), pp. 143–149. Available at: https://doi.org/10.1016/0006-8993(85)90397-X.

Somogyi, P. *et al.* (2014a) “Temporal redistribution of inhibition over neuronal subcellular domains underlies state-dependent rhythmic change of excitability in the hippocampus,” *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1635), p. 20120518. Available at: https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0518.

Somogyi, P. *et al.* (2014b) “Temporal redistribution of inhibition over neuronal subcellular domains underlies state-dependent rhythmic change of excitability in the hippocampus,” *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1635), p. 20120518. Available at: https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0518.

Somogyi, P. and Klausberger, T. (2005) “Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus,” *The Journal of Physiology*, 562(1), pp. 9–26. Available at: https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.078915.

Soriano, E. and del Río, J.A. (2005) “The cells of cajal-retzius: Still a mystery one century after,” *Neuron*, pp. 389–394. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.04.019.

Southwell, D.G. *et al.* (2012) “Intrinsically determined cell death of developing cortical interneurons,” *Nature*, 491(7422), pp. 109–113. Available at: https://doi.org/10.1038/nature11523.

Spitzer, N.C. (2006) “Electrical activity in early neuronal development,” *Nature*. Nature Publishing Group, pp. 707–712. Available at: https://doi.org/10.1038/nature05300.

Squarzoni, P. (2015) “Neuronal and microglial regulators of cortical wiring: usual and novel guideposts,” *Frontiers in Neuroscience*, 9. Available at: https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00248.

Stanfield, B.B. and Cowan, W.M. (1979) “The development of the hippocampus and dentate gyrus in normal and reeler mice,” *Journal of Comparative Neurology*, 185(3), pp. 423–459. Available at: https://doi.org/10.1002/cne.901850303.

Stark, E. *et al.* (2013) “Inhibition-Induced Theta Resonance in Cortical Circuits,” *Neuron*, 80(5), pp. 1263–1276. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.09.033.

Steward, O. (1976) “Topographic organization of the projections from the entorhinal area to the hippocampal formation of the rat,” *Journal of Comparative Neurology*, 167(3), pp. 285–314. Available at: https://doi.org/10.1002/cne.901670303.

Strange, B.A. *et al.* (2014) “Functional organization of the hippocampal longitudinal axis,” *Nature Reviews Neuroscience*, 15(10), pp. 655–669. Available at: https://doi.org/10.1038/nrn3785.

van Strien, N.M., Cappaert, N.L.M. and Witter, M.P. (2009) “The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal–hippocampal network,” *Nature Reviews Neuroscience*, 10(4), pp. 272–282. Available at: https://doi.org/10.1038/nrn2614.

Subramanian, L. and Tole, S. (2009) “Mechanisms Underlying the Specification, Positional Regulation, and Function of the Cortical Hem,” *Cerebral Cortex*, 19(suppl 1), pp. i90–i95. Available at: https://doi.org/10.1093/cercor/bhp031.

Sun, Y. *et al.* (2014) “Cell-Type-Specific Circuit Connectivity of Hippocampal CA1 Revealed through Cre-Dependent Rabies Tracing,” *Cell Reports*, 7(1), pp. 269–280. Available at: https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.02.030.

Sun, Y. *et al.* (2018) “Opposing and Complementary Topographic Connectivity Gradients Revealed by Quantitative Analysis of Canonical and Noncanonical Hippocampal CA1 Inputs,” *eneuro*, 5(1), p. ENEURO.0322-17.2018. Available at: https://doi.org/10.1523/ENEURO.0322-17.2018.

Supè, H. *et al.* (1998) *Involvement of Distinct Pioneer Neurons in the Formation of Layer-Specific Connections in the Hippocampus*.

Supèr, H. and Soriano, E. (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), pp. 101–120. Available at: https://doi.org/10.1002/cne.903440108.

Sussel, L. *et al.* (1999) “Loss of *Nkx2.1* homeobox gene function results in a ventral to dorsal molecular respecification within the basal telencephalon: evidence for a transformation of the pallidum into the striatum,” *Development*, 126(15), pp. 3359–3370. Available at: https://doi.org/10.1242/dev.126.15.3359.

Suzuki, S.S. and Smith, G.K. (1987) “Spontaneous EEG spikes in the normal hippocampus. I. Behavioral correlates, laminar profiles and bilateral synchrony,” *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 67(4), pp. 348–359. Available at: https://doi.org/10.1016/0013-4694(87)90123-4.

