

UNIVERSITE DE LA MEDITERRANEE
Faculté des Sciences de Luminy
Ecole Doctorale des Sciences de la vie et de la Santé

THESE DE DOCTORAT
En vue de l'obtention du grade de docteur à
l'Université de la Méditerranée,
spécialité Neurosciences.

Présentée et soutenue publiquement par :

Thomas MARISSAL

Le 18 Janvier 2012

**Une approche développementale de l'hétérogénéité fonctionnelle
des neurones pyramidaux de CA3.**

Jury de Thèse :

Pr. André NIEOULLON:	Président du Jury
Pr. Pico CARONI:	Rapporteur
Dr. Richard MILES:	Rapporteur
Dr. Dominique DEBANNE:	Examineur
Dr. Stéphane DIEUDONNE:	Examineur
Dr. Yehezkel BEN-ARI:	Directeur de thèse
Dr. Rosa COSSART:	Directrice de thèse

« Si notre cerveau était simple à comprendre,
nous serions trop simples pour le comprendre »

Ken Hill

Résumés

Une approche développementale de l'hétérogénéité fonctionnelle des neurones pyramidaux de CA3.

Les neurones pyramidaux de la région CA3 de l'hippocampe présentent une diversité morphologique, physiologique, biochimique, mais aussi fonctionnelle. Une partie des caractéristiques des neurones étant acquise pendant le développement, nous avons formulé l'hypothèse que la diversité morpho-fonctionnelle des neurones pyramidaux serait déterminée aux stades embryonnaires. Pour tester cette hypothèse, nous avons utilisé des souris transgéniques pour lesquelles l'expression d'un marqueur fluorescent (GFP) est conditionnée par la date de neurogenèse des neurones glutamatergiques. Nous avons enregistré l'activité des neurones en imagerie calcique et montré que les neurones pyramidaux nés le plus tôt déchargent pendant la phase d'initiation des activités épileptiformes générées par le blocage pharmacologique de la transmission GABAergique rapide. De plus, nous montrons que ces neurones précoces possèdent des propriétés morpho-physiologiques distinctes. Enfin, nous montrons que la stimulation de neurones pyramidaux nés tôt peut générer des activités épileptiformes à des stades immatures lorsqu'ils sont stimulés en groupe, et à des stades juvéniles lorsqu'ils sont stimulés individuellement. Ainsi nous démontrons qu'il existe un lien entre la date de neurogenèse et les propriétés morpho-fonctionnelles des neurones pyramidaux de CA3.

Functionnal heterogeneity of CA3 pyramidal neurons : a developmental approach.

There is increasing evidence that CA3 pyramidal cells are biochemically, electrophysiologically, morphologically and functionally diverse. As most of these properties are acquired during development, we hypothesized that the heterogeneity of the morpho-functionnal properties of pyramidal cells could be determined at the early stages of life. To test this hypothesis, we used a transgenic mouse line in which we glutamatergic cells are labelled with GFP according to their birth date. Using calcium imaging, we recorded multineuron activity in hippocampal slices and show that early generated pyramidal neurons fire during the build-up phase of epileptiform activities generated in the absence of fast GABAergic transmission. Moreover, we show that early generated pyramidal neurons display distinct morpho-physiological properties. Finally, we demonstrate that early generated neurons can generate epileptiform activities when stimulated as assemblies at immature stages, and when stimulated individually at juvenile stages. Thus we suggest a link between the date of birth and the morpho-functional properties of CA3 pyramidal neurons.

Remerciements

Je me dois de remercier chaleureusement ceux qui ont accepté d'être les membres de mon jury : André Nieoullon, le président du jury. Richard Miles et Pico Caroni, mes rapporteurs. Stéphane Dieudonné et Dominique Debanne, mes examinateurs. Ils m'honorent de leur présence et j'espère m'en montrer digne.

A une époque où je cherchais encore ma voie, deux personnes sont tombées à point nommé. Je remercie une nouvelle fois André Nieoullon, pour la qualité de ses cours de Neurosciences qui ont grandement participé à déclencher ma passion pour cette discipline. Je remercie aussi chaleureusement Jean-Luc Gaïarsa, pour m'avoir accueilli pour ma toute première expérience du métier de chercheur lors d'un inoubliable stage de Master1. Alors que je me destinais sans conviction à un avenir professionnel tout à fait différent, sa passion contagieuse pour ton métier m'a fait réaliser que c'était cette voie que je voulais suivre.

Si c'est eux qui ont donné le coup de départ de ma carrière de thésard, ils ne sont pas les seuls que j'ai pris plaisir à côtoyer, tant pour leurs qualités scientifiques que pour leur qualités personnelles. Je remercie Igor et Constance, ainsi que les membres de leurs équipes respectives, pour leur encadrement et leur bonne humeur légendaire lors des stages de Master2, qui m'ont fait entrevoir d'autres facettes du métier.

Je remercie sincèrement Ben de m'avoir proposé cette thèse. Bien que celle-ci ne se soit pas déroulée de manière idéale pour moi, j'ai apprécié sa confiance en moi, dès le master. J'admire également sa manière de toujours s'enthousiasmer pour les nouveautés scientifiques, jamais blasé malgré une riche carrière, et de communiquer cet enthousiasme à travers des présentations orales mémorables. Je prends souvent exemple sur son ambition conceptuelle inoxydable.

Je remercie particulièrement Rosa, dont le flair exceptionnel a permis de relancer ma thèse à un moment où la mécanique était sérieusement grippée. Elle m'a appris à ne pas me satisfaire de ce que j'avais, et à corriger mes défauts et mes limites pour les transformer en

qualités. Elle a mis à ma disposition des techniques innovantes, m'a fait participer à des discussions scientifiques de haut vol et m'a offert une ambiance de bureau souvent très détendue. Je réalise la chance que j'ai eue au cours de ma thèse d'avoir été dirigé par deux scientifiques d'aussi haut niveau.

Des scientifiques de haut niveau, et des personnes agréables à fréquenter, il y en a à la pelle au labo : je remercie tout le petit monde de l'INMED, et particulièrement le directeur, Alfonso Represa, ainsi que tous ceux qui m'ont tous à un moment ou un autre guidé quand j'avais un problème, soutenu quand je n'y arrivais pas, ou tout simplement offert leur sympathie.

Le laboratoire serait bien vide sans les « jeunes » ! Avec certains d'entre eux, j'ai perdu le sens du goût au resto universitaire ; je salue Julien, le dernier des chevaliers cathares, David, le futur président du Burkina-Faso, Shirley et sa zénitude légendaire, les très sympathiques « petits débutants » Lamine, Robin et Karen : je leur souhaite une carrière radieuse.

Il y en a d'autres que j'ai surtout eu le plaisir de fréquenter au labo. Je pense à Nathalie D. sortie d'un manga japonais, avec ses mimiques incroyables et ses prises de kung-fu fulgurantes (et douloureuses surtout quand on a un café à la main), à Camille et ses rêves d'élevage dans les Cévennes, à Anaïs et ses shorts millimètre et sa manière inimitable de se faire reconnaître en soirée par ses étudiants, à Shé qui a eu la malchance d'être encadrée avec moi (et qui me parle toujours), à Alexia et son ventre sans fond, à Vincent V. et ses conseils de vieux briscard de la science, à Sonya et son bonjour de la main qui me fait sourire à chaque fois, à Thomas de Bretagne pour ses mails à ne pas ouvrir au boulot, à Philippe de BourKKK-en-Bresse pour ses gateaux à n'importe quelle occasion, à Manal et son rire tonitruant, à Diana et sa disponibilité en toutes circonstances quand on lui demande un coup de main, à Corinne et son format poche, à Paolo et Miri le couple de la planète Pluton, à Adriano qui a eu une vie déjà chargée et qui en veut encore plus, à Sarah rien que pour sa manière de dire « Oklahoma », à Emilie qui m'a presque donné envie de devenir maman, et à Bahija capable de faire quarante-sept trucs en même temps (toute en faisant la bise et en demandant comment ça va). J'entrevois pour Michel et Aurélie un avenir brillant à la Pierre et Marie Curie, les radiations en moins. Je salue certains des membres de l'équipe de Nathalie que j'ai le plus fréquentés : Brigitte, Belka, Julianne, Karine, Laure, Claire, ou encore

Isabelle, qui sont sur le point, ou ont déjà entamé une vie nouvelle : je leur souhaite un bon vent.

Je pense aussi à Ludo, pour ses coups de main, ses talents de bricoleur fou, son goût très sûr pour le whisky et beaucoup plus discutable pour les poisons naturels, et surtout sa camaraderie. Qu'il réussisse sa thèse, sa paternité, et tout ce qu'il va entreprendre dans un avenir très proche.

Quant à Damien, je lui souhaite aussi beaucoup de belles choses : personnelles, déjà, avec Flo. Longue vie à vous deux ! Je fais ton garde du corps quand tu veux (dès que j'ai pris 20 kilos). Et puis professionnelles ; j'espère que tu auras le déclic que tu attends, car tu as le talent pour le faire fructifier.

Parlons de Romain. Lui, Nathalie et moi, je nous vois un peu comme les trois mousquetaires... Non, c'est déjà pris. Les trois doigts d'une main incomplète ? Non plus, personne n'utiliserait une image aussi bancale. Les trois salopards ? Les trois petits cochons ? Les trois nains dans une mine ? Les trois frères ? Les trois pyramides de Gizeh ? Saint Paul les trois châteaux ? Non, non, et non, ça ne va pas. Bof, je vais rester sobre. J'ai connu Rom' alors que nous entrions tous les deux à l'INMED et nous nous sommes plus quittés depuis. Rom' est le genre d'ami qui est un peu comme un jumeau ; nous avons évolué côte à côte au cours de nos stages de masters, puis nos thèses. Nous sommes indissociables, liés par notre amitié, nos caractères différents mais complémentaires, nos farces, nos doutes, notre passion, nos visions du monde, nos coups de gueules, jusque par les liens du mariage... où il a été mon témoin (même s'il est passé à un cheveu d'être le mari de Nathalie). Je lui souhaite, ainsi qu'à Vanessa, un avenir magnifique. Je regrette simplement que ce soit loin de nous !

Je n'oublie pas non plus mes amis de la fac et du lycée, et même d'avant : je ne les cite pas tous car j'aurai trop peur d'en oublier même un seul. J'ai pensé à eux malgré tous les coups de fil repoussés pour cause de manip urgente ou de préparation à la soutenance. Merci d'être vous, les amis !

Ma famille occupe une place très importante dans ma vie. J'embrasse très fort Pop et Moman, ma soeur Chéchia et sa petite famille composée de l'Absolutly Fab' et de ma petite nièce dont je suis fAnna, mais aussi ma mammie et toute ma panoplie de tontons, de tatas et de cousins. Je pourrais leur dire beaucoup de choses très cucul-la-praline, et ça n'en finirait pas. Et surtout, ils m'ont enseigné beaucoup de choses qui ne m'ont pas été inutile dans ma vie de doctorant : la passion pour ce que j'entreprends, la curiosité, un sens artistique et littéraire, une grande exigence personnelle, et j'en oublie... J'espère qu'ils seront fiers de moi.

J'embrasse aussi toute ma (bien nommée) belle-famille qui peuvent déjà s'enorgueillir depuis fin octobre d'un docteur dans leur famille. J'espère que je me montrerai à la hauteur !

Il y a beaucoup d'incertitudes et bien peu de réussites pendant une thèse. Des incertitudes liées aux résultats expérimentaux, que l'on ne peut pas inventer de toutes pièces. Des incertitudes professionnelles, car il est très difficile de réussir à faire carrière et même de savoir ce que l'on fera l'année d'après. Et bien d'autres.

Mais il y a bien une certitude absolue, une réussite éblouissante dont je peux me vanter, et elle concerne ma vie personnelle. Contre vents et marées, pour le meilleur et le moins pire, Nathalie est à mes côtés depuis les bancs de la fac. Elle essuie mes coups de gueule, me pardonne mes erreurs, éponge mes déprimés, supporte mon caractère parfois épouvantable, fait semblant de rire à mon humour douteux, et éblouit mon quotidien. Grâce à elle, j'ai pris de l'assurance, j'ai oublié mes soucis, j'ai voyagé, j'ai ri, j'ai rêvé, je me suis marié, et, puisqu'on parle de la thèse, j'ai travaillé dur pour qu'elle soit fière de moi. Quand les difficultés de la thèse se seront éloignées, je ne me souviendrais que des moments de réussite. Des copains. De la famille. Et des moments avec Nathalie.

Table des matières

Résumés	5
Une approche développementale de l'hétérogénéité fonctionnelle des neurones pyramidaux de CA3.	5
Functional heterogeneity of CA3 pyramidal neurons : a developmental approach.	5
Remerciements	6
Table des matières	10
Table des figures	12
Partie 1 : Introduction générale	14
Chapitre 1 : Préambule	15
I. Le poids d'un neurone individuel in vitro : de la limace des mers à l'homme.	17
II. L'impact d'un neurone individuel in vivo: de l'état de veille cérébral au mouvement des moustaches.....	21
III. Les propriétés des neurones remarquables du point de vue fonctionnel :	23
Chapitre 2 : Structure et fonction du réseau de la région CA3 de l'hippocampe	27
I. Anatomie de la région CA3 de l'hippocampe :	27
II. Fonction de la région CA3.....	29
1. La région CA3 et la mémoire spatiale.....	29
2. Les activités de réseau fonctionnellement significantes de la région CA3.	31
2.1. Les activités rythmiques gamma et thêta.	31
3. Les activités de réseau immatures de la région CA3	33
4. Activités de réseau pathologiques de la région CA3.	35
Chapitre 3 : Les cellules de la région CA3 de l'hippocampe	38
I. Peut-on négliger les cellules gliales ?	38
II. Les neurones non glutamatergiques de la région CA3 :	39
1. Les neurones cholinergiques :	39
2. Les neurones GABAergiques :	40
III. Les neurones glutamatergiques :	46
1. Les cellules non-pyramidales :	46
1.1 Les cellules géantes :	46
1.2. Les cellules granulaires :	47
2. Les cellules pyramidales :	47
2.1. Propriétés et diversité morphologique :	48
2.1.1 Morphologie somato-dendritique:	48
2.1.2 Généralités et diversité des connexions afférentes des neurones pyramidaux de CA3 :50	
2.1.3 Morphologie axonale des cellules pyramidales de CA3:	53
2.1.4 Diversité des connexions efférentes des neurones pyramidaux de CA3 :	55
2.2. Propriétés et diversité électrophysiologiques :	56
2.3. Propriétés et diversité biochimiques :	61
2.3.1 La calbindine :	61
2.3.2 L'ion zinc :	61
2.3.3 D'autres marqueurs ?	62
2.4. Propriétés et diversité fonctionnelles des neurones pyramidaux de CA3.....	64
Chapitre 4 : Développement des Neurones pyramidaux de CA3	67
I. Neurogenèse et migration des neurones pyramidaux de CA3 :	68
1. Les zones germinatives et les différents progéniteurs neuronaux :	68
2. Les mécanismes de migration corticale :	70
3. La formation des couches de l'hippocampe :	72
II. Différentiation des neurones pyramidaux de CA3 :	76
1. Développement des propriétés physiologiques:	76

2.	Développement de l'arborisation neuritique :.....	78
III.	Etablissement des connexions afférentes et efférentes :	79
IV.	Aspects moléculaires du développement précoce.	83
1.	Les cascades moléculaires architectes du développement du cortex :	83
2.	Ngn2 est indispensable au développement des neurones glutamatergiques	85
2.1.	Ngn2 et les phases précoces du développement.	85
2.2.	Ngn2 et les phases tardives du développement.	86
Partie 2 :	Résultats.....	89
	Résumé et approche expérimentale :.....	90
Partie 3 :	Discussion	124
I.	Existe-t-il un lien général entre fonction et date de genèse des neurones ?	125
II.	Comment l'âge individuel peut-il déterminer l'avenir des neurones pyramidaux?.....	130
1.	Le facteur temps affecte les processus développementaux en termes quantitatifs :	130
2.	Le facteur temps affecte les processus développementaux en termes qualitatifs :... ..	134
3.	Le facteur temps et l'avenir des neurones pyramidaux : une implication des facteurs de transcription ?	138
III.	Un rôle fonctionnel des neurones pyramidaux précoces dans des conditions physiologiques ?	140
IV.	Un rôle fonctionnel des neurones pyramidaux précoces dans des conditions pathologiques ?	143
V.	Un réseau organisé autour de ses éléments les plus précoces ?	147
Annexes :		149
Références bibliographiques :		174

Table des figures

Figure 1 : La notion d'échelle dans le système nerveux.....	16
Figure 2 : Un neurone individuel peut affecter la dynamique du réseau <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	19
Figure 3 : Anatomie de l'hippocampe.	28
Figure 4 : La région CA3 génère des activités neuronales corrélées pendant tous les stades de la vie. 36	
Figure 5 : Exemples de connexions GABAergiques dans la région des Cornes d'Ammon de l'hippocampe.	42
Figure 6 : La diversité des neurones GABAergiques du cortex provient d'origines spatiotemporelles différentes.	45
Figure 7 : Projections axonales et connexions afférentes des neurones pyramidaux de CA3.....	51
Figure 8 : Diversité morphologique des neurones pyramidaux de CA3.....	52
Figure 9 : Diversité électrophysiologique et biochimique des neurones pyramidaux de CA3.	63
Figure 10 : Répartition temporelle des processus développementaux des neurones pyramidaux de la région CA3 de l'hippocampe.	68
Figure 11 : Neurogenèse, migration, et formation des couches dans la région CA3 de l'hippocampe.75	
Figure 12 : Expression des molécules de la cascade architecte pendant les phases initiales du développement des neurones pyramidaux de l'hippocampe.....	84
Figure 13 : Système d'induction du marquage des neurones glutamatergiques en fonction de leur date de neurogenèse.....	92
Figure 14 : Les cellules semi-lunaires du gyrus denté seraient des neurones fonctionnellement remarquables générés pendant les phases précoces de la neurogenèse.....	128
Figure 15 : Les neurones pyramidaux précoces semblent être les premiers à exprimer le transporteur KCC2.....	131
Figure 16 : Les neurones pyramidaux de CA3 génèrent séquentiellement des SPAs puis des GDPs au cours de leur développement.	133
Figure 17 : Le marquage des neurones générés pendant les stades précoces de la neurogenèse révèle la présence d'îlots de fibres dans le Stratum Lacunosum-moleculare de CA3.	136

Partie 1 : Introduction générale

Chapitre 1 : Préambule

« Loin d'accepter la notion d'individualité et d'indépendance de chaque élément nerveux, je n'ai jamais trouvé, jusqu'à maintenant, de motifs justifiant d'abandonner le concept que j'ai toujours défendu, selon lequel les cellules nerveuses, au lieu de travailler individuellement, agissaient en groupe [...]. Malgré la tendance populaire à individualiser les éléments, je ne peux me résoudre à renoncer à l'idée d'une action unitaire du système nerveux »

Camillo Golgi, 1906

Ces quelques mots sont extraits du discours prononcé avec quelque amertume par Camillo Golgi lors de la remise du prix Nobel 1906, qu'il partageait avec son grand rival Santiago Ramon y Cajal. Toute l'ironie de l'histoire réside dans le fait que ce prix signait paradoxalement le rejet de la doctrine ardemment défendue par Golgi, selon laquelle tout le système nerveux était constitué d'une entité unique et continue, appelée « réticulum ». Ce sont les thèses de Cajal qui ont été récompensées, les études de ce dernier -basées sur un marquage mis au point par Golgi- mettant en évidence que le système nerveux est constitué d'un réseau d'éléments unitaires, les neurones, reliés par des jonctions, qui seront appelées plus tard « synapses » par Charles Sherrington ([Sporns, 2011 *](#)).