Swanson, L.W. and Cowan, W.M. (1979) “The connections of the septal region in the rat,” *Journal of Comparative Neurology*, 186(4), pp. 621–655. Available at: https://doi.org/10.1002/cne.901860408.

Swanson, L.W., Sawchenko, P.E. and Cowan, W.M. (1980) “Evidence that the commissural, associational and septal projections of the regio inferior of the hippocampus arise from the same neurons,” *Brain Research*, 197(1), pp. 207–212. Available at: https://doi.org/10.1016/0006-8993(80)90446-1.

Tahvildari, B. and Alonso, A. (2005) “Morphological and electrophysiological properties of lateral entorhinal cortex layers II and III principal neurons,” *The Journal of Comparative Neurology*, 491(2), pp. 123–140. Available at: https://doi.org/10.1002/cne.20706.

Takiguchi-Hayashi, K. *et al.* (2004) “Generation of Reelin-Positive Marginal Zone Cells from the Caudomedial Wall of Telencephalic Vesicles,” *The Journal of Neuroscience*, 24(9), pp. 2286–2295. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4671-03.2004.

Taniguchi, H., Lu, J. and Huang, Z.J. (2013) “The Spatial and Temporal Origin of Chandelier Cells in Mouse Neocortex,” *Science*, 339(6115), pp. 70–74. Available at: https://doi.org/10.1126/science.1227622.

Taube, J., Muller, R. and Ranck, J. (1990) “Head-direction cells recorded from the postsubiculum in freely moving rats. I. Description and quantitative analysis,” *The Journal of Neuroscience*, 10(2), pp. 420–435. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.10-02-00420.1990.

Taylor, J. and Gordon-Weeks, P.R. (1991) “Calcium-Independent γ-Aminobutyric Acid Release from Growth Cones: Role of γ-Aminobutyric Acid Transport,” *Journal of Neurochemistry*, 56(1), pp. 273–280. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1991.tb02592.x.

Tempio, A. *et al.* (2023) “Fragile X Syndrome as an interneuronopathy: a lesson for future studies and treatments,” *Frontiers in Neuroscience*, 17. Available at: https://doi.org/10.3389/fnins.2023.1171895.

Thompson, L.T. and Best, P.J. (1990) “Long-term stability of the place-field activity of single units recorded from the dorsal hippocampus of freely behaving rats,” *Brain Research*, 509(2), pp. 299–308. Available at: https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)90555-P.

Tolman, E.C. (1948) “Cognitive maps in rats and men.,” *Psychological Review*, 55(4), pp. 189–208. Available at: https://doi.org/10.1037/h0061626.

Tolman, E.C., Ritchie, B.F. and Kalish, D. (1946) “Studies in spatial learning. I. Orientation and the short-cut.,” *Journal of Experimental Psychology*, 36(1), pp. 13–24. Available at: https://doi.org/10.1037/h0053944.

Tomás Pereira, I., Agster, K.L. and Burwell, R.D. (2016) “Subcortical connections of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat. I. afferents,” *Hippocampus*, 26(9), pp. 1189–1212. Available at: https://doi.org/10.1002/hipo.22603.

Tóth, K., Freund, T.F. and Miles, R. (1997) “Disinhibition of rat hippocampal pyramidal cells by GABAergic afferents from the septum.,” *The Journal of Physiology*, 500(2), pp. 463–474. Available at: https://doi.org/10.1113/jphysiol.1997.sp022033.

Touzot, A. *et al.* (2016) “Molecular control of two novel migratory paths for CGE-derived interneurons in the developing mouse brain,” *Development* [Preprint]. Available at: https://doi.org/10.1242/dev.131102.

Tricoire, L. *et al.* (2010) “Common Origins of Hippocampal Ivy and Nitric Oxide Synthase Expressing Neurogliaform Cells,” *The Journal of Neuroscience*, 30(6), pp. 2165–2176. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5123-09.2010.

Tricoire, L. *et al.* (2011) “A Blueprint for the Spatiotemporal Origins of Mouse Hippocampal Interneuron Diversity,” *Journal of Neuroscience*, 31(30), pp. 10948–10970. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0323-11.2011.

Tukker, J.J. *et al.* (2007) “Cell Type-Specific Tuning of Hippocampal Interneuron Firing during Gamma Oscillations *In Vivo*,” *The Journal of Neuroscience*, 27(31), pp. 8184–8189. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1685-07.2007.

Tuncdemir, S.N. *et al.* (2016) “Early Somatostatin Interneuron Connectivity Mediates the Maturation of Deep Layer Cortical Circuits,” *Neuron*, 89(3), pp. 521–535. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.11.020.

Tyssowski, K.M. *et al.* (2018) “Different Neuronal Activity Patterns Induce Different Gene Expression Programs,” *Neuron*, 98(3), pp. 530-546.e11. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.04.001.

Tyzio, R. *et al.* (1999) *The Establishment of GABAergic and Glutamatergic Synapses on CA1 Pyramidal Neurons is Sequential and Correlates with the Development of the Apical Dendrite*.

Tyzio, R. *et al.* (2006) “Maternal Oxytocin Triggers a Transient Inhibitory Switch in GABA Signaling in the Fetal Brain During Delivery,” *Science*, 314(5806), pp. 1788–1792. Available at: https://doi.org/10.1126/science.1133212.

Tyzio, R. *et al.* (2014) “Oxytocin-Mediated GABA Inhibition During Delivery Attenuates Autism Pathogenesis in Rodent Offspring,” *Science*, 343(6171), pp. 675–679. Available at: https://doi.org/10.1126/science.1247190.

UrbÃ¡n, N. and Guillemot, F. (2014) “Neurogenesis in the embryonic and adult brain: same regulators, different roles,” *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8. Available at: https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00396.

Valeeva, G. *et al.* (2010) “Temporal coding at the immature depolarizing gabaergic synapse,” *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 4(JUL). Available at: https://doi.org/10.3389/fncel.2010.00017.

Valeeva, G. *et al.* (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), pp. 5961–5973. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3482-15.2016.

Valeeva, G. *et al.* (2019) “Emergence of Coordinated Activity in the Developing Entorhinal-Hippocampal Network,” *Cerebral Cortex*, 29(2), pp. 906–920. Available at: https://doi.org/10.1093/cercor/bhy309.

Valero, M. *et al.* (2015) “Determinants of different deep and superficial CA1 pyramidal cell dynamics during sharp-wave ripples,” *Nature Neuroscience*, 18(9), pp. 1281–1290. Available at: https://doi.org/10.1038/nn.4074.

Valero, M. and de la Prida, L.M. (2018) “The hippocampus in depth: a sublayer-specific perspective of entorhinal–hippocampal function,” *Current Opinion in Neurobiology*. Elsevier Ltd, pp. 107–114. Available at: https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.04.013.

Vanderwolf, C.H. (1969) “Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat,” *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 26(4), pp. 407–418. Available at: https://doi.org/10.1016/0013-4694(69)90092-3.

Varela, C. *et al.* (2014) “Anatomical substrates for direct interactions between hippocampus, medial prefrontal cortex, and the thalamic nucleus reuniens,” *Brain Structure and Function*, 219(3), pp. 911–929. Available at: https://doi.org/10.1007/s00429-013-0543-5.

Varga, V. *et al.* (2009) “Fast Synaptic Subcortical Control of Hippocampal Circuits,” *Science*, 326(5951), pp. 449–453. Available at: https://doi.org/10.1126/science.1178307.

van de Ven, G.M. *et al.* (2016) “Hippocampal Offline Reactivation Consolidates Recently Formed Cell Assembly Patterns during Sharp Wave-Ripples,” *Neuron*, 92(5), pp. 968–974. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.10.020.

Verheugen, J.A.H., Fricker, D. and Miles, R. (1999) “Noninvasive Measurements of the Membrane Potential and GABAergic Action in Hippocampal Interneurons,” *The Journal of Neuroscience*, 19(7), pp. 2546–2555. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-07-02546.1999.

Vertes, R.P. (2002) “Analysis of projections from the medial prefrontal cortex to the thalamus in the rat, with emphasis on nucleus reuniens,” *Journal of Comparative Neurology*, 442(2), pp. 163–187. Available at: https://doi.org/10.1002/cne.10083.

Vertes, R.P. (2004) “Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat,” *Synapse*, 51(1), pp. 32–58. Available at: https://doi.org/10.1002/syn.10279.