Cet entêtement de Golgi à vouloir considérer le système nerveux comme un ensemble indivisible est symptomatique des difficultés de la science à lier les propriétés de chaque neurone individuel, en tant qu'unité élémentaire, avec les propriétés collectives du réseau formé par ces neurones, et duquel émergent des fonctions que ses sous-parties ne possèdent pas.

Ce problème de lien entre la fonction macroscopique du réseau dans sa globalité et les propriétés de ses éléments unitaires peut être en partie résolu en introduisant une notion empruntée à la branche des mathématiques qui étudie les réseaux : la notion d'échelle. A chaque degré d'échelle gravi, on élargit le champ de vision à un nombre croissant d'éléments considérés : 1, 10, 100, 1000 neurones connectés... De même, à chaque degré d'échelle apparaissent des schémas (ou motifs) d'organisation des éléments plus complexes d'où émergent des propriétés à chaque fois plus complexes qu'au niveau d'échelle

précédent. Il existerait donc une multitude d'échelles potentielles, et autant de niveaux d'organisation, entre un simple neurone et un réseau complet. Ces échelles permettraient de combler le fossé entre les simples propriétés individuelles d'un neurone individuel et les fonctions globales auxquelles il participe (Feldt et al., 2011).

Echelle :

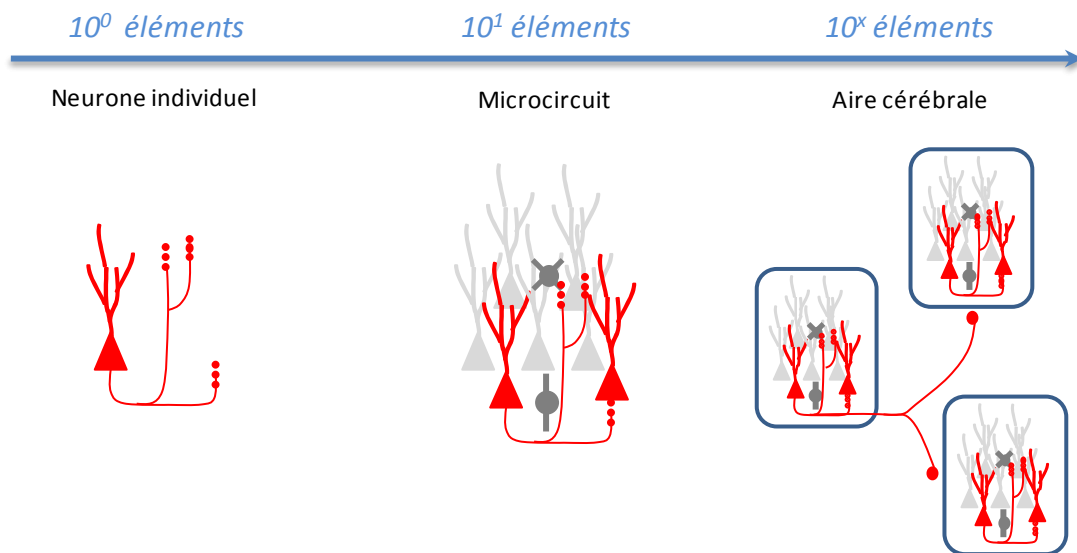


Figure 1 : La notion d'échelle dans le système nerveux.

Les ensembles peuvent être étudiés à plusieurs échelles. Chaque niveau d'échelle correspond à un certain nombre d'éléments considérés, lesquels s'agencent pour former un réseau d'où émergent des propriétés plus complexes que la somme arithmétique des propriétés du niveau d'échelle précédent. Dans le système nerveux, les éléments élémentaires sont les neurones. A l'échelle la plus petite du réseau, les neurones forment un réseau local, appelé aussi microcircuit, à l'image des colonnes corticales qui assurent des fonctions cérébrales simples. A l'échelle la plus grande, les réseaux locaux s'agencent pour former un réseau global (comme celui des aires cérébrales) d'où émergent des fonctions cognitives ou sensorielles.

Ainsi, à l'échelle la plus simple, les neurones sont organisés en microcircuits, qui sont des unités fonctionnelles minimales du réseau. Un des exemples de microcircuit le mieux décrit est celui des *minicolonnes* corticales constituées de quelques dizaines de neurones interconnectés par des synapses, arrangés perpendiculairement à la surface du néocortex (MOUNTCASTLE et al., 1957). À l'échelle supérieure, plusieurs microcolonnes s'organisent elles-mêmes pour constituer des *colonnes* corticales d'où émergent des fonctions corticales très spécifiques, comme les cartes topographiques du monde extérieur, la représentation de chaque partie de son propre corps par un individu, la ségrégation de différents sons selon

leur fréquence, et bien d'autres (Mountcastle, 1997). Chaque colonne s'organise en région plus grande, à l'image des *aires* corticales. Ces aires, larges subdivisions corticales qui assurent une fonction cognitive précise, utilisent les informations spécifiques apportées par chacun de leurs sous-composants afin de les traiter de manière plus globale, et plus complexe. Au niveau ultime, l'échelle la plus large, plusieurs aires cérébrales et plusieurs régions subcorticales du cerveau connectées peuvent fonctionner en synergie afin de générer un comportement adapté à une situation donnée.

Pour autant, à l'échelle d'un réseau et de l'émergence du réseau, le neurone individuel est-il réellement aussi « négligeable » que le veut un point de vue assez répandu (voir (Brecht et al., 2004)). Nous nous appuyerons sur le contexte bibliographique actuel pour apporter des éléments de réponse.

1. Le poids d'un neurone individuel in vitro : de la limace des mers à l'homme.

Dans les réseaux des systèmes nerveux archaïques, la réponse à la question posée précédemment paraît simple : il existe un nombre parfois très limité de neurones, de l'ordre de quelques unités à quelques dizaines. Dans ce cas, chaque neurone posséderait un poids considérable, et une fonction critique peut ne dépendre que d'un neurone en exemplaire unique. Un certain nombre de modèles de systèmes nerveux archaïques d'invertébrés ont été utilisés pour leur facilité à relier les propriétés de neurones à une fonction, et à établir des liens de causalité tels que ceux qu'on réalise en génétique. Ainsi, un modèle assez prisé est celui du mollusque marin *Aplysia californica* qui ne possède qu'une centaine de neurones pour assurer des fonctions étonnamment variées. Parmi ces fonctions, ses battements cardiaques sont contrôlés par un système très simple dans le ganglion abdominal du mollusque, composé de cinq neurones : quatre neurones générant une activité rythmique et synchrone qui jouent un rôle de « pacemaker » pour les battements cardiaques, et un unique neurone connecté localement aux quatre autres (d'où son appellation d'*interneurone*) afin de réguler leur activité. Harold Pinkser a montré dès 1977 qu'une modification de l'activité de l'interneurone suffisait à « remettre à zéro » le rythme de l'horloge des cellules, et donc pourrait conséquemment modifier le contrôle des battements

cardiaques (Pinsker, 1977a; Pinsker, 1977b). Pinkser suggère un lien fort entre l'unité du réseau et la fonction du réseau dans ce système simple.

Dans les réseaux des systèmes nerveux complexes, comme celui des mammifères, la problématique de l'impact d'un neurone unique n'est pas aussi aisée. En effet, la quantité de neurones est de plusieurs ordres plus élevée dans le cerveau (100 milliards de neurones). De plus, l'évolution a sélectionné une relative redondance des fonctions neuronales : une même fonction peut être assurée par plusieurs neurones distincts (Narayanan et al., 2005; Puchalla et al., 2005). Cette redondance favoriserait une certaine robustesse du réseau. En effet, un type de neurone possédant des propriétés particulières existe en plusieurs exemplaires, ce qui fait que la perte accidentelle ou pathologique d'un petit groupe de neurones ne met pas forcément en danger l'intégrité de l'ensemble de la structure.

Ces arguments de « surnombre » semblent appuyer la thèse en faveur de l'aspect négligeable d'un neurone individuel au sein du système nerveux mammifère. Toutefois, l'augmentation du nombre de neurones, loin de diminuer le poids relatif d'un neurone par rapport à son réseau, pourrait au contraire permettre l'enrichissement des capacités fonctionnelles de la structure, et diversifier le champ des réponses possibles à un stimulus. Selon cette hypothèse, un neurone individuel ne resterait pas forcément dans l'ombre du groupe, mais endosserait un rôle significatif dans la fonction à laquelle il participe.

Dans cette problématique, les pionniers sont certainement Richard Miles et Robert Wong qui ont étudié, il y a près de trente ans, un modèle *in vitro* plus complexe que celui des mollusques, la région CA3 isolée de l'hippocampe de cochon d'Inde, qui compte plusieurs milliers de neurones. Ils ont effectué leur travail dans des conditions particulières, au cours desquelles cette région génère des décharges *épileptiformes*, c'est-à-dire des décharges rythmiques qui partagent certaines caractéristiques avec les crises d'épilepsies. Ils ont montré, en stimulant par des techniques d'électrophysiologie des dizaines de neurones glutamatergiques individuels pris au hasard, qu'une fraction d'entre eux pouvait « donner le ton » au rythme de l'ensemble du réseau (Miles and Wong, 1983). En effet, l'activation de ces neurones, pendant une période où le réseau est particulièrement excitable (de la Prida et al., 2006), pouvait déclencher une décharge épileptiforme (voir Figure 2).

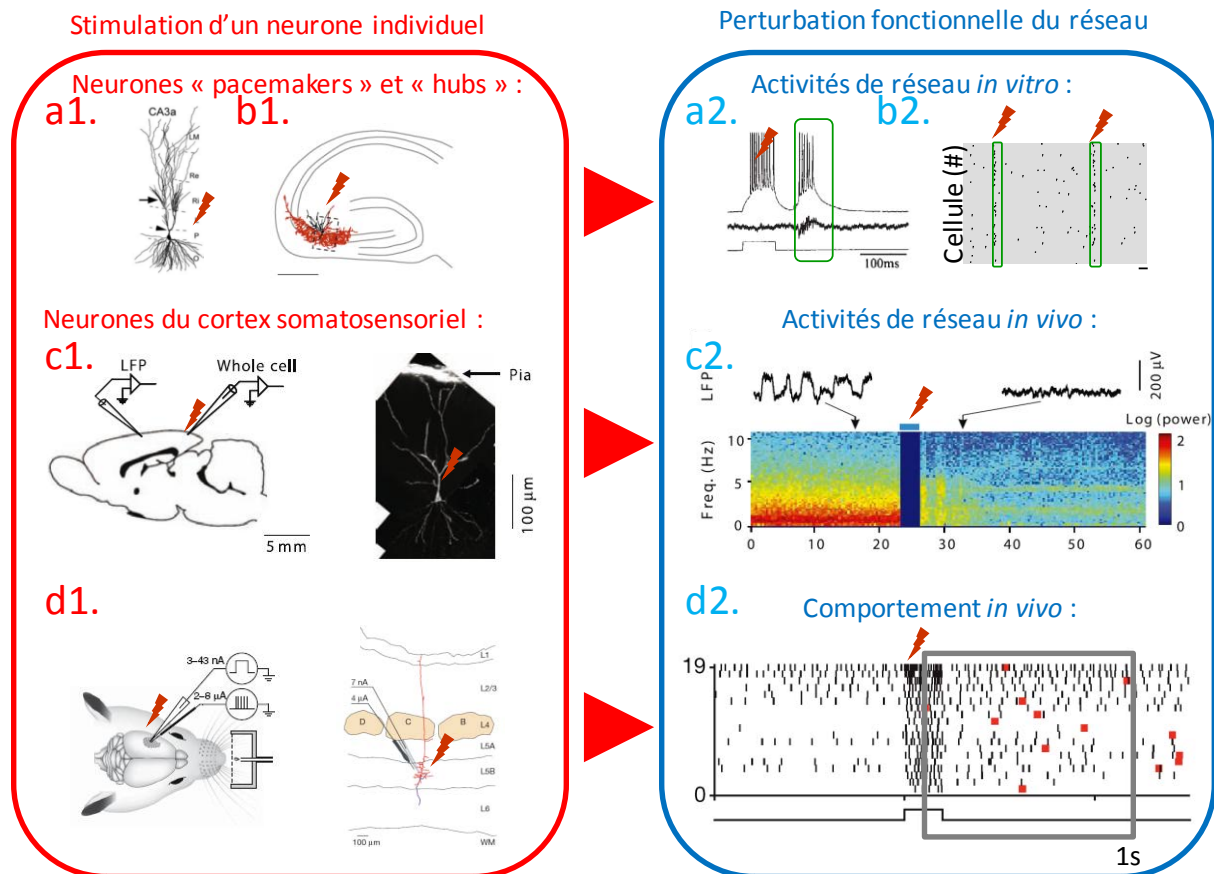


Figure 2 : Un neurone individuel peut affecter la dynamique du réseau *in vivo* et *in vitro*.

La stimulation d'un neurone individuel (éclair rouge, panneau de gauche) peut provoquer *in vitro* l'occurrence d'activités de réseau (a2, b2), mais aussi modifier l'activité cérébrale *in vivo* (c2) ou encore provoquer un comportement (d2).

In vitro, la stimulation individuelle de neurones pyramidaux de CA3a (a1, (Wittner and Miles, 2007)) ou de neurones GABAergiques hubs (b1, (Bonifazi et al., 2009)) permet la génération d'activités de réseau mesurées par enregistrement extracellulaire (a2) ou en imagerie calcique (b2 : *raster plot*, ou graphe d'occurrence des activités pour chaque cellule, en fonction du temps).

In vivo, la stimulation de neurones individuels dans le néocortex (c1, (Li et al., 2009)) peut provoquer la modification durable de l'activité cérébrale (c2), qui passe d'un état alternatif (*up-down state*) à un état continu (*persistent up state*, c2 : Enregistrement des LFP, ou *potentiels de champ locaux*, représentés par un spectre de puissance).

De même, la stimulation de neurones individuels dans le néocortex (d1, (Houweling and Brecht, 2008)) peut induire un comportement des souris, en l'occurrence un lapement (d2 : *raster plot* des potentiels d'action générés par la cellule stimulée (barres noires) et des lapement (rectangles rouges) mesurés grâce à un capteur (représenté en d1) lors de 19 répétitions de l'expérience).

Dans le même esprit, l'équipe de Rosa Cossart a analysé l'organisation fonctionnelle du réseau à l'origine de la génération d'activités générées *in vitro* par l'hippocampe de souris, mais cette fois dans des conditions physiologiques, et non pathologiques comme celles de Richard Miles. Leur étude s'est portée sur la première activité synchrone du réseau générée par l'hippocampe au cours de son développement, les potentiels dépolarisants géants (appelés GDPs) (Ben-Ari et al., 1989). Partant du principe qu'il est plus probable d'attraper un gros poisson en pêchant au filet qu'à la ligne, ils ont mesuré l'activité de centaines de neurones individuels en simultané grâce aux techniques récentes d'imagerie calcique. L'idée était de distinguer un comportement individuel singulier dans la population de neurones. Ainsi, Bonifazi et ses collaborateurs mirent en évidence une sous-population de neurones GABAergiques distincte des points de vue morpho-physiologique qu'ils ont appelé « hubs ». De plus, les auteurs ont montré que la perturbation de l'activité de ces « hubs » a pour effet de modifier l'incidence des GDPs ((Bonifazi et al., 2009), voir Figure 2).

Les GDPs sont des activités de réseau immatures. Bien que ces activités jouent un rôle dans la maturation des neurones de l'hippocampe (Mohajerani et al., 2007), elles n'ont été associées à aucune fonction cérébrale. La question était de savoir s'il existait des neurones remarquables, à l'image des « hubs », capable d'affecter des activités de réseau fonctionnellement significatives. Or les GDPs précèdent des activités de réseau matures appelées sharp waves-ripples (SPW-R), qui jouent *in vivo* un rôle fonctionnel avéré dans la mémoire spatiale (Ego-Stengel and Wilson, 2010; Girardeau et al., 2009; Leinekugel et al., 2002). Thomas Ellender et Ole Paulsen ont étudié *in vitro* ces SPW-R pendant des stades matures de l'hippocampe. En utilisant essentiellement des techniques d'électrophysiologie, les auteurs ont mis en évidence une sous-population de neurones GABAergiques capables de moduler à eux seuls l'incidence des SPW-R (Ellender et al., 2010). Leur ressemblance avec les neurones « hubs » s'arrête là, car rien ne permet à ce jour pu d'établir que ces deux catégories de neurones partageaient des caractéristiques communes (Ellender and Paulsen, 2010).

Ces recherches effectuées *in vitro* sur des modèles rongeurs semblent appuyer l'hypothèse selon laquelle un neurone individuel, ou du moins certaines catégories de neurones individuels, peut avoir un impact individuel significatif à l'échelle des dynamiques d'un

réseau. D'autres études *in vitro* suggèrent que de tels neurones fonctionnellement remarquables pourraient également exister chez l'homme.

En effet, le groupe de Gabor Molnar et Gabor Tamas a axé son étude sur des tissus cérébraux humains sains provenant d'une soixantaine de patients (Molnár et al., 2008). Les auteurs ont effectué des centaines d'enregistrements de neurones multiples en simultanément par patch-clamp. Les auteurs ont remarqué qu'un événement initial (un potentiel d'action) généré par un seul neurone pyramidal pouvait stimuler efficacement les neurones post-synaptiques (et particulièrement les neurones GABAergiques), puis se propager à tout le circuit, entraînant un recrutement des neurones qui permettait à terme l'amplification de l'évènement initial à l'échelle du réseau. Cette capacité d'un neurone individuel à activer efficacement un groupe entier serait une caractéristique humaine qui pourrait être d'après les auteurs à l'origine des capacités cognitives propres à notre espèce.

On peut reprocher aux modèles *in vitro* de ne constituer qu'un réseau incomplet, d'où est absente l'étude des fonctions des structures considérées. Nous discuterons dans le paragraphe suivant de l'impact que peuvent avoir des neurones individuels *in vivo* dans un réseau complet où les fonctions sont préservées.

II. L'impact d'un neurone individuel in vivo: de l'état de veille cérébral au mouvement des moustaches.

Plusieurs travaux suggèrent qu'à l'image de ce qui a été observé *in vitro*, certaines catégories de neurones sont capables de moduler un éventail plus ou moins large de neurones *in vivo*. L'une de ces études, réalisée en 2009 par Cheng-yu Li et ses collaborateurs, porte sur les états de veille cérébraux. Au cours de la journée, les mammifères traversent plusieurs états de veille (les phases de sommeil paradoxal et non paradoxal, l'éveil) qui se manifestent par des processus cognitifs différents (attention, mémorisation), et surtout, par des activités rythmiques globales que l'on peut enregistrer *in vivo*. Les auteurs ont montré que près de la moitié des neurones qu'ils ont enregistrés dans les cortex visuel et somato-sensoriel de souris anesthésiées sont capables d'opérer individuellement la transition d'une activité

électrique globale correspondant à un état de veille particulier à un autre, et *vice-versa* ((Li et al., 2009), voir Figure 2).

Ces travaux suggèrent que certains neurones individuels sont capables d'affecter de manière significative l'émergence de certaines activités du réseau *in vitro* et *in vivo*. Or certaines de ces activités ont parfois été corrélées à des fonctions cérébrales : c'est le cas des SPW-R ou des activités corrélées aux états de veille que nous avons décrits précédemment. On peut donc se demander si un neurone individuel est capable d'« imprimer sa marque » directement à l'échelle d'une fonction cognitive, ou d'un comportement.

Deux articles de Michael Brecht et collaborateurs, apportent quelques éléments de réponse à cette question. Dès 2004, les auteurs montrent, grâce à des microstimulations que certains neurones du cortex moteur sont capables de provoquer un mouvement de *vibrisses* chez des souris éveillées (Brecht et al., 2004). En 2008, les auteurs montrent d'une manière similaire que la stimulation d'un simple neurone du cortex somato-sensoriel peut remplacer un stimulus sensoriel et suffire à provoquer l'acquisition d'un comportement par le rat. Celui-ci apprend littéralement à « tirer la langue » en réaction à la stimulation d'un neurone individuel, afin d'obtenir une récompense ! ((Houweling and Brecht, 2008), voir Figure 2). Brecht et collaborateurs suggèrent à la suite de ces observations que l'activité d'un seul neurone, quel que soit le type, peut être suffisante pour affecter la détection sensorielle et le changement de comportement associé.

Pris tous ensemble, les travaux que nous avons décrits suggèrent que certains neurones individuels remarquables peuvent non seulement modifier les dynamiques à l'échelle d'un réseau, mais également affecter à plus grande échelle les propriétés fonctionnelles de leur structure cérébrale. Cela signifie que le lien entre neurone individuel et fonction globale est plus ténu que ne pourrait laisser penser la complexité et la redondance du système nerveux mammifère. Ce que ces travaux suggèrent également, c'est que, quelle que soit la structure considérée, seule une fraction de neurones sont capables d'affecter la dynamique ou la fonction du réseau. D'où la question : *quelles sont les particularités de ces neurones fonctionnellement remarquables ?*

III. Les propriétés des neurones remarquables du point de vue fonctionnel :

Au travers de la littérature, plusieurs hypothèses ont été formulées pour tenter d'expliquer par quelles propriétés certains neurones sont capables d'imprimer leur marque sur les dynamiques du réseau.

Certains groupes ont raisonné en terme d'*efficacité synaptique* (Lisman, 1997; London et al., 2002). L'efficacité synaptique est la capacité d'un neurone pré-synaptique à provoquer une modification significative du potentiel de membrane des neurones post-synaptiques. Ainsi, un potentiel d'action généré dans l'axone par un neurone « efficace » aurait plus de chance d'influencer les neurones post-synaptiques, et donc d'influencer l'activité et la fonction du réseau. En accord avec cette hypothèse, un certain nombre de travaux décrits plus haut (Brecht et al., 2004; Houweling and Brecht, 2008; Molnár et al., 2008) a constaté que les neurones capables d'influencer les dynamiques du réseau n'avaient souvent besoin que d'un nombre réduit de potentiels d'action pour affecter les dynamiques fonctionnelles, ce qui suggère une efficacité synaptique importante. De plus, certaines propriétés intrinsèques des neurones, qui favorisent l'efficacité synaptique (Lisman, 1997; Xu and Clancy, 2008), ont été retrouvées chez des neurones capables d'influencer individuellement l'activité du réseau (Wittner and Miles, 2007).

Cependant un neurone, aussi efficace soit-il, aura une influence limitée s'il ne dispose pas de connexions nombreuses avec les autres neurones du réseau. Le paramètre de *connectivité* est donc une autre propriété à prendre en compte pour étudier les propriétés des neurones remarquables du point de vue fonctionnel. Le développement récent des techniques de physiologie et d'imagerie a permis d'étudier le lien entre la connectivité propre à un neurone avec sa fonction dans l'émergence du réseau. Ainsi, Rosa Cossart et collaborateurs ont désigné la famille de neurones capables de moduler les activités électriques de l'hippocampe immature sous le nom de neurones « hubs » (voir aussi plus haut, (Bonifazi et al., 2009)). Ce terme de hubs est emprunté à la théorie des systèmes complexes et désigne des nœuds d'un réseau à connectivité exceptionnelle. En effet, en combinant des techniques d'imagerie et de physiologie à une analyse mathématique, les auteurs ont montré que ces neurones sont rares mais fortement connectés fonctionnellement à d'autres neurones. Ainsi les auteurs ont relié de manière irréfutable la structure d'un neurone à sa fonction,

puisque dans leurs conditions seuls les hubs modulent les activités de l'hippocampe en développement (Bonifazi et al., 2009).

Peu après la parution de ces résultats, Marianne Case et Ivan Soltesz ont comparé les neurones « hubs » à des « aristocrates » (Case and Soltesz, 2009). Leur image se justifie d'autant mieux que ce statut de hub semble acquis dès la naissance des neurones. En effet, les neurones hubs ne sont pas seulement une sous-catégorie de neurones présentant des particularités morpho-physiologiques singulières, il s'agirait des premiers neurones à coloniser l'hippocampe (Picardo et al., 2011).

Ces travaux, ainsi que d'autres (Ellender and Paulsen, 2010; Ellender et al., 2010; Sohal et al., 2009) montrent que les neurones GABAergiques forment de bons candidats pour constituer des neurones individuels remarquables du point de vue fonctionnel. D'une part parce que les connexions des neurones GABAergiques dans le cortex sont nombreuses, divergentes et efficaces (DeFelipe and Fariñas, 1992; Freund and Buzsáki, 1996; Houweling and Brecht, 2008; Klausberger and Somogyi, 2008). D'autre part parce que les neurones GABAergiques constituent une population hétérogène, composée de différents sous-types, distincts par leurs propriétés électrophysiologiques et biochimiques, leur date et leur lieu de neurogenèse (Butt et al., 2005; Tricoire et al., 2011) et surtout par leurs profils de connectivité (Freund and Buzsáki, 1996). Ainsi, on attribue aux sous types de neurones GABAergiques des propriétés fonctionnelles singulières (Klausberger and Somogyi, 2008; Klausberger et al., 2003; Somogyi and Klausberger, 2005).

A l'inverse, la mise en évidence de neurones aux propriétés fonctionnelles remarquables semble au premier abord plus compliquée pour les neurones glutamatergiques, pourtant majoritaires dans le cortex. En effet, la littérature scientifique considère souvent que les neurones glutamatergiques d'une structure corticale donnée possèdent des propriétés homogènes, déterminées par des processus développementaux eux aussi souvent considérés comme relativement uniformes dans l'ensemble du cortex (Parnavelas, 2000). De plus, les études fonctionnelles considèrent souvent les neurones glutamatergiques comme une population homogène (Klausberger and Somogyi, 2008; Klausberger et al., 2003; Somogyi and Klausberger, 2005).

Pour autant, les neurones glutamatergiques ne sont pas de simples pions d'un jeu d'échec dominés par les pièces nobles que seraient les neurones GABAergiques. Nous l'avons montré plus haut, ils sont capables de moduler les activités de réseau, ou des fonctions cérébrales dans diverses structures (Brecht et al., 2004; Houweling and Brecht, 2008; Li et al., 2009; Miles and Wong, 1983). De plus, un grand nombre de publications souligne la diversité de leurs propriétés électrophysiologiques, biochimiques et morphologiques (pour revues, voir (Slomianka et al., 2011; Spruston, 2008; Witter, 2007)). Enfin, un nombre croissant de travaux soulignent leur hétérogénéité fonctionnelle au sein d'une même couche corticale (Bland et al., 2005; Miles and Wong, 1983; Mizuseki et al., 2011; Senior et al., 2008; Tronson et al., 2009). On peut alors supposer que comme pour les neurones GABAergiques, la diversité morpho-fonctionnelle des neurones pyramidaux est inscrite dans des processus développementaux distincts.

Pour les raisons invoquées précédemment, nous proposons, au cours de cette thèse, de reconsidérer l'hétérogénéité morpho-fonctionnelle des neurones glutamatergiques dans une perspective développementale.

Dans cette optique, nous nous sommes intéressés aux neurones pyramidaux de la région CA3 de l'hippocampe, qui constituent la grande majorité des neurones glutamatergiques de cette région. Dans une première partie, nous aborderons brièvement l'organisation cytologique de la région CA3. Celle-ci présente en effet l'avantage de posséder un réseau capable de générer en autonomie de nombreuses activités coordonnées de manière autonome. Certaines de ces activités peuvent être générées par la région CA3 isolée en l'absence de transmission GABAergique rapide (Miles and Wong, 1983). C'est ce modèle qui nous a permis d'étudier les propriétés fonctionnelles des neurones pyramidaux en faisant abstraction de la transmission GABAergique.

Dans un deuxième temps, nous passerons en revue les types neuronaux qui composent la région CA3, en insistant particulièrement sur les neurones pyramidaux, leurs propriétés, leurs connexions et leur diversité. Nous verrons qu'il existe dans CA3 des populations de neurones pyramidaux aux propriétés différentes, qui sont potentiellement associées à des fonctions différentes dans le réseau.

Dans le but de mieux comprendre le lien qu'il pourrait exister entre la diversité morpho-fonctionnelle des neurones pyramidaux et leur développement, nous décrirons dans une dernière partie les étapes du développement des neurones pyramidaux, de leur neurogenèse à leur intégration au réseau.

Ainsi, au cours de cette thèse, nous avons cherché à mettre en évidence l'existence d'une hétérogénéité morpho-fonctionnelle des neurones pyramidaux de la région CA3, en nous appuyant sur un modèle pharmacologique de blocage de la transmission GABAergique rapide, qui entraîne l'apparition d'activités coordonnées dans CA3. Partant de là, nous voulions relier la diversité morpho-fonctionnelle des neurones pyramidaux avec leur date de neurogenèse, qui sonne le signal de départ des processus de développement.

Ainsi nous avons pu tester si le lien entre date de naissance et poids fonctionnel dans le réseau, qui a été mis en évidence pour les neurones GABAergiques de l'hippocampe (Picardo et al., 2011), était une règle générale qui s'appliquerait aussi aux neurones glutamatergiques pyramidaux.

Chapitre 2 : Structure et fonction du réseau de la région CA3 de l'hippocampe

Au cours de cette thèse, nous avons principalement travaillé sur des hippocampes de souris, et plus particulièrement sur la région CA3 de l'hippocampe. Ce chapitre a pour objet de définir les avantages que confère cette structure dans le cadre de notre problématique de thèse, mais aussi de clarifier certains termes utilisés tout le long de ce document. Ainsi, nous rappellerons sommairement dans un premier paragraphe l'anatomie de l'hippocampe en général et de CA3 en particulier. Nous verrons que grâce à sa structure particulière, la région CA3 est impliquée dans la genèse d'activités coordonnées de réseau que nous décrirons. Partant de là, nous discuterons du modèle fonctionnel le plus adéquat au regard de la question posée, qui visait à explorer la diversité fonctionnelle des neurones pyramidaux dans une perspective développementale.

I. Anatomie de la région CA3 de l'hippocampe :

L'hippocampe est une structure du *cortex cérébral*. Ce dernier est composé de structures récentes du point de vue phylogénique, telles que le *néocortex*, et des structures plus anciennes, telles que l'*hippocampe*. Le néocortex et l'hippocampe présentent un grand nombre de similarités des points de vue de l'organisation du réseau, et du développement ; c'est pourquoi, au cours de cette thèse, nous comparerons parfois les caractéristiques du néocortex et de CA3.

L'hippocampe a été décrit pour la première fois par Ramòn y Cajal, mais la terminologie actuellement utilisée pour définir son anatomie a été fixée par Lorente de No (Andersen *et al.*, 2007*). D'après cette terminologie, l'hippocampe est composé de trois aires : le *subiculum*, le *gyrus denté*, et les *cornes d'Ammon*, voir Figure 3. L'aire des cornes d'Ammon (ou CA) est formée de deux grandes régions : la région CA1, accolée au subiculum et la région CA3, accolée au gyrus denté. Malgré des différences anatomiques claires (Amaral and

Witter, 1989), CA1 et CA3 présentent elles aussi un grand nombre de similarités, et c'est pourquoi nous les comparerons souvent au cours de cette thèse.

La région CA3 elle-même présente des subdivisions. Ainsi, sur une coupe coronale ou horizontale, la partie courbée proche de CA1 est appelée CA3a. La partie incluse dans le gyrus denté est appelée CA3c. Enfin, la partie centrale, plane, est définie comme CA3b. La position relative de ces subdivisions par rapport au gyrus denté forme l'axe *proximodistal*, où CA3c est la région la plus proximale, et CA3a la plus distale.

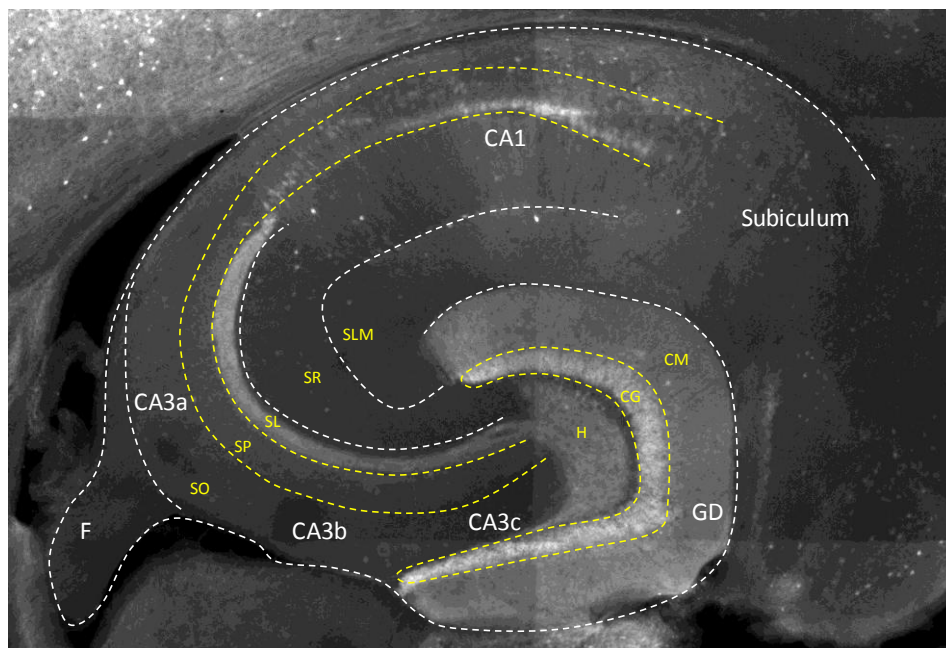


Figure 3 : Anatomie de l'hippocampe.