Vertes, R.P. *et al.* (2006) “Efferent projections of reuniens and rhomboid nuclei of the thalamus in the rat,” *Journal of Comparative Neurology*, 499(5), pp. 768–796. Available at: https://doi.org/10.1002/cne.21135.

Vida, I. *et al.* (1998) “Unitary IPSPs evoked by interneurons at the stratum radiatum-stratum lacunosum-moleculare border in the CA1 area of the rat hippocampus *in vitro*,” *The Journal of Physiology*, 506(3), pp. 755–773. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1998.755bv.x.

Viena, T.D. *et al.* (2021) “Calretinin and calbindin architecture of the midline thalamus associated with prefrontal–hippocampal circuitry,” *Hippocampus*, 31(7), pp. 770–789. Available at: https://doi.org/10.1002/hipo.23271.

Villette, V. *et al.* (2015) “Internally Recurring Hippocampal Sequences as a Population Template of Spatiotemporal Information,” *Neuron*, 88(2), pp. 357–366. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.09.052.

Villette, V. *et al.* (2016) “Development of early-born γ-Aminobutyric acid hub neurons in mouse hippocampus from embryogenesis to adulthood,” *Journal of Comparative Neurology*, 524(12), pp. 2440–2461. Available at: https://doi.org/10.1002/cne.23961.

Wang, Y. *et al.* (2015) “Theta sequences are essential for internally generated hippocampal firing fields,” *Nature Neuroscience*, 18(2), pp. 282–288. Available at: https://doi.org/10.1038/nn.3904.

Warm, D. *et al.* (2022) “Spontaneous Activity Predicts Survival of Developing Cortical Neurons,” *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10. Available at: https://doi.org/10.3389/fcell.2022.937761.

Weir, K. *et al.* (2015) “Comparison of spike parameters from optically identified GABAergic and glutamatergic neurons in sparse cortical cultures,” *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8(JAN). Available at: https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00460.

West, A.E., Griffith, E.C. and Greenberg, M.E. (2002) “Regulation of transcription factors by neuronal activity,” *Nature Reviews Neuroscience*, 3(12), pp. 921–931. Available at: https://doi.org/10.1038/nrn987.

Whishaw, I.Q. and Mittleman, G. (1991) “Hippocampal modulation of nucleus accumbens: Behavioral evidence from amphetamine-induced activity profiles,” *Behavioral and Neural Biology*, 55(3), pp. 289–306. Available at: https://doi.org/10.1016/0163-1047(91)90633-2.

Whittington, M.A., Traub, R.D. and Jefferys, J.G.R. (1995) “Synchronized oscillations in interneuron networks driven by metabotropic glutamate receptor activation,” *Nature*, 373(6515), pp. 612–615. Available at: https://doi.org/10.1038/373612a0.

Wichterle, H. *et al.* (1999) “Young neurons from medial ganglionic eminence disperse in adult and embryonic brain,” *Nature Neuroscience*, 2(5), pp. 461–466. Available at: https://doi.org/10.1038/8131.

Wichterle, H. *et al.* (2001) “In utero fate mapping reveals distinct migratory pathways and fates of neurons born in the mammalian basal forebrain,” *Development*, 128(19), pp. 3759–3771. Available at: https://doi.org/10.1242/dev.128.19.3759.

Wikenheiser, A.M. and Redish, A.D. (2015) “Hippocampal theta sequences reflect current goals,” *Nature Neuroscience*, 18(2), pp. 289–294. Available at: https://doi.org/10.1038/nn.3909.

Wills, T.J. *et al.* (2010) “Development of the Hippocampal Cognitive Map in Preweanling Rats,” *Science*, 328(5985), pp. 1573–1576. Available at: https://doi.org/10.1126/science.1188224.

Wilson, M.A. and McNaughton, B.L. (1994) “Reactivation of Hippocampal Ensemble Memories During Sleep,” *Science*, 265(5172), pp. 676–679. Available at: https://doi.org/10.1126/science.8036517.

Witter, M.P. *et al.* (1989) “Functional organization of the extrinsic and intrinsic circuitry of the parahippocampal region,” *Progress in Neurobiology*, 33(3), pp. 161–253. Available at: https://doi.org/10.1016/0301-0082(89)90009-9.

WITTER, M.P. *et al.* (2000) “Anatomical Organization of the Parahippocampal-Hippocampal Network,” *Annals of the New York Academy of Sciences*, 911(1), pp. 1–24. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06716.x.