Les différentes régions et sous-régions (en blanc) et couches (en jaune) de l'hippocampe, sur une coupe horizontale d'hippocampe de souris adulte, après immunomarquage de la calbindine. **CA** : Corne d'Ammon (CA1, CA3a-c), **GD** : Gyrus denté, **F** : Fimbria, **SO** : *Stratum oriens*, **SP** : *Stratum Pyramidale*, **SL** : *Stratum lucidum* (NB : celle-ci est visible grâce aux fibres axonales des cellules granulaires immuno-positives pour la calbindine), **SR** : *Stratum Radiatum*, **SLM** : *Stratum Lacunosum-moleculare*, **H** : Hile (ou *hilus*), **CG** : Couche granulaire, **CM** : Couche Moléculaire.

La région CA3 est également divisée en couches (ou *strata*) différenciées selon leur composition en neurones et en fibres. Les couches les plus proches du ventricule latéral (cavité contenant le liquide céphalo-rachidien) sont appelées conventionnellement *couches profondes*. Il y en a deux : l'*alveus* et le *stratum oriens*. Les couches les plus proches de la fissure hippocampique sont appelées couches superficielles. Ces dernières sont au nombre

de trois (de la plus profonde à la plus superficielle) : le *stratum lucidum*, le *stratum radiatum*, et le *stratum lacunosum-moleculare*. Les couches profondes et superficielles, peu denses en neurones, mais riches en fibres, encadrent une dernière couche abondante en neurones : le *stratum pyramidale*. L'ensemble de ces couches forme un axe perpendiculaire à l'axe proximodistal ; c'est l'axe *radial*.

Nous verrons dans la partie suivante les propriétés de CA3 dans une perspective plus dynamique. Ainsi, nous verrons que cette région est capable de générer un grand nombre d'activités coordonnées. Certaines de ces activités sont associées à des fonctions cognitives importantes, que nous décrirons brièvement. La problématique de thèse nécessitant de discriminer les neurones pyramidaux selon leur rôle fonctionnel, nous discuterons également dans la partie suivante du modèle fonctionnel le plus adéquat.

II. Fonction de la région CA3.

1. La région CA3 et la mémoire spatiale.

Les aires de l'hippocampe, dont la région CA3, sont impliquées *in vivo* dans des processus cognitifs, tels que la mémoire *épisode*, qui a trait aux événements vécus par l'individu, ainsi que la mémoire *spatiale*, qui a trait aux informations sur les environnements traversés par l'individu, et que nous traiterons ici. Le processus de mémorisation nécessite des processus mnésiques d'*encodage*, c'est-à-dire la création d'une trace mnésique des informations, et de *consolidation*, c'est-à-dire la sauvegarde à long terme de ces informations en vue de leur *remémorisation*.

Dans le cas de la mémoire spatiale, l'encodage implique la formation de représentations spatiales, de cartes cognitives, de l'environnement de l'individu. Chez le rongeur, mais aussi chez l'homme (Ekstrom et al., 2003), cette représentation dépend en partie de l'activité d'une catégorie de neurones appelés *cellules de lieu* (ou *place cells*). Ces cellules de lieu ont la particularité de décharger sélectivement quand l'individu se situe à un emplacement précis d'un environnement familier (appelé *champ récepteur* de la cellule de lieu, ou *place*

field). Chez le rongeur, de telles cellules ont été mises en évidence dans toutes les régions de l'hippocampe : CA3, mais aussi CA1 et le gyrus denté (Andersen et al., 2007 *).

D'une manière intéressante, le réseau de CA3 crée une représentation spatiale partiellement indépendante de celles du gyrus denté et de CA1. Ainsi, CA3 peut former une représentation spatiale de l'environnement même en l'absence de connexions avec le gyrus denté et CA1 (Brun et al., 2002; McNaughton et al., 1989). De même, la formation de cartes cognitives présente quelques particularités dans la région CA3, selon certains modèles (Guzowski et al., 2004; Leutgeb and Leutgeb, 2007). Ainsi, lorsqu'un environnement familier est légèrement modifié jusqu'à un certain point, les champs récepteurs des cellules du réseau CA3 restent relativement stables par rapport à ceux de CA1. C'est ainsi que l'animal « reconnaît » un environnement malgré des perceptions sensorielles qui font état de légères différences : c'est le phénomène de complétion contextuelle (*pattern completion*) (Lee et al., 2004; Vazdarjanova and Guzowski, 2004).

A l'inverse, lorsque l'environnement n'est pas familier, le réseau CA3, à la différence de CA1 et du gyrus denté, recrute une population distincte de cellules de lieu, aux champs récepteurs différents (Leutgeb et al., 2004; Vazdarjanova and Guzowski, 2004). Ainsi, peu après un changement d'environnement, les populations de cellules de lieu correspondant aux représentations passées et présentes vont transitoirement décharger en compétition, avant que la décharge des cellules de lieu correspondant à la représentation spatiale la plus récente se stabilise (Jezek et al., 2011). De cette manière, l'animal détecte les fortes dissimilitudes entre deux environnements ; c'est le phénomène de séparation contextuelle (*pattern separation*), qui aboutit à une nouvelle représentation de l'environnement dans CA3 (ou *remapping*).

La région CA3 est impliquée non seulement dans l'encodage des informations liées aux environnements traversés par l'individu, mais aussi dans le phénomène de sauvegarde, et de remémoration de ces informations. Ainsi, la lésion de CA3 (Brun et al., 2002) ou le blocage sélectif de la transmission synaptique de CA3 (Nakashiba et al., 2008) chez le rongeur n'empêche pas la formation de représentations spatiales dans les autres régions hippocampiques telles que CA1. En revanche, la lésion de CA3 affecte fortement la capacité

des rongeurs à se repérer dans un environnement déjà rencontré, ce qui suggère une altération de la mémorisation à long terme des informations spatiales.

Nous verrons dans le paragraphe suivant que ces deux processus mnésiques impliquent des activités de réseau qui sont générées dans CA3.

2. Les activités de réseau fonctionnellement significatives de la région CA3.

La région CA3 sous-tend des activités du réseau qui surviennent *in vivo* au cours de différents états cérébraux, et qui reflètent les processus mnésiques en cours. Nous décrirons ici les activités les mieux décrites dans CA3, ainsi que leur traduction *in vitro*.

2.1. Les activités rythmiques gamma et thêta.

Les activités rythmiques, appelées aussi *oscillations*, reflètent la synchronisation rythmique de la décharge d'une population neurone dans une structure cérébrale donnée. Elles sont souvent définies par la bande de fréquence de leur cycle d'oscillation.

Ainsi, des oscillations persistantes de la bande de fréquence *gamma* (30-100 Hz) et *thêta* (4-10Hz) ont été enregistrées *in vivo* dans l'hippocampe du rongeur. L'activité thêta, qui coexiste souvent avec une activité gamma (Bragin et al., 1995), est enregistrée pendant les phases d'éveil liées à la navigation et aux tâches de mémorisation, ainsi que pendant le sommeil paradoxal (aussi appelées *Rapid Eye-Movement Sleep*, ou *REM Sleep*, (Csicsvari et al., 1999; GRASTYAN et al., 1959; Harris et al., 2002; Vanderwolf, 1969)).

Pendant la navigation du rongeur, le pic négatif du cycle thêta est constitué *in vivo* par la sommation de la décharge des cellules de lieu. Au niveau individuel, lorsque l'animal entre dans le champ récepteur d'une cellule de lieu donnée, celle-ci décharge avant le pic positif de l'oscillation enregistrée en extracellulaire. Alors que l'animal se déplace à travers le champ récepteur, la cellule de lieu décharge à des phases de plus en plus précoces pendant les cycles thêta consécutifs. Ce phénomène, appelé « précession de phase », permet de prédire la position de l'animal dans le champ récepteur (O'Keefe and Recce, 1993; Skaggs et al., 1996).

De plus, chaque cycle thêta est divisé par un nombre relativement constant de cycles gamma (Bragin et al., 1995). Ainsi, pendant la navigation, la précession de phase de la décharge de la cellule de lieu s'accompagne d'un changement de cycle gamma pendant les cycles thêta successifs (Lisman, 1999; Lisman, 2005). Ainsi, les activités rythmiques thêta et gamma définiraient un cadre de lecture de la décharge des cellules qui permettrait de structurer les processus de représentation et de mémorisation spatiale (Lisman, 1999; Lisman, 2005).

Très étudiées *in vivo*, les activités rythmiques ont également fait l'objet de modèles *in vitro*. Les rythmes thêta peuvent être enregistrés après traitement avec des agents pharmacologiques tels que des agonistes cholinergiques (Konopacki et al., 1987), des modulateurs de la transmission glutamatergiques (Gillies et al., 2002), ou même spontanément (Goutagny et al., 2009). De même, les rythmes gamma peuvent être induits également par la modulation glutamatergique et cholinergique (Fisahn et al., 1998). Enfin, il existe également des modèles où les deux activités rythmiques coexistent en présence d'agoniste cholinergique (Fischer et al., 2002).

La région CA3 présente un intérêt particulier en ce qui concerne ces activités rythmiques. En effet, la région CA3 est un site de genèse partiellement autonome des activités de type gamma *in vitro* (Fisahn et al., 1998), tout comme *in vivo* (Csicsvari et al., 2003; Hájos and Paulsen, 2009). De même, des études suggèrent que CA3, mais aussi CA1, sont capables de générer indépendamment et en autonomie des rythmes thêta *in vitro* (Fischer et al., 2002; Goutagny et al., 2009; Traub et al., 1989).

2.2. Les sharp-wave et les ripples.

L'hippocampe est également le siège d'un autre type d'activité, les *sharp waves* (« vagues tranchantes ») associés aux *ripples* (« ondulations »).

Contrairement aux activités rythmiques, qui sont des activités persistantes, les *sharp waves-ripples* (SPW-R) sont des activités de réseau transitoires ; leur durée est de l'ordre de la centaine de millisecondes. Enregistrés en extracellulaire, ces activités sont constituées d'une composante lente, la sharp wave proprement dite (0,1-3Hz), et les ripples forment la composante rapide (120-200 Hz, (Buzsáki, 1986)).

Les SPW-R surviennent *in vivo* pendant les phase de veille oisives (*idle*) ou pendant les phases de sommeil non paradoxal (ou *slow wave sleep* (Buzsáki, 1986)). *In vitro*, ces activités peuvent survenir spontanément (Ellender et al., 2010; Kubota et al., 2003).

Ces modèles ont permis de montrer que, comme pour les activités rythmiques, la région CA3 est capable de générer des SPW-R à la fois *in vitro* et *in vivo*, même lorsque l'influence des régions extra-hippocampique est réduite (Csicsvari et al., 2003). Ainsi, ces activités proviennent de la décharge coordonnée d'une petite population de neurones dans la région CA3a/b, qui se propage vers les régions CA3c et CA1 (Csicsvari et al., 2003; Ellender et al., 2010).

Les SPW-R jouent un rôle majeur dans les mécanismes de consolidation de la mémoire. Deux études ont supprimé les SPW-R *in vivo* pendant le sommeil en effectuant une stimulation des afférences commissurales de l'hippocampe. Dans les deux cas, ces protocoles aboutissent à une altération de la mémorisation spatiale des animaux (Ego-Stengel and Wilson, 2010; Girardeau et al., 2009).

3. Les activités de réseau immatures de la région CA3

A cause de leur présence tout au long de la vie, les activités rythmiques et les activités de type SPW-R sont considérées comme des activités de réseau « matures », étudiées au plus tôt pendant la troisième semaine de vie postnatale du rongeur (Ellender et al., 2010; Fisahn et al., 1998). Elles apparaissent pourtant à des périodes qui correspondent au développement du système nerveux ; en effet, CA3 génère transitoirement des rythmes gamma et thêta aux alentours de la première semaine de vie postnatale *in vivo*, mais aussi *in vitro* (Lahtinen et al., 2002; Palva et al., 2000). De même, les SPW-R sont enregistrés *in vivo* après la première semaine de vie postnatale du rongeur (Leinekugel et al., 2002; Sipilä et al., 2006).

Pendant les premiers jours de vie postnatale, il existe une période pendant laquelle les activités rythmiques et les SPW-R sont absents des enregistrements de l'hippocampe.

Pourtant, l'hippocampe est capable de générer des activités de réseau particulières qui reflètent un état de maturation incomplet. En une image : le réseau « babille » avant de savoir parler. Ces activités immatures, qui précèdent les activités fonctionnellement significatives, ont été retrouvées dans un grand nombre de structures (Allene and Cossart, 2010; Blankenship and Feller, 2010) et d'espèces (Ben-Ari, 2001; Khazipov et al., 2001).

Dans l'hippocampe, de telles activités immatures ont d'abord été identifiées *in vitro*. Ces activités, appelées « potentiels géants dépolarisants » (ou *giant depolarizing potentials*, GDPs) surviennent pendant la première semaine de vie du rongeur (Ben-Ari et al., 1989; Ben-Ari et al., 2007). A l'image des activités rythmiques et les SPW-R, la région CA3 semble jouer un rôle central dans la génération des GDPs. En effet, les GDPs persistent *in vitro* même lorsque la région CA3 est isolée (Cattani et al., 2007), car la région CA3 semble posséder les composants neuronaux nécessaires à la génération de ces activités (Bonifazi et al., 2009).

Les GDPs ont également été enregistrés *in vivo*, chez des rongeurs nouveaux nés, pendant les phases de veille oisive, et de sommeil, mais pas pendant le mouvement (Leinekugel et al., 2002). Ils coexistent avec des sharp waves, dépourvus de leur composante rapide ripple jusqu'au dixième jour postnatal environ. Après cette date, les GDPs disparaissent, tandis que les ripples apparaissent (Leinekugel et al., 2002). Cela suggère qu'*in vivo* les activités matures remplacent les GDPs, après une brève période de coexistence.

Aucune fonction cérébrale n'a été associée avec les GDPs. Cependant, les GDPs, comme les activités immatures en général pourraient être nécessaires à la maturation des structures nerveuses (Katz and Shatz, 1996; Mohajerani et al., 2007).

Un autre type d'activité a été enregistré plus tôt encore dans les régions CA1 et CA3 de l'hippocampe. Il s'agit des SPAs (pour *Small Plateau Assemblies*). Ces derniers reflètent une activité coordonnée de neurones aux stades précoces de la maturation de leurs propriétés morpho-physiologiques ((Crépel et al., 2007), Allène et al., en soumission), un stade où ils sont connectés en petits groupes par des connexions non synaptiques. Au contraire des GDPs, aucun équivalent *in vivo* n'a été clairement mis en évidence à ce jour.

Nous avons vu dans les paragraphes précédents que la région CA3 était impliquée dans la génération d'un grand nombre d'activités corrélées physiologiques, matures et immatures, et dans l'émergence de fonctions cognitives d'importance. Nous allons voir que les propriétés de la région CA3 peuvent être détournées dans un contexte pathologique.

4. Activités de réseau pathologiques de la région CA3.

L'hippocampe est impliqué dans un certain nombre de pathologies cérébrales, et notamment, certains syndromes épileptiques. La plus commune est *l'épilepsie du lobe temporal médial* (ELTM, (Sharma et al., 2007)).

Des modèles *in vivo* ont été conçus chez le rongeur afin de reproduire les conditions de l'ELTM chez le rongeur. Un des protocoles le plus utilisé est basé sur un traitement avec un agoniste cholinergique muscarinique, la pilocarpine. Les rongeurs acquièrent alors des symptômes similaires aux ELTM, en l'occurrence une décharge excessive des neurones de l'hippocampe et l'apparition d'activités corrélées appelées *crises*, accompagnées d'une altération des fonctions cognitives et comportementales (Curia et al., 2008).

Il existe également des modèles *in vitro* qui se manifestent par l'apparition d'activités corrélées *in vitro* similaires aux crises enregistrées *in vivo* ; par facilité nous les appellerons *activités épileptiformes* (Khalilov et al., 1997; Khalilov et al., 1999). Parmi ces modèles *in vitro*, un certain nombre est basé sur l'hypothèse classique selon laquelle les épilepsies sont attribuées à un déséquilibre de la balance excitation/inhibition en faveur de l'excitation (Scharfman, 2007). Ainsi, des modèles *in vitro* basés sur l'addition d'agonistes glutamatergiques (Ben-Ari and Gho, 1988), l'amplification de la transmission glutamatergique (Dreier and Heinemann, 1991; Trevelyan et al., 2006), le blocage de la transmission GABAergique rapide (Miles and Wong, 1983) ou encore le blocage de la recapture du glutamate (Cattani et al., 2007) entraînent l'apparition d'activités épileptiformes dans l'hippocampe de rongeur.

Curieusement, ces activités pathologiques du réseau peuvent survenir à la fois pendant les phases précoces de la vie du rongeur, lorsque le réseau génère des activités physiologiques

immatures telles les GDPs (Cattani et al., 2007), observations personnelles), mais aussi à l'âge adulte, lorsque le réseau est capable de générer des activités de réseau fonctionnellement signifiantes (Gomez-Di Cesare et al., 1997; Miles and Wong, 1983).

Certains de ces modèles démontrent une nouvelle fois un rôle central de CA3 dans la genèse de ces activités pathologiques. D'abord parce que la région CA3 est capable de générer des activités épileptiformes dans plusieurs modèles d'épilepsie, avant que celles-ci soient propagées dans les autres régions de l'hippocampe (Colom and Saggau, 1994; Miles and Wong, 1983). De plus, la région CA3 persiste à générer des activités épileptiformes lorsqu'elle est isolée des autres aires hippocampiques dans certains modèles *in vitro* (Cattani et al., 2007; Gomez-Di Cesare et al., 1997; Miles and Wong, 1983).

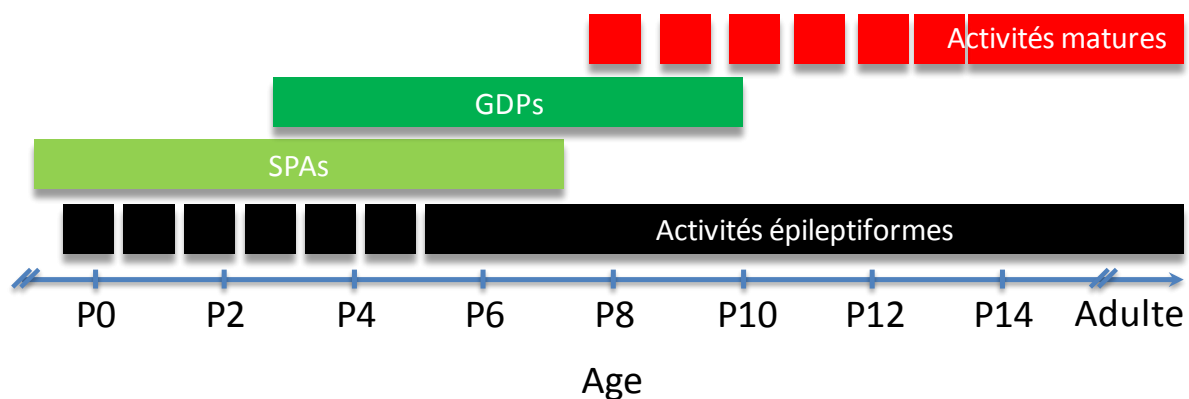


figure 4 : La région CA3 génère des activités neuronales corrélées pendant tous les stades de la vie.

Le réseau neuronal de la région CA3 de l'hippocampe du rongeur génère des activités corrélées qui reflètent son état de maturation. Pendant la période périnatale (P0-P3), des groupes de neurones génèrent des activités corrélées non synaptiques appelées SPAs (en vert clair, (Crépel et al., 2007)). Autour de la première semaine de vie (P3-P10), le réseau génère les premières activités corrélées synaptiques de la région CA3, les GDPs (en vert foncé (Ben-Ari et al., 1989)). A partir de la deuxième semaine de vie, le réseau CA3 génère des activités matures et fonctionnellement signifiantes telles que les activités rythmiques et les SPW-R qui persistent tout au long de la vie (en rouge, (Lahtinen et al., 2002; Leinekugel et al., 2002; Palva et al., 2000; Sipilä et al., 2006)). Dans des conditions pathologiques, des activités épileptiformes peuvent survenir à tous les stades de la vie (en noir, (Cattani et al., 2007; Gomez-Di Cesare et al., 1997)).

L'ensemble des données décrites ci-dessus suggère que la région CA3 est capable de générer des activités corrélées, pendant toutes les phases de la vie. Ces activités peuvent survenir *in vitro*, même lorsque la région CA3 est isolée, dans des conditions physiologiques, mais aussi dans des conditions reproduisant un contexte pathologique.

Dans le cadre de notre problématique, nous voulions discriminer le rôle fonctionnel des neurones glutamatergiques pyramidaux en faisant abstraction de la composante GABAergique. Le modèle idéal serait alors un réseau uniquement composé de neurones glutamatergiques d'où émergerait une activité de réseau. Dans ce cadre, le modèle de blocage pharmacologique de la transmission GABAergique rapide dans la région CA3 est celui qui se rapproche le plus du modèle idéal. Outre son intérêt éventuel dans l'étude des mécanismes de genèse des activités épileptiformes (voir 143), il nous a permis d'étudier un réseau fonctionnel qui génère des activités initiées par la transmission glutamatergique fournie par les neurones pyramidaux, la transmission GABAergique lente, non bloquée, étant essentiellement impliquée dans la terminaison des activités épileptiformes (de la Prida et al., 2006).

Dans le chapitre suivant, nous décrirons les types de neurones de la région CA3, ainsi que leurs propriétés intrinsèques et leurs connexions. C'est ce réseau de neurones présent dans CA3 qui est à l'origine de la génération des activités coordonnées que nous avons décrites ci-dessus. Etant donné que nous nous sommes particulièrement intéressés aux neurones pyramidaux, c'est eux que nous décrirons le plus en détail.

Chapitre 3 : Les cellules de la région CA3 de l'hippocampe

I. Peut-on négliger les cellules gliales ?

Comme toutes les régions cérébrales, l'hippocampe est principalement composé de deux types cellulaires ; les *neurones* et les *cellules gliales*, majoritaires. Longtemps, les cellules gliales ont été assimilées à des auxiliaires passifs des neurones, qui s'acquittent de tâches métaboliques, protectrices, ou encore de support, tandis que les neurones étaient considérés comme les acteurs uniques de la communication cellulaire dans le système nerveux, grâce à leurs neurites (axone et dendrites) et leur excitabilité membranaire (Perea et al., 2009).

Pourtant, de nombreuses observations ont mis en évidence le rôle actif dans la transmission synaptique d'une catégorie de glie fortement représentées dans le système nerveux central, les *astrocytes*. Ces observations sont à l'origine de la naissance du concept de *synapse tripartite* (Araque et al., 1999), composée de trois éléments actifs: les neurones pré et postsynaptique et les astrocytes qui englobent la synapse. Ainsi, les astrocytes sont des cellules excitables à l'image des neurones, grâce à des variations de l'ion calcium dans des compartiments du cytoplasme (Charles et al., 1991; Cornell-Bell et al., 1990; Panatier et al., 2011). Comme pour les neurones encore, ces variations de calcium peuvent être déclenchées par des neurotransmetteurs, les astrocytes exprimant toute une panoplie de récepteurs membranaires (Perea and Araque, 2005). Enfin, toujours comme les neurones, les cellules gliales jouent un rôle actif dans la transmission cellulaire en libérant des gliotransmetteurs, capables d'affecter d'autres cellules gliales, mais aussi des neurones. Ainsi, la libération d'adénosine par les astrocytes au niveau des synapses glutamatergiques module fortement l'efficacité de la transmission synaptique dans la région CA1 de l'hippocampe (Panatier et al., 2011).

Toutefois, le rôle des astrocytes semble relativement restreint localement aux synapses. Bien que les astrocytes puissent aussi libérer du glutamate, provoquant une élévation de l'excitabilité et une synchronisation de la décharge d'un groupe de neurones hippocampiques (Angulo et al., 2004; Fellin et al., 2004) ou corticaux (Poskanzer and Yuste, 2011), la gliotransmission est insuffisante pour générer des activités épileptiformes dans

l'hippocampe en condition de blocage de la transmission GABAergique rapide (Fellin et al., 2006).

Etant donné que la gliotransmission ne semble pas jouer un rôle central dans le modèle de blocage de la transmission GABAergique rapide utilisé au cours de cette thèse, nous détaillerons principalement les neurones de la région CA3.

II. Les neurones non glutamatergiques de la région CA3 :

Une des manières les plus consensuelles de classer les neurones est de prendre en compte le type de neurotransmetteurs qu'ils sécrètent. Ainsi, si l'on considère les neurones dont le corps cellulaire est présent dans l'hippocampe, les cellules glutamatergiques (sécrétant le neurotransmetteur glutamate) représentent la grande majorité (75-90%) des neurones de l'hippocampe. Les neurones GABAergiques (sécrétant du GABA, ou *acide gamma-aminobutyrique*) forment la deuxième population la plus nombreuse dans l'hippocampe. Enfin, il existe d'autres types neuronaux, plus rares, notamment des neurones cholinergiques (sécrétant de l'acétylcholine).

Nous aborderons brièvement dans une première partie les caractéristiques des neurones non glutamatergiques de la région CA3 de l'hippocampe. Ensuite, nous décrirons les différents types de neurones glutamatergiques, en insistant particulièrement sur les neurones glutamatergiques pyramidaux qui occupent une place centrale dans cette thèse.

1. Les neurones cholinergiques :

Les neurones cholinergiques jouent un rôle considérable dans l'hippocampe, notamment dans la génération des oscillations impliquées dans les processus mnésiques (Cobb and Davies, 2005). Ils agissent sur des récepteurs ionotropiques (de type *nicotiques*) et métabotropiques (de type *muscariniques*), nombreux au niveau de la membrane des neurones de l'hippocampe (Fabian-Fine et al., 2001; Levey et al., 1995).

La transmission cholinergique hippocampique est principalement fournie par les afférences extrinsèques septo-hippocampiques. Cependant, il existe une source cholinergique intrinsèque à l'hippocampe. En effet, des études basées sur des marquages immunocytochimiques mettent en évidence des cellules non-pyramidales exprimant des marqueurs cholinergiques telles la ChaT (ou *choline acétyltransférase*) mais pas de marqueurs GABAergiques tels que la GAD (ou *glutamate décarboxylase*) (Frotscher et al., 1986; Frotscher et al., 2000). Ces neurones potentiellement cholinergiques sont localisés dans toutes les aires et toutes les couches de l'hippocampe (Freund and Buzsáki, 1996; Frotscher et al., 2000). Il semble par ailleurs que leur proportion augmente de manière transitoire pendant les phases tardives du développement de l'hippocampe du rat (P15-20, (Kanaya-Ida and Ben Ari, 1989)). En revanche, ces neurones sont très rares dans l'hippocampe et *a fortiori* dans CA3 où seuls 2% des neurones potentiellement cholinergiques ont été observés (Frotscher et al., 2000).

Il est difficile de prendre en considération dans cette thèse le rôle des neurones cholinergiques de CA3. D'une part, à cause de leur nombre infinitésimal (voir plus haut). D'autre part, parce que les neurones immunopositifs pour ChaT n'ont pas été caractérisés, et qu'il existe peu de données suggérant une transmission cholinergique intrinsèque fonctionnelle dans l'hippocampe (Cobb et al., 1999; Hefft et al., 1999). Et enfin, parce que les neurones cholinergiques ne semblent pas jouer un rôle significatif dans le modèle que nous avons étudié pendant cette thèse puisque le blocage des récepteurs cholinergiques nicotinique et muscarinique n'affecte pas la fréquence des activités épileptiformes en absence de transmission GABAergique rapide (observations personnelles).

2. Les neurones GABAergiques :

Les neurones GABAergiques (sécrétant du GABA) sont une minorité dans l'hippocampe ; ils ne représentent que 10-20% des neurones (Aika et al., 1994; Caesar and Aertsen, 1991; Woodson et al., 1989). Dans l'hippocampe, le GABA agit principalement sur des récepteurs ionotropiques de type A (ou GABA_AR), à effet rapide et transitoire, et sur des récepteurs métabotropiques de type B (ou GABA_BR), à effet plus lent et durable (Bormann, 2000). Ces récepteurs seront décrits plus en détail p56.

Assez paradoxalement, le petit nombre des neurones GABAergiques est compensé par une forte hétérogénéité de leurs propriétés morpho-fonctionnelles. Nous verrons ici que cette diversité ferait de ces neurones GABAergiques des « modules » (Szentágothai, 1975), c'est-à-dire des pièces qui s'insèrent dans le réseau et qui enrichissent la complexité du circuit. *Nota bene* : Une partie des informations données ci-dessous fait référence aux neurones pyramidaux, qui feront ultérieurement l'objet d'une description détaillée p47.

Les neurones GABAergiques se distinguent par une grande variété morphologique, et notamment au niveau de leur arborisation axonale. En effet, les axones des différents types de neurones GABAergiques projettent vers des *strata* différents de l'hippocampe et innervent sélectivement des compartiments post-synaptiques distincts des neurones pyramidaux (Cossart et al., 2005; Freund and Buzsáki, 1996; Klausberger and Somogyi, 2008; Somogyi and Klausberger, 2005). Selon ces critères, les neurones GABAergiques de l'hippocampe peuvent être classés grossièrement en trois grandes catégories, pour chacun desquels nous donnerons quelques exemples représentatifs (voir aussi Figure 5):

1. La première est constituée par les neurones à innervation *périsomatique*, telles les cellules *en panier* (*basket cells*) dont la dense arborisation innerve de nombreux somas de cellules pyramidales (Cobb et al., 1997), et les cellules en *chandelier* ou *axo-axoniques*, qui forment des synapses au niveau du segment initial de l'axone des neurones pyramidaux (Li et al., 1992; Somogyi et al., 1983). Les cellules axo-axoniques possèdent un axone fortement divergent ; chacune de ces cellules peut contacter jusqu'à 1200 cellules pyramidales (Li et al., 1992; Somogyi et al., 1983)

2. Une deuxième catégorie de neurones GABAergiques contacte sélectivement les dendrites des cellules pyramidales. Ainsi, les axones des neurones *bistratifiés* (*bistratified cells*, (Buhl et al., 1994)) ou *des cellules lierre* (*ivy cells*, (Fuatealba et al., 2008)) forment des terminaisons sur toute l'arborisation dendritique des neurones pyramidaux. D'autres neurones de la même famille innervent préférentiellement les dendrites apicales distales des neurones pyramidaux ; c'est le cas des cellules *O-LM* (*Oriens-Lacunosum-Moleculare*, (McBain et al., 1994)) et des cellules *neurogliaformes* (Khazipov et al., 1995; Tamás et al., 2003; Vida et al., 1998).

3. Une dernière catégorie regroupe les neurones GABAergiques qui, en contradiction avec leur dénomination traditionnelle d'*interneurones*, possèdent un axone qui forme des connexions avec des régions lointaines. Ainsi, dans CA3, une population de neurones GABAergique innervent le septum médial ((Jinno and Kosaka, 2002; Jinno, 2009), voir aussi (Picardo et al., 2011)).

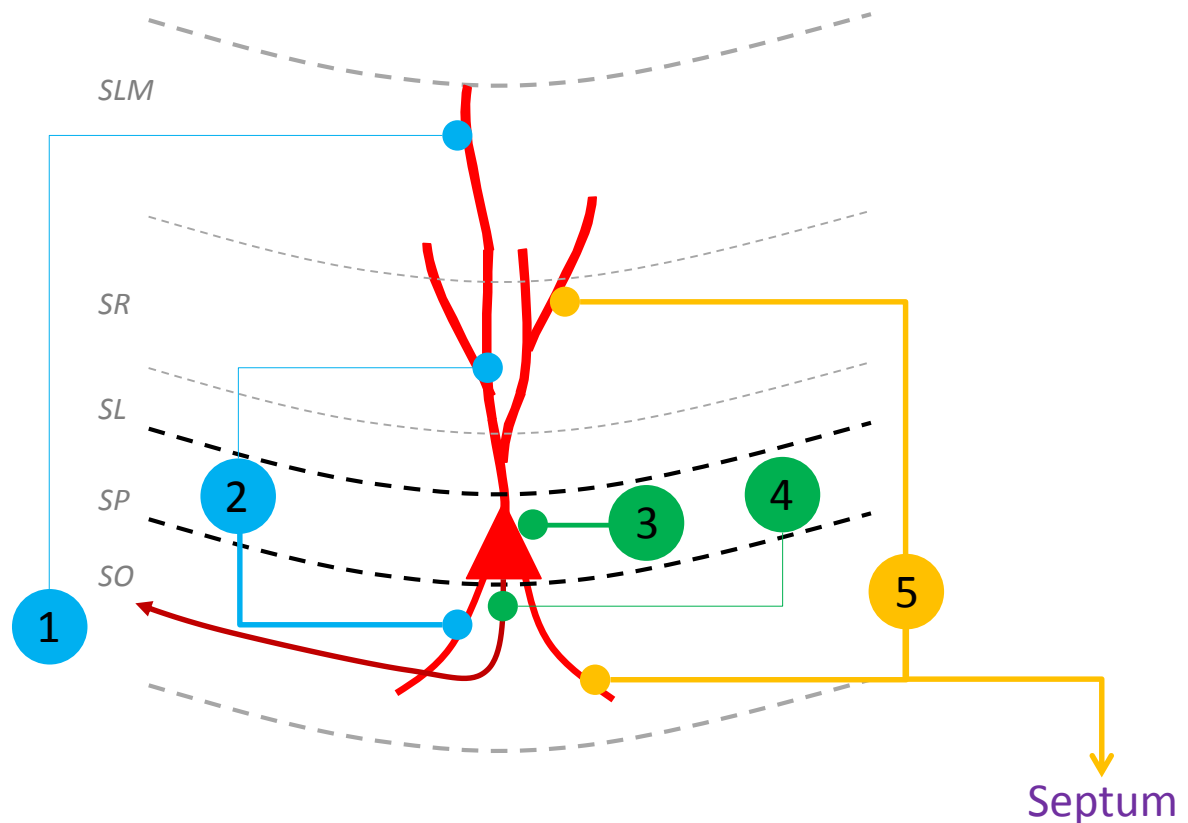


Figure 5 : Exemples de connexions GABAergiques dans la région des Cornes d'Ammon de l'hippocampe.

Trois grandes familles de neurones GABAergiques sont représentées schématiquement en fonction de la spécificité de leurs connexions et de la localisation de leur corps cellulaire. **En bleu** : les neurones GABAergique à innervation dendritique, **1** : neurone innervant spécifiquement les dendrites apicales des neurones pyramidaux, **2** : neurones innervant toute la longueur des dendrites . **En vert** : neurones GABAergique à innervation péricellulaire. **3** : Neurones innervant le soma, **4** : Neurone innervant le segment initial de l'axone. **En orange** : Neurones GABAergique à projection extrahippocampique, ici **5** : neurone GABAergique à projection hippocampo-septale. Voir (Jinno, 2009; Klausberger and Somogyi, 2008). SO : *Stratum oriens*, SP : *Stratum Pyramidale*, SL : *Stratum lucidum*, SR : *Stratum Radiatum* SLM : *Stratum Lacunosum-moleculare*.

Outre la sélectivité de leur innervation axonale, les différents types de neurones GABAergiques se distinguent par un profil temporel de décharge distinct pendant les activités de réseau qui surviennent durant différentes phases de veille cérébrales (voir p29). Ainsi les neurones axo-axoniques déchargent pendant le pic positif des activités rythmiques thêta, au moment où les neurones pyramidaux sont les moins actifs. A l'inverse, les neurones en paniers déchargent pendant la phase descendante du rythme, alors que les cellules bistratifiées et O-LM déchargent pendant le creux du rythme, de manière corrélée avec la décharge des neurones pyramidaux.