Witter, M.P. *et al.* (2017) “Architecture of the Entorhinal Cortex A Review of Entorhinal Anatomy in Rodents with Some Comparative Notes,” *Frontiers in Systems Neuroscience*, 11. Available at: https://doi.org/10.3389/fnsys.2017.00046.

Wonders, C.P. and Anderson, S.A. (2006) “The origin and specification of cortical interneurons,” *Nature Reviews Neuroscience*, 7(9), pp. 687–696. Available at: https://doi.org/10.1038/nrn1954.

Wong, F.K. *et al.* (2018) “Pyramidal cell regulation of interneuron survival sculpts cortical networks /631/378/2571/1696 /631/378/1934 /631/136/334/1874/345 /631/80/82/23 /631/378/1689/1373 /13/1 /13/2 /13/51 /14/19 /14/69 /38/77 /64/60 /96/63 article,” *Nature*, 557(7707), pp. 668–673. Available at: https://doi.org/10.1038/s41586-018-0139-6.

Wong, F.K. and Marín, O. (2019) “Developmental Cell Death in the Cerebral Cortex,” *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 35(1), pp. 523–542. Available at: https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100818-125204.

Woodson, W., Nitecka, L. and Ben-Ari, Y. (1989) “Organization of the GABAergic system in the rat hippocampal formation: A quantitative immunocytochemical study,” *Journal of Comparative Neurology*, 280(2), pp. 254–271. Available at: https://doi.org/10.1002/cne.902800207.

Xavier Leinekugel *et al.* (2002) “Correlated Bursts of Activity in the Neonatal Hippocampus in Vivo,” *Science*, 296(5575), pp. 2046–2049. Available at: https://doi.org/10.1126/science.1073140.

Xu, H.-T. *et al.* (2014) “Distinct Lineage-Dependent Structural and Functional Organization of the Hippocampus,” *Cell*, 157(7), pp. 1552–1564. Available at: https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.067.

Yamada, J. *et al.* (2004) “Cl^- uptake promoting depolarizing GABA actions in immature rat neocortical neurones is mediated by NKCC1,” *The Journal of Physiology*, 557(3), pp. 829–841. Available at: https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.062471.

Ye, J. *et al.* (2018) “Entorhinal fast-spiking speed cells project to the hippocampus,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(7). Available at: https://doi.org/10.1073/pnas.1720855115.

Yger, P. *et al.* (2018) “A spike sorting toolbox for up to thousands of electrodes validated with ground truth recordings in vitro and in vivo,” *eLife*, 7. Available at: https://doi.org/10.7554/eLife.34518.

Ylinen, A. *et al.* (1995) “Sharp wave-associated high-frequency oscillation (200 Hz) in the intact hippocampus: network and intracellular mechanisms,” *The Journal of Neuroscience*, 15(1), pp. 30–46. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-01-00030.1995.

Yoder, R.M. and Pang, K.C.H. (2005) “Involvement of GABAergic and cholinergic medial septal neurons in hippocampal theta rhythm,” *Hippocampus*, 15(3), pp. 381–392. Available at: https://doi.org/10.1002/hipo.20062.

Yoganarasimha, D., Rao, G. and Knierim, J.J. (2011) “Lateral entorhinal neurons are not spatially selective in cue-rich environments,” *Hippocampus*, 21(12), pp. 1363–1374. Available at: https://doi.org/10.1002/hipo.20839.

Yozu, M., Tabata, H. and Nakajima, K. (2005) “The Caudal Migratory Stream: A Novel Migratory Stream of Interneurons Derived from the Caudal Ganglionic Eminence in the Developing Mouse Forebrain,” *The Journal of Neuroscience*, 25(31), pp. 7268–7277. Available at: https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2072-05.2005.

Yu, F.H. *et al.* (2006) “Reduced sodium current in GABAergic interneurons in a mouse model of severe myoclonic epilepsy in infancy,” *Nature Neuroscience*, 9(9), pp. 1142–1149. Available at: https://doi.org/10.1038/nn1754.

Zeldenrust, F. and Wadman, W.J. (2009) “Two forms of feedback inhibition determine the dynamical state of a small hippocampal network,” *Neural Networks*, 22(8), pp. 1139–1158. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neunet.2009.07.015.