Ce « verrouillage de phase » (*phase locking*) de la décharge des neurones GABAergiques dépend du type d'activité de réseau. Ainsi, pendant les ripples associées aux sharp waves (*sharp-waves associated ripples*), les neurones GABAergiques en panier et les neurones bistratifiés déchargent en phase avec les neurones pyramidaux. A l'inverse, les cellules axo-axoniques déchargent seulement au début des ripples, alors que les cellules O-LM sont silencieuses pendant toute la durée des ripples (Klausberger and Somogyi, 2008; Klausberger et al., 2003; Somogyi and Klausberger, 2005).

L'innervation sélective, ainsi que le profil de décharge des neurones GABAergiques décrits ci-dessus suggère que la transmission GABAergique structure finement la fenêtre temporelle de décharge des neurones principaux (McBain and Fisahn, 2001). En accord avec cette idée, un certain nombre de travaux mettent en évidence une régulation de la décharge des neurones pyramidaux par les neurones GABAergiques pendant les rythmes gamma corticaux (Cardin et al., 2009), mais aussi les SPW-R (Ellender et al., 2010), ou encore les activités immatures (Bonifazi et al., 2009) de l'hippocampe. De plus, les neurones GABAergiques à projection extra-hippocampiques permettraient de coordonner l'activité neuronale entre plusieurs structures cérébrales (Jinno et al., 2007; Klausberger and Somogyi, 2008).

Il existe d'autres manières de classer les neurones GABAergiques. Notamment, les neurones GABAergiques forment des populations distinctes selon l'expression de marqueurs biochimiques, classiquement des protéines chélatrices du Calcium (telles que la Calbindine, la Parvalbumine, la Calrétinine, etc.) ou des neurotransmetteurs atypiques (tels que l'oxyde nitrique, le peptide vaso-intestinal VIP, la Cholecystokinine CCK, etc.) (DeFelipe, 1993). De même, les neurones GABAergiques ont été classés en fonction de leur profil de décharge de

potentiels d'action en réponse à un bref stimulus dépolarisant, très variable d'un neurone à l'autre. De ce point de vue, les neurones GABAergiques les mieux identifiés sont ceux qui déchargent un train rapide de potentiels d'action sans modification de l'intervalle entre chaque événement (ou *adaptation*); ce sont les cellules à décharge rapide (*fast spiking cells*). D'autres déchargent de manière discontinue, ou bien en bouffée, ou encore avec une adaptation de la fréquence de potentiels d'action (voir (Markram et al., 2004) pour revue). Bien qu'elles ne soient pas parfaitement corrélés avec les propriétés morphofonctionnelles des neurones GABAergiques (Burkhalter, 2008), les différences biochimiques et électrophysiologiques permettent d'affiner les classifications des neurones GABAergiques.

D'un point de vue développemental, les neurones GABAergiques des rongeurs proviennent principalement de territoires germinatifs subpalliaux (future zone des ganglions de la base) appelés *éminences ganglionnaires*, de trois types : médiale (EGM), latérale (EGL) et caudale (EGC) (Anderson et al., 1997). D'une manière remarquable, la diversité des neurones GABAergiques est en partie déterminée par un code spatiotemporel. Ainsi, leur identité est codée en *lieu* par leur zone de neurogenèse (EGM, EGL ou EGC), et en *temps* par leur date de neurogenèse dans le néocortex (Butt et al., 2005; Wonders and Anderson, 2006), ainsi que dans l'hippocampe ((Picardo et al., 2011; Tricoire et al., 2011), voir Figure 6).

La diversité morpho-fonctionnelle, électrophysiologique, biochimique et développementale des neurones GABAergiques efface quelque peu celle des neurones glutamatergiques, souvent considérés comme d'une relative uniformité. Nous verrons pourtant dans la partie suivante que les neurones glutamatergiques, présentent aussi une richesse morpho-fonctionnelle.

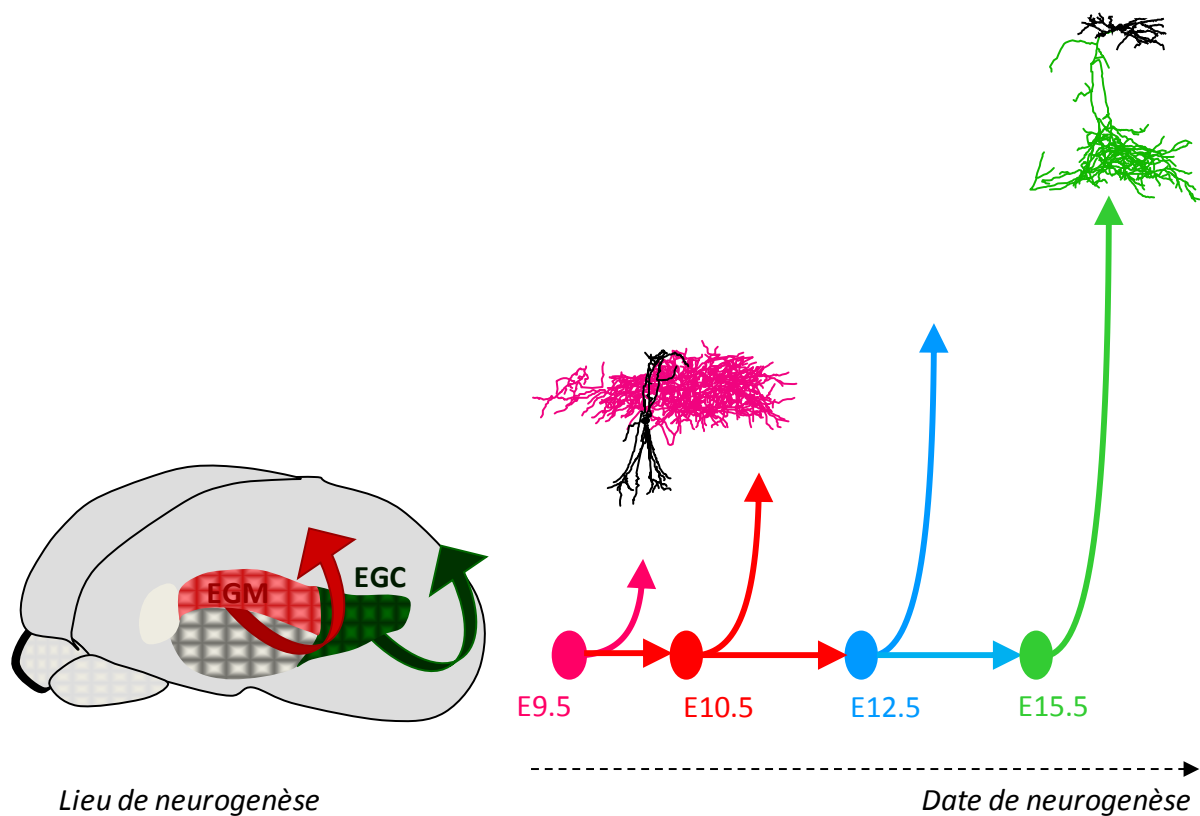


Figure 6 : La diversité des neurones GABAergiques du cortex provient d’origines spatiotemporelles différentes.

Les neurones GABAergiques du cortex proviennent de différentes zones germinatives (ici représentées les éminences ganglionnaires médiane et caudale, EGM et EGC) et de différentes dates de neurogenèse (E9,5–E15,5). La diversité des dates et des lieux de neurogenèse des neurones GABAergiques est en partie à l’origine de leur hétérogénéité morpho-physiologique et fonctionnelle). Voir (Butt et al., 2005; Tricoire et al., 2011).

III. Les neurones glutamatergiques :

Les neurones glutamatergiques sont les plus nombreux dans le cortex en général et dans l'hippocampe en particulier. Le glutamate qu'ils sécrètent agit sur des récepteurs métabotropiques, et des récepteurs ionotropiques de trois types : NMDA, AMPA, et kaïnate, du nom de leurs agonistes sélectifs, qui seront décrits plus en détail dans une partie ultérieure (voir p56).

Nous verrons dans les paragraphes suivants que les neurones glutamatergiques les plus largement représentés dans CA3 (plus de 90%) sont les neurones *pyramidaux*. Il existe toutefois de rares cellules glutamatergiques non-pyramidales que nous décrirons en premier.

1. Les cellules non-pyramidales :

1.1 Les cellules géantes :

Des cellules glutamatergiques appelées cellules « *géantes* » ont été identifiées dans le *stratum radiatum* d'abord dans CA1 (Gulyás et al., 1998; Maccaferri and McBain, 1996), puis dans CA3 (Savić and Sciancalepore, 2001).

Leur arborisation neuritique est composée de deux larges dendrites apicales en forme de « cornes » qui s'étendent d'un soma triangulaire vers le *stratum lacunosum-moleculare*, les faisant quelquefois ressembler à des pyramides inversées. Leur axone projette dans le *stratum oriens* et semble contacter préférentiellement les neurones GABAergiques (Gulyás et al., 1998).

Hormis leur localisation et quelques rares propriétés électrophysiologiques, notamment une résistance élevée, ainsi qu'une décharge régulière des potentiels d'action due à une faible accommodation (Savić and Sciancalepore, 2001), les cellules géantes présentent une grande similarité avec les neurones pyramidaux (Gulyás et al., 1998; Savić and Sciancalepore, 2001). Ainsi, certaines publications ne les considèrent pas comme une population glutamatergique à part, mais comme une simple population de neurones pyramidaux ectopiques (Somogyi and Klausberger, 2005).

1.2. Les cellules granulaires :

Des *cellules granulaires* ont été identifiées dans les couches superficielles de la région CA3 (Szabadics et al., 2010). Leur localisation mise à part, ces neurones présentent de nombreux traits en commun avec les cellules granulaires majoritaires dans la région du gyrus denté. En effet, elles possèdent des propriétés similaires des points de vue propriétés biochimiques (expression des marqueurs Calbindine et Prox1), électrophysiologique (un potentiel de membrane relativement hyperpolarisé) et morphologique (un petit corps cellulaire et des dendrites épineuses orientées vers les couches profondes).

Très rares, les cellules granulaires représentent moins de 1% des neurones de CA3 (Szabadics et al., 2010). Cette proportion, similaire à celle de certains neurones GABAergique, pourrait en faire des composants importants dans le réseau de CA3. Cependant, à cause de leur rareté et de l'absence de toute donnée sur leur développement, nous n'avons pu tester leur rôle fonctionnel au cours de cette thèse.

2. Les cellules pyramidales :

La région des Cornes d'Ammon (CA1 et CA3) compte majoritairement des *cellules pyramidales*. Dans une publication récente (Mizuseki et al., 2011), György Buzsáki, pourtant un spécialiste reconnu dans le domaine des cellules GABAergiques (Freund and Buzsáki, 1996), déplore que les « *neurones pyramidaux soient tacitement assimilés à une population homogène [où] chaque cellule [est] similaire des points de vue de la morphologie, de la connectivité et de ses propriétés physiologiques* ». Ainsi, « *la plupart des expériences et modélisations partent du postulat que les neurones pyramidaux [...] sont homogènes.* »

C'est pourtant dès 1934 que Lorente de No mettait l'accent sur la diversité des neurones pyramidaux à l'intérieur d'une même couche en fonction de leur distribution spatiale et leur relation avec les cellules en panier (voir (Slomianka et al., 2011)). Malgré cela, les publications scientifiques majeures ayant trait à la diversité des neurones décrivent abondamment l'hétérogénéité des neurones GABAergiques sur les plans morphologiques, physiologiques, biochimiques et fonctionnels mais négligent souvent les neurones pyramidaux, considérés comme une population unie et homogène (Freund and Buzsáki,

1996; Klausberger and Somogyi, 2008; Markram et al., 2004; Somogyi and Klausberger, 2005).

Il existe tout de même une riche littérature d'articles qui s'attaque à l'étude de la variété des neurones pyramidaux dans le néocortex et dans l'hippocampe (voir pour revues (Fishell and Hanashima, 2008; Slomianka et al., 2011; Spruston, 2008; Witter, 2007)). En outre, leur variété a été soulignée par des études très récentes (Deguchi et al., 2011; Mizuseki et al., 2011) qui démontrent que des pyramides de l'hippocampe se distinguent entre elles par leur propriété de connectivité et leurs propriétés fonctionnelles.

Dans cette partie, nous reprendrons, pour le compte des neurones pyramidaux de l'hippocampe, les critères de classification habituellement utilisés pour discriminer les neurones GABAergiques ; dans l'ordre, les critères morphologiques, électrophysiologiques, biochimiques, et fonctionnels. Nous verrons que les cellules pyramidales de CA3 se distinguent non seulement des autres types neuronaux, mais également entre populations distinctes de neurones pyramidaux.

2.1. Propriétés et diversité morphologique :

2.1.1 Morphologie somato-dendritique:

Les neurones pyramidaux du cortex en général et de CA3 en particulier présentent une morphologie somato-dendritique générale relativement stéréotypée, qui a contribué à leur considération comme une population homogène. Cependant, nous verrons qu'au-delà des stéréotypes, les neurones pyramidaux de CA3 possèdent des arborisations dendritiques distinctes (Witter, 2007).

D'une manière générale, les neurones pyramidaux de l'hippocampe possèdent un soma triangulaire situé le plus souvent dans le *stratum pyramidale*. Ils possèdent également une structure dendritique typique qui fait penser à une arborisation, avec de longues « ramifications » apicales qui s'étendent dans les couches superficielles, et de courtes « racines » basales qui s'étalent du côté opposé, vers les couches profondes (Andersen et al., 2007*).

Dans leur ensemble, les neurones pyramidaux de CA3 se distinguent des neurones pyramidaux de CA1 par une dendrite apicale primaire plus courte, dont la première ramification s'effectue à faible distance du soma (Ishizuka et al., 1995). Ainsi, à longueur égale, l'arborisation dendritique des neurones pyramidaux dans CA3 occupe une surface plus étendue que celle des neurones pyramidaux de CA1.

De même, certaines fines différences permettent de discriminer les neurones pyramidaux de CA3 entre eux. Ainsi, des observations basées sur des reconstructions morphologiques de neurones de la région CA3 de l'hippocampe montrent que la longueur et la complexité de l'arborisation dendritique varie fortement le long de l'axe proximo-distal de l'hippocampe. Les dendrites des neurones pyramidaux distaux (CA3a) possèdent le plus d'embranchement et une longueur totale des dendrites équivalente au double de celle des neurones les plus proches du gyrus ((Ishizuka et al., 1995; Turner et al., 1995; Wittner and Miles, 2007), voir Figure 8).

Les dendrites des neurones pyramidaux de l'hippocampe sont recouvertes de courtes protubérances appelées *épines dendritiques*, particulièrement au niveau des *strata oriens* et *radiatum*. C'est au niveau de ces compartiments dendritiques que se forment une grande proportion de contacts post-synaptiques avec d'autres neurones glutamatergiques, mais aussi GABAergiques (Kubota et al., 2007). Les épines forment un compartiment post-synaptique spécialisé, aux propriétés biochimiques et électrophysiologiques distinctes (Yuste, 2011).

Les neurones pyramidaux de CA3 se distinguent par un type particulier d'épines dendritiques appelé *excroissances épineuses* (*thorny excrescences*). Ces larges épines dendritiques sont le point de convergence de nombreux axones de cellules granulaires du gyrus denté (appelées *fibres moussues*) qui établissent des contacts synaptiques avec la cellule pyramidale ((Chicurel and Harris, 1992; Gonzales et al., 2001), voir Figure 7).

2.1.2 Généralités et diversité des connexions afférentes des neurones pyramidaux de CA3 :

Bien que certains neurones GABAergiques contactent directement leur axone (Li et al., 1992; Somogyi et al., 1983), ce sont les dendrites et le soma des cellules pyramidales qui reçoivent la majorité des connexions afférentes. D'une manière générale, les neurones pyramidaux de CA3 reçoivent des afférences de trois types : glutamatergiques, GABAergiques et cholinergiques (voir Figure 5 et Figure 7).

La source des connexions glutamatergiques provient du cortex entorhinal, du gyrus denté, et de CA3. Ces connexions glutamatergiques sont relativement compartimentées au niveau des dendrites des neurones pyramidaux. Ainsi, les neurones du cortex entorhinal projettent leurs axones (appelés *fibres perforantes*) vers CA3, où ils forment des contacts avec les dendrites apicales des neurones pyramidaux, au niveau du *stratum lacunosum-moleculare*. Curieusement, ce sont les neurones de la couche II qui contactent les neurones pyramidaux de CA3 chez le rat, et les neurones de la couche III chez la souris (Jinno, 2009). Les cellules granulaires, nous l'avons dit plus haut, contactent les cellules pyramidales principalement au niveau des excroissances épineuses du *stratum lucidum*. Enfin, tout le long des dendrites apicales et basales se forment des contacts avec les axones d'autres neurones pyramidaux de la région CA3 de l'hippocampe ipsilatéral (du même hémisphère) ou de l'hippocampe controlatéral (de l'hémisphère opposé, voir Figure 7; Witter, 2007).

Les connexions GABAergiques proviennent des neurones GABAergiques de CA3 que nous avons évoqués plus tôt (voir p40), mais aussi de la région CA1 (Figure 5; van Groen et al., 2003)). Il existe également des connexions GABAergiques septo-hippocampiques, mais celles-ci s'établissent sélectivement sur les neurones GABAergiques de CA3 et non les neurones pyramidaux (Amaral and Kurz, 1985). C'est d'ailleurs des axones de neurones cholinergiques septaux qui forment la majorité des synapses cholinergiques de CA3 ((Amaral and Kurz, 1985), Figure 7). Enfin, la région CA3 reçoit également des afférences d'autres régions cérébrales tels l'amygdale (Pikkarainen et al., 1999; Pitkänen et al., 2000), le cortex endopiriforme (Behan and Haberly, 1999) ou certains noyaux aminergiques (Witter, 2007).

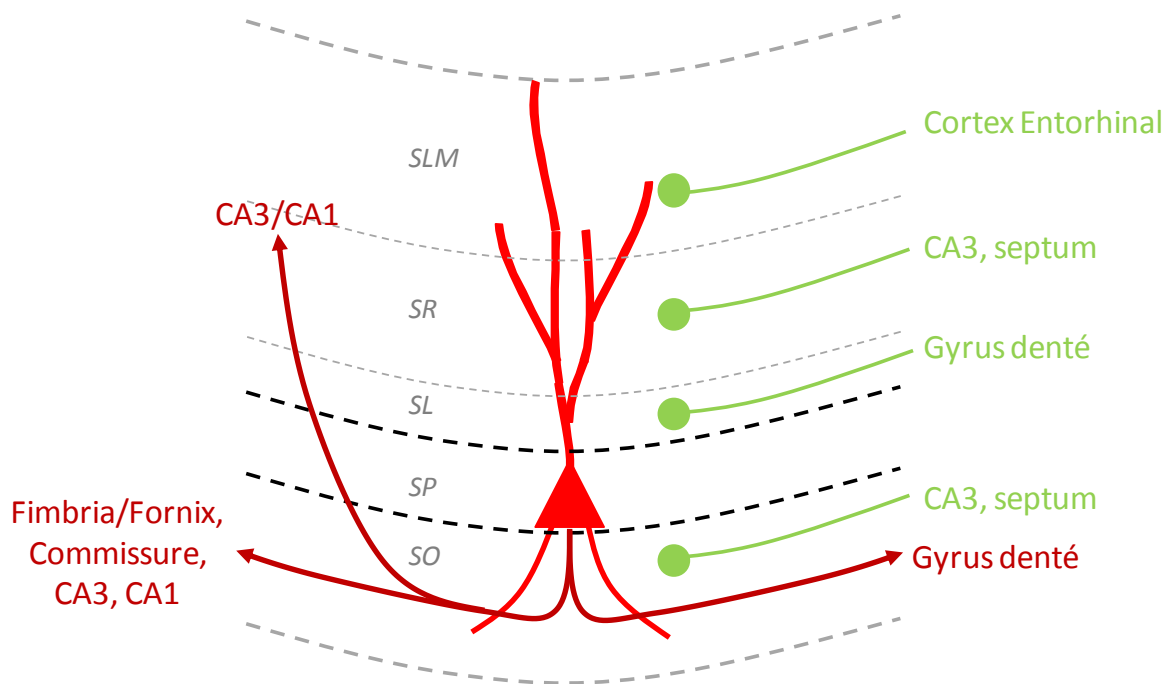


Figure 7 : Projections axonales et connexions afférentes des neurones pyramidaux de CA3.
 Les neurones pyramidaux (en rouge) de la région CA3 reçoivent des afférences GABAergiques (détaillées en Figure 5), cholinergiques et glutamatergiques (en vert). Les connexions afférentes glutamatergiques en provenance d'une région donnée contactent les neurones pyramidaux de CA3 au niveau d'une couche particulière. L'axone des neurones pyramidaux de CA3 (rouge foncé) forme des embranchements dans les couches profondes et superficielles de CA3, et projette en direction du gyrus denté, de CA1 et de CA3, mais aussi du septum (via le système fimbria/fornix) et l'hippocampe contralatéral (via les commissures). SO : *Stratum oriens*, SP : *Stratum Pyramidale*, SL : *Stratum lucidum*, SR : *Stratum Radiatum* SLM : *Stratum Lacunosum-moleculare*.

Les connexions afférentes énoncées ci-dessus ne sont pas identiques d'un neurone pyramidal de CA3 à l'autre. Ainsi il existe une hétérogénéité des connexions afférentes reçues par les neurones pyramidaux de CA3 qui se superpose à la diversité de leur arborisation dendritique, voir Figure 8.

En effet, il existe une hétérogénéité quantitative et qualitative des connexions formées par les axones des cellules granulaires selon l'axe proximo-distal de CA3. En effet, les excroissances épineuses, synonymes de connexions entre cellules granulaires et cellules pyramidales, sont plus nombreuses au niveau des neurones proximaux (CA3c), où elles sont

situées à la fois sur les dendrites basales et apicales (Gonzales et al., 2001). Les neurones plus distaux (CA3a) possèdent moins d'excroissances épineuses, et ces dernières sont principalement situées sur les dendrites apicales, dans le *stratum lucidum*, très riche en axones des cellules granulaires (Gonzales et al., 2001).

De plus, les neurones de CA3 sont contactés préférentiellement, selon leur localisation, par les axones de cellules granulaires fonctionnellement distinctes, situées dans différents compartiments du gyrus denté. Ainsi les neurones proximaux (CA3c) sont préférentiellement connectés par des neurones de la partie infrapyramidale du gyrus, alors que les neurones les plus distaux (CA3a) sont innervés préférentiellement par les cellules granulaires suprapyramidales (Choi et al., 2003; Claiborne et al., 1986; Scharfman et al., 2002).

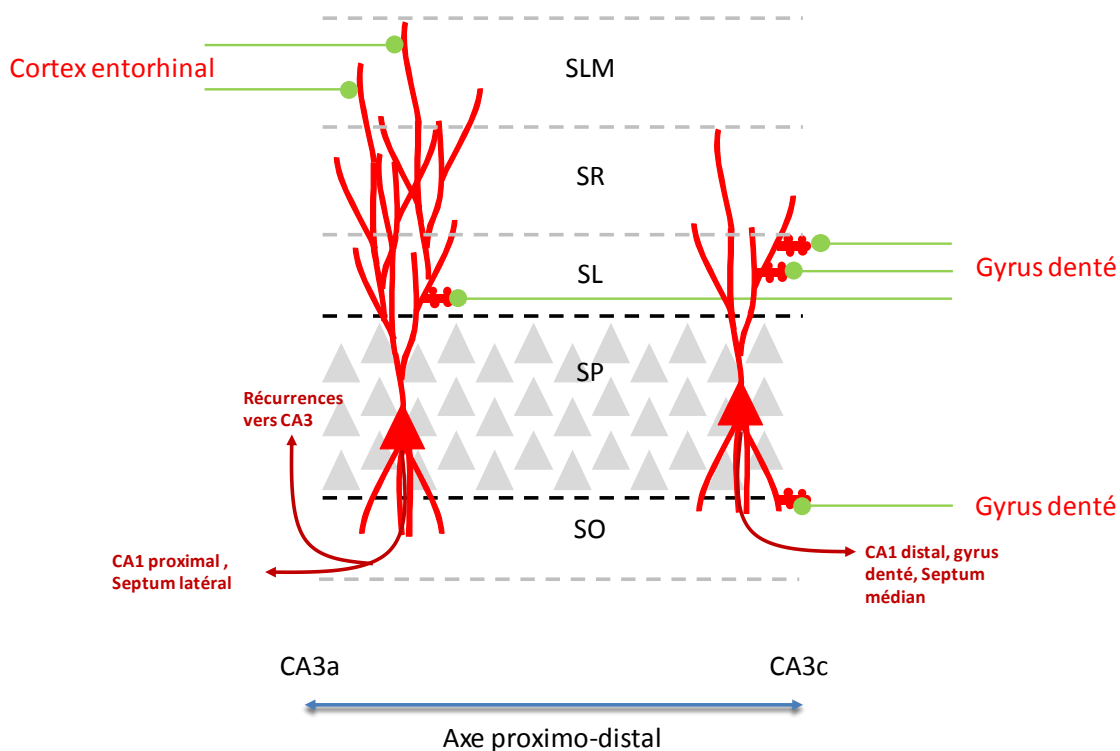


Figure 8 : Diversité morphologique des neurones pyramidaux de CA3.

Les neurones pyramidaux de CA3 présentent des différences morphologiques selon leur position le long de l'axe proximo-distal. Comparés aux neurones proximaux (CA3c), les neurones distaux possèdent une arborisation dendritique plus dense et ils sont plus souvent contactés par les axones en provenance du cortex entorhinal. Leur axone forme plus souvent des récurrences dans CA3 et projette de préférence dans des sous-régions de CA1 et du septum distinctes de celles des neurones pyramidaux proximaux. Par ailleurs, les neurones de CA3c reçoivent plus souvent des afférences du gyrus denté, sur toute leur arborisation dendritique, d'où un nombre d'excroissances épineuses plus élevé. En retour, leur axone innerve plus souvent les neurones du gyrus denté que celui des neurones distaux (pour revue, voir (Witter, 2007)). SO : *Stratum oriens*, SP : *Stratum Pyramidale*, SL : *Stratum lucidum*, SR : *Stratum Radiatum* SLM : *Stratum Lacunosum-moleculare*.

De même, les fibres perforantes du cortex entorhinal qui atteignent la région CA3 ciblent principalement des cellules pyramidales au niveau de leurs dendrites dans le *stratum lacunosum-moléculaire* (Witter, 2007). Or l'arborisation dendritique des neurones pyramidaux de la région CA3c est confinée par la courbure du gyrus denté, et s'étend très peu dans le *stratum lacunosum-moléculaire*. Par conséquent, les neurones les plus proximaux forment peu de contact avec les fibres en provenance du cortex entorhinal (Ishizuka et al., 1990; Li et al., 1994; Witter, 2007).

Enfin, les connexions cholinergiques afférentes en provenance du septum ciblent des populations distinctes de CA1 (Tronson et al., 2009), ce qui pourrait suggérer que l'on pourrait retrouver une telle sélectivité dans la région CA3.

Les observations rapportées dans les paragraphes précédents vont dans le sens d'une diversité des neurones pyramidaux de CA3 au niveau de leur arborisation somato-dendritique et des connexions afférentes associées. Nous verrons que cette hétérogénéité est également valable pour l'arborisation axonale et les connexions efférentes.

2.1.3 Morphologie axonale des cellules pyramidales de CA3:

Des études basées sur des marquages *in vivo* de neurones pyramidaux de CA3 ont permis de reconstituer le trajet de l'axone, et d'extraire des tendances générales au niveau de l'arborisation axonale (Ishizuka et al., 1990; Li et al., 1994). Ainsi, les axones des neurones pyramidaux de CA3 naissent du côté basal, en direction des couches profondes de l'hippocampe. Par la suite, les axones se ramifient et forment de nombreuses branches dans les couches profondes et superficielles de CA3.

Une grande partie des axones projette dans CA1, soit en contournant par le *stratum oriens* la courbure de l'hippocampe pour atteindre les couches profondes de CA1, soit en traversant le *stratum pyramidale* pour atteindre les couches superficielles de CA3 et de CA1. Ces axones, qui projettent des neurones pyramidaux de CA3 vers CA1 sont les *collatérales de Schaffer* (Schaffer, 1892, voir Andersen et al., 2007*). Grâce à ces dernières, les axones des neurones pyramidaux de CA3 établissent des synapses avec les neurones GABAergiques et pyramidaux de CA1 (Ishizuka et al., 1990; Li et al., 1994).

Selon un modèle traditionnel, ces connexions CA3-CA1 font partie d'un *circuit tri synaptique* de l'hippocampe, qui implique les trois aires de l'hippocampe (Gyrus denté, CA3 et CA1). Selon ce modèle, les trois aires seraient les éléments successivement connectés d'une boucle initiée et achevée dans le cortex entorhinal (Andersen et al., 2007*).

Ce modèle est quelque peu simpliste, car les connexions formées par les neurones pyramidaux de CA3 ne sont pas restreintes à CA1. En effet, l'axone des neurones pyramidaux peut aller à « contre-courant » du circuit tri-synaptique et projeter en direction du gyrus denté (Ishizuka et al., 1990; Li et al., 1994). Ce sont les *projections rétrogrades* des axones des neurones pyramidaux de CA3, qui forment des synapses avec les cellules granulaires et les cellules du hile (Myers and Scharfman, 2010; Scharfman, 2007).

En outre, l'axone des neurones pyramidaux de CA3 se ramifie fortement dans le voisinage du neurone pyramidal auquel il appartient, formant des connexions appelées connexions *récurrentes* (ou connexions *associationnelles*) avec d'autres neurones pyramidaux de CA3 (Ishizuka et al., 1990; Li et al., 1994). L'axone des neurones pyramidaux de l'hippocampe forme également des connexions fonctionnelles (Miles, 1990) préférentiellement avec certaines classes de neurones GABAergiques, tels les cellules O-LM, les cellules en panier ou bistratifiées (Ali et al., 1998; Gulyás et al., 1999; Sik et al., 1993; Wittner et al., 2006).

Enfin, des embranchements de l'axone des neurones pyramidaux de CA3 rejoignent le système *fimbria/fornix* où ils peuvent projeter en direction du septum mais aussi vers l'hippocampe controlatéral via le système commissural qui relie les hippocampes des deux hémisphères ; ce sont les projections *commissurales* (Ishizuka et al., 1990; Li et al., 1994). Curieusement, les cibles des projections controlatérales sont les même que les cibles ipsilatérales : les axones commissuraux forment des synapses avec les neurones pyramidaux et GABAergiques de CA1 et CA3 (Witter, 2007).

2.1.4 Diversité des connexions efférentes des neurones pyramidaux de CA3 :

Les observations citées dans le paragraphe précédent correspondent à un schéma général, qui regroupe l'ensemble des neurones pyramidaux de CA3 comme une population unique. Pourtant les neurones pyramidaux forment des populations distinctes du point de vue des connexions efférentes formées par leurs axones.

Comme c'est le cas pour l'arborisation dendritique et les connexions afférentes, la diversité des connexions efférentes suit l'axe proximo-distal de CA3. Ainsi, les neurones de CA3c forment plus de connexions avec ceux du gyrus que les neurones pyramidaux distaux de CA3a (Li et al., 1994; Myers and Scharfman, 2010; Scharfman, 2007). A l'inverse, les neurones de CA3a développent deux fois plus de récurrences que les neurones proximaux (Ishizuka et al., 1990; Li et al., 1994). De plus, les récurrences axonales des neurones pyramidaux distaux projettent en majorité vers le *stratum oriens*, alors que les récurrences des neurones pyramidaux proximaux projettent plus souvent vers les couches superficielles (Li et al., 1994).

Ensuite, les collatérales de Schaffer ciblent différents compartiments cellulaires des cellules pyramidales de CA1 en fonction de la localisation le long de l'axe proximo-distal du neurone pyramidal CA3. En effet, les neurones distaux forment des terminaisons au niveau des dendrites basales des neurones de CA1 les plus proches de CA3. A l'inverse, les neurones CA3 proximaux forment des terminaisons vers les dendrites apicales des neurones de CA1 les plus proches du subiculum (Ishizuka et al., 1990; Li et al., 1994).

En outre, les neurones pyramidaux de CA3 forment avec les neurones septaux des connexions différentes en fonction de leur emplacement. Ainsi, les neurones proximaux contactent préférentiellement les neurones des noyaux septaux médians, alors que les neurones pyramidaux distaux visent préférentiellement les noyaux latéraux (Witter, 2007). Par ailleurs, des travaux suggèrent que la préférence des efférences septales des neurones pyramidaux se calque également avec une répartition radiale : les axones des neurones

pyramidaux les plus profonds forment des connexions bilatérales avec les noyaux septaux des deux hippocampes (Sørensen et al., 1993).

Les différences morphologiques, ainsi que l'hétérogénéité des connexions afférentes et efférentes des neurones pyramidaux, renforcent l'idée qu'il existe des populations distinctes de neurones pyramidaux dans CA3, agencées le plus souvent selon l'axe proximo-distal. Pour clore cette partie, il faut citer les travaux récents de Yuji Deguchi et Pico Caroni qui suggèrent que les neurones pyramidaux de CA3 forment des populations aux connexions afférentes et efférentes distinctes en fonction de leur date de neurogenèse (Deguchi et al., 2011), ce dont nous discuterons plus en détail dans une partie ultérieure (voir p79).

La capacité d'interaction d'un neurone avec son réseau est dépendante de sa morphologie et des connexions afférentes et efférentes effectuées au niveau de ses neurites. Elle est également dépendante des propriétés électrophysiologiques intrinsèques des neurones. C'est pourquoi nous verrons dans le paragraphe suivant les propriétés d'excitabilité ainsi que la composition en récepteurs des neurones pyramidaux de CA3.

2.2. Propriétés et diversité électrophysiologiques :

L'interaction d'un neurone avec le réseau nécessite des mécanismes de communication cellulaire par transmission synaptique. Cette communication cellulaire dépend de l'expression de récepteurs exprimés au niveau post-synaptique activés par les neurotransmetteurs libérés au niveau présynaptique. C'est pourquoi nous allons décrire dans le paragraphe suivant les principaux récepteurs exprimés par les neurones pyramidaux de CA3 :

2.2.1 Les récepteurs exprimés par les cellules pyramidales de CA3 :

Les neurones pyramidaux de CA3 expriment principalement des récepteurs activés par le glutamate et le GABA. Dans chaque catégorie il existe deux grandes familles de récepteurs : les récepteurs *ionotropiques*, dits « rapides », qui sont des canaux ioniques activés par

ligands, et les récepteurs *métabotropiques*, dont l'effet sur l'excitabilité est plus lent et durable car dépendante d'une voie activée par des protéines G.

Il existe trois types de **récepteurs ionotropiques au glutamate**, qualifiés en fonction du nom de leur agoniste sélectif : les récepteurs AMPA, NMDA, et kaïnate. Ces récepteurs sont perméables aux cations. Ainsi lorsqu'ils sont activés par le glutamate, ces récepteurs provoquent une dépolarisation de la membrane qui permet de rapprocher le potentiel de repos du seuil de potentiels d'action ; c'est pourquoi on dit communément que le glutamate est *excitateur*.

Les récepteurs ionotropiques du glutamate sont des hétéro-tétramères, composés de quatre sous-unités différentes selon la région, le compartiment cellulaire, ou le stade de vie.

Ainsi, les récepteurs NMDA sont composés le plus souvent de deux sous-unités NR1 et de deux sous-unités NR2, dont il existe quatre types : NR2A-D. Au stade adulte, le sous-type de sous-unité NR2 la plus répandue est NR2A (Monyer et al., 1994).

Les récepteurs AMPA sont composés des sous-unités gluR1-4. L'association la plus fréquente aux stades adulte est gluR1/2 qui confère aux récepteurs AMPA une faible perméabilité au calcium (Petrálie and Wenthold, 1992).

Les récepteurs de type kaïnate peuvent être composés des sous-unités gluR5-7 et KA1-2. Ces récepteurs, en général peu répandus dans le cerveau, sont nombreux dans CA3, particulièrement au niveau des connexions synaptiques entre cellules granulaires et cellules pyramidales, où ils expriment la sous-unité gluR6 (Ben-Ari and Cossart, 2000). Ces récepteurs pourraient être particulièrement impliqués dans la génération d'activités épileptiformes dans certains modèles de crise d'épilepsie (Ben-Ari and Cossart, 2000).

Les **récepteurs métabotropiques du glutamate** se classent en trois groupes (I, II, et III) et huit sous-unités (mgluR1-8). Ils modulent l'excitabilité membranaire en régulant l'activité de canaux cationiques, mais aussi la transmission synaptique en régulant la libération de neurotransmetteur (De Blasi et al., 2001).

Dans l'hippocampe, il existe deux types de récepteurs activés par le GABA. Les récepteurs ionotropiques de type A (ou récepteurs GABA_A), et les récepteurs métabotropiques de type B (GABA_B).

Les **récepteurs GABA_A** sont des récepteurs pentamériques, perméables aux anions, principalement l'ion chlore. Ainsi, l'effet membranaire de l'activation du récepteur dépend du potentiel d'inversion du chlore (E_{GABA}), lequel détermine l'entrée ou la sortie du chlore. Aux stades matures, la valeur de E_{GABA} est souvent plus négative du potentiel de membrane. Ainsi, l'activation du récepteur GABA_A provoque une entrée de chlore et une hyperpolarisation qui éloigne le potentiel de membrane du seuil de genèse des potentiels d'action. Ainsi le GABA est souvent considéré comme un neurotransmetteur inhibiteur (Krnjević, 2004).

Une controverse subsiste toutefois au niveau de l'effet inhibiteur généralisé du GABA chez l'adulte. En effet, des enregistrements extracellulaires suggèrent que le GABA est inhibiteur sur l'ensemble de l'arborisation somato-dendritique des cellules pyramidales de (Bazelot et al., 2010; Glickfeld et al., 2009). A l'inverse, d'autres travaux suggèrent le GABA est dépolarisant au niveau de certains compartiments des cellules pyramidales, tel le segment initial des axones contactés par les neurones GABAergiques axo-axoniques (Szabadics et al., 2006; Woodruff et al., 2009). Cet effet dépolarisant local du GABA est dû à un gradient intracellulaire de la concentration en chlore, qui est maintenu par l'expression régionalisée de transporteurs du chlore tels que NKCC1 (Khirug et al., 2008).

Les **récepteurs GABA_B** sont également exprimés par les neurones pyramidaux de CA3. Leur activation provoque également une hyperpolarisation retardée (200ms), mais durable (500-2000ms), via l'activation de canaux potassiques. Ainsi, ils sont impliqués dans la terminaison de certaines activités coordonnées du réseau de CA3 dans des conditions physiologiques (Fiorentino et al., 2009) mais aussi pathologiques (de la Prida et al., 2006).

La capacité d'un neurone à intégrer, puis transmettre les signaux synaptiques qu'il perçoit ne dépend pas seulement de son contenu en récepteurs, mais aussi de ses propriétés électrophysiologiques intrinsèques, notamment ses propriétés de décharges des potentiels d'action. C'est pourquoi nous aborderons dans le paragraphe suivant les propriétés électrophysiologiques intrinsèques des neurones pyramidaux de CA3.

2.2.2 Propriétés électrophysiologiques basiques et profil de décharge des potentiels d'action :

Les propriétés de décharge, mais aussi le *mode* de décharge d'un neurone présynaptique conditionnent la manière dont il influence les neurones post-synaptiques (Lisman, 1997; London et al., 2002). Ainsi, la capacité de certains neurones à décharger en bouffées de potentiels d'action (ou *burst spiking*) permettrait de multiplier par 10 sa capacité à influencer les neurones postsynaptique par rapport aux neurones à décharge régulière (*regular spiking*), qui génèrent des trains de potentiels d'action (Xu and Clancy, 2008).

Les neurones pyramidaux de CA3 de l'hippocampe auraient une propension à décharger en bouffée supérieure à celle que l'on retrouve dans d'autres régions corticales, comme CA1. Toutefois, la variabilité des conditions expérimentales complique l'estimation de la proportion exacte de cellules à décharge en bouffée (20% selon (Hemond et al., 2008), 40% selon (Menendez de la Prida and Sanchez-Andres, 2000), 75-100% selon (Wittner and Miles, 2007), voir également partie résultats, p90).

Ces neurones pyramidaux à décharge en bouffée se localisent préférentiellement dans les régions les plus distales selon l'axe proximo-distal (Masukawa et al., 1982; Wittner and Miles, 2007) et dans les couches profondes selon l'axe radial (Bilkey and Schwartzkroin, 1990). De manière intéressante, la diversité du mode de décharge des neurones pyramidaux de CA3 se calque finement sur la diversité morphologique au sein de CA3 de l'hippocampe (Turner et al., 1995; Wittner and Miles, 2007), voir Figure 9.

Les propriétés de décharge des neurones pyramidaux de CA3 dépendent en partie de facteurs intrinsèques basiques tels que le potentiel de membrane, le seuil de décharge des potentiels d'action, la résistance membranaire. Plusieurs études électrophysiologiques effectuées chez le rongeur suggèrent que les valeurs du potentiel de repos (Tyzio et al., 2003)), du seuil de décharge, ou encore de la résistance (Wittner and Miles, 2007) sont relativement homogène d'une cellule pyramidale de CA3 à l'autre (voir également partie résultats p90, tableau 1). Ces paramètres ne peuvent donc expliquer seuls l'hétérogénéité des propriétés de décharge des neurones pyramidaux.

Les propriétés de décharge des neurones pyramidaux de CA3 impliquent également des courants ioniques activés par des canaux ioniques dépendants du voltage. Un certain nombre de ces courants ont été identifiés dans l'hippocampe : les canaux sodiques persistants (I_{NaP} , (Sipilä et al., 2006)), des canaux potassiques activés par le calcium (SI-K(Ca), (Sipilä et al., 2006)), des canaux potassiques sensible à la muscarine (I_M , (Yue and Yaari, 2006), les canaux potassiques de type D (Metz et al., 2007) ou encore des canaux calciques de type R (Metz et al., 2005). La diversité des propriétés de décharge des neurones pyramidaux suggère que les neurones expriment de manière hétérogène certains canaux ioniques. Cette hypothèse est indirectement étayée par des observations électrophysiologiques qui montrent que la décharge en bouffée des neurones pyramidaux est facilitée par une dépolarisation qui suit chaque potentiel d'action (appelée ADP, pour *afterdepolarisation potential* (Wittner and Miles, 2007)). Or, cette ADP est modulée par des canaux voltage dépendants tels que les canaux potassiques de type D et calciques de type R que nous avons évoqués plus haut (Metz et al., 2005; Metz et al., 2007). De plus, les neurones pyramidaux de CA3 présentent une hétérogénéité dans l'expression d'autres types de canaux ioniques dépendants du voltage, comme ceux qui sont impliqués dans des courants activés par hyperpolarisation I_h (Hemond et al., 2009).

Les deux parties précédentes suggèrent que les neurones pyramidaux de CA3 possèdent une diversité au niveau de leur arborisation axo-dendritique et de leur connectivité afférente et efférente, mais aussi de leurs propriétés électrophysiologiques intrinsèques, particulièrement leur mode de décharge. Cette hétérogénéité, qui se répartit selon l'axe proximo-distal mais aussi radial de la région CA3, suggère la présence d'au moins deux grandes familles de neurones pyramidaux dans CA3. Hormis les propriétés morphologiques et physiologiques, les neurones sont souvent classés selon l'expression spécifique de marqueurs biochimiques. C'est pourquoi nous discuterons dans la partie suivante des propriétés biochimiques des neurones pyramidaux de CA3.

2.3. Propriétés et diversité biochimiques :

A l'image des nombreuses molécules permettant la différenciation des neurones GABAergiques (classiquement des protéines chélatrices du calcium et des neuromodulateurs), il existe quelques marqueurs qui départagent les neurones pyramidaux des autres types neuronaux. Parmi les plus classiquement retrouvés dans la littérature, on peut citer la CaMKII (*CalModulin-dependant protein Kinase II*, (McDonald et al., 2002)), MAP2 (*Microtubule-Associated Protein 2*, (Hayashi et al., 2005)), mais aussi la neurogranine (Singec et al., 2004) la protéine post-synaptique PSD-95 (Kawachi et al., 1999) ou encore des protéines liées au développement des neurones pyramidaux (Pax6, Tbr1 et 2, Ngn2, NeuroD, voir p83 et (Hevner et al., 2006)).

Il existe également des marqueurs, beaucoup plus rares, qui différencient des populations de neurones pyramidaux de CA3 entre eux :

2.3.1 La calbindine :

Protéine chélatrice du calcium, la *calbindine* s'exprime de manière différentielle dans une bande de neurones localisés dans la partie la plus superficielle de la couche pyramidale de CA1 (Baimbridge et al., 1991; Celio, 1990; Sloviter et al., 1991). Cette protéine pourrait influencer la plasticité synaptique au niveau des synapses glutamatergiques (Blatow et al., 2003; Dumas et al., 2004). Dans CA3, bien que certains neurones de la partie superficielle du *stratum pyramidale* expriment la calbindine (Szabadics et al., 2010), il n'existe pas de bande de neurones superficiels aussi claire que dans CA1 ((Slomianka et al., 2011), ainsi que nos observations personnelles), voir Figure 9.

2.3.2 L'ion zinc :

A l'inverse de la calbindine, les neurones contenant l'ion *zinc* forment des populations distinctes à la fois dans CA1 et CA3 (Slomianka and Geneser, 1997; Slomianka et al., 2011). Curieusement, les neurones contenant du zinc sont localisés dans la partie profonde de la couche pyramidale de CA3, et dans la partie superficielle de CA1. La présence de zinc dans une population particulière de neurones pourrait refléter un rôle particulier de ces neurones dans la fonction du réseau. En effet le zinc contenu dans les vésicules synaptiques des

neurones, se comporte comme un modulateur efficace des transmissions glutamatergiques (Paoletti et al., 2009) et GABAergiques (Chorin et al., 2011) ainsi que d'un grand nombre de transporteurs et canaux ioniques (voir (Frederickson et al., 2005) pour revue).

2.3.3 D'autres marqueurs ?

Comme nous l'avons vu, il existe actuellement peu de marqueurs discriminant les neurones pyramidaux d'une même couche en populations distinctes. Cependant, il se pourrait qu'il y en ait plus que ce que l'état actuel de nos connaissances nous permet d'affirmer. En effet, des études portant sur l'expression de gènes suggèrent qu'il existe plusieurs centaines de gènes dont l'expression par les neurones pyramidaux est compartimentée dans des régions particulières de CA3 l'hippocampe (Dong et al., 2009; Fanselow and Dong, 2010; Thompson et al., 2008). Par ailleurs, la distribution d'expression de certains gènes ressemble à la distribution des propriétés morpho-physiologiques des neurones pyramidaux décrite plus haut. C'est le cas notamment de certains gènes codants pour des protéines impliquées dans les propriétés physiologiques intrinsèques des neurones, comme certains canaux dépendants du voltage (comme *Kcnq5*) (Thompson et al., 2008).

Ces études du transcriptome devront être complétées avec des études du protéome afin d'identifier les marqueurs protéiques qui différencient réellement les neurones pyramidaux en populations distinctes. Cela dit, on peut envisager sur ces bases que dans un avenir proche, la liste de marqueurs biochimiques discriminant les neurones pyramidaux s'allongera avec des protéines impliquées dans l'hétérogénéité des propriétés morpho-physiologiques des différentes populations de neurones pyramidaux de CA3.

Les propriétés hétérogènes des neurones pyramidaux de CA3 du point de vue biochimique, électrophysiologique, et morphologique suggèrent très fortement qu'il existe des populations distinctes de neurones pyramidaux, qui pourraient être reliées à des fonctions différentes. Nous verrons qu'en effet, des populations fonctionnellement distinctes de neurones pyramidaux ont été identifiées dans la région CA3, mais aussi CA1 de l'hippocampe.

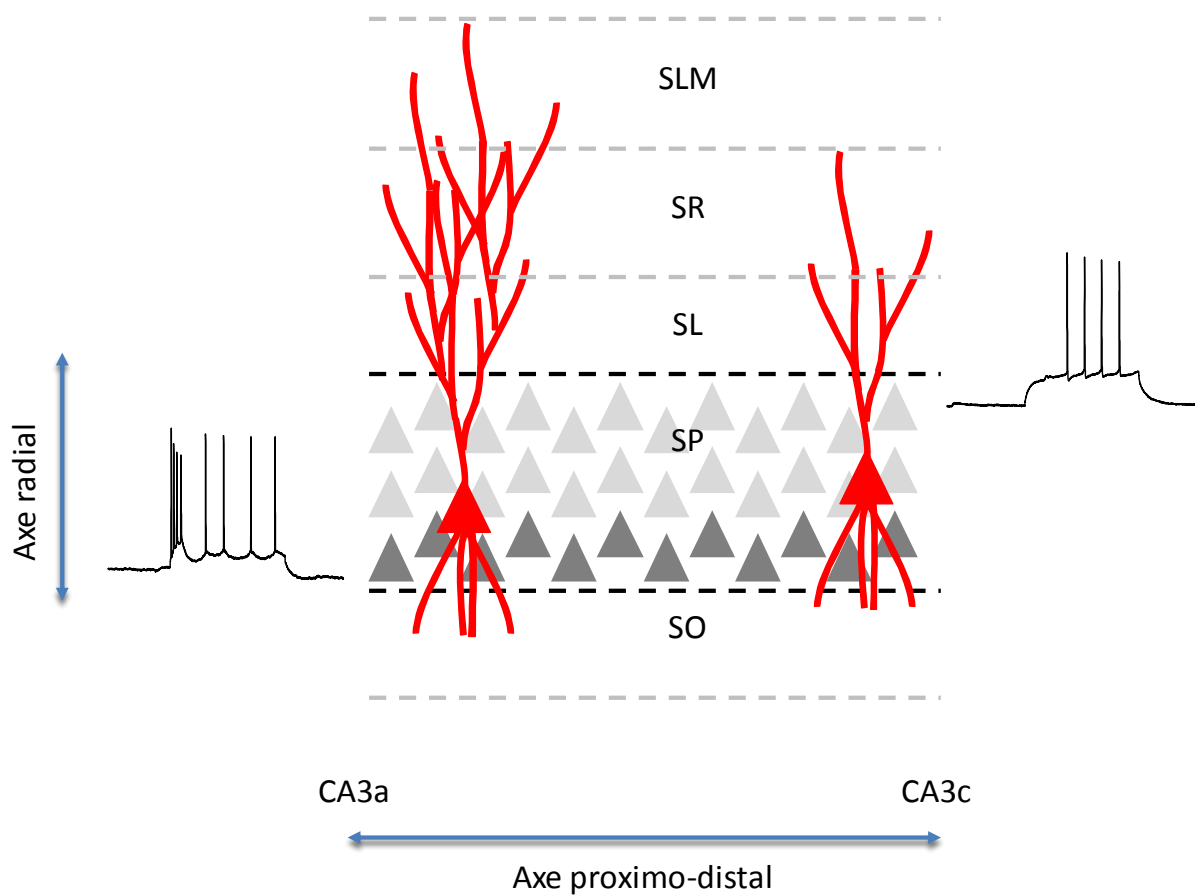


Figure 9 : Diversité électrophysiologique et biochimique des neurones pyramidaux de CA3. Les neurones pyramidaux présentent des différences au niveau de leurs propriétés électrophysiologiques en fonction de leur position selon les axes radial et proximo-distal. La proportion de neurones pyramidaux déchargeant des potentiels d'action selon un mode en bouffée est plus importante dans les régions distales (CA3a) et profondes de la région CA3 (Bilkey and Schwartzkroin, 1990; Witter, 2007). Les neurones contenant du zinc (en gris foncé) forment une couche dans la partie la plus profonde de CA3 selon l'axe radial (Slomianka et al., 2011). SO : *Stratum oriens*, SP : *Stratum Pyramidale*, SL : *Stratum lucidum*, SR : *Stratum Radiatum* SLM : *Stratum Lacunosum-moleculare*.

2.4. Propriétés et diversité fonctionnelles des neurones pyramidaux de CA3

Les neurones pyramidaux de l'hippocampe sont impliqués dans un grand nombre de fonctions associées à l'hippocampe (mémoire, apprentissage, représentation spatiale...) ainsi que dans la génération d'activités de réseaux souvent associées à ces fonctions. Or la diversité des fonctions assurées, parfois simultanément, par l'hippocampe suggère qu'il existe plusieurs circuits dans l'hippocampe, spécialisés dans une fonction spécifique, et composés de neurones distincts (Middleton et al., 2008; Mizuseki et al., 2011).

En accord avec cette hypothèse, un nombre croissant de travaux met en évidence une ségrégation fonctionnelle des neurones pyramidaux appartenant à la même couche de l'hippocampe.

Un groupe a étudié chez la souris les différentes étapes de l'apprentissage de la mémoire conditionnelle. Cet apprentissage réside en l'association systématique d'un contexte neutre (un son, un endroit) à un souvenir désagréable (un stimulus douloureux). Il y a *conditionnement* (ou *consolidation*) lorsque l'animal adopte un comportement terrifié lorsqu'il est placé dans ce contexte particulier, même en l'absence d'évènement désagréable. Il y a *extinction*, quand l'animal reprend un comportement normal. Les auteurs ont montré qu'il existait deux populations de neurones pyramidaux de l'hippocampe qui participent à des étapes distinctes en activant des molécules signalisatrices impliquées dans la consolidation, ou l'extinction de la mémoire contextuelle (*cFos* et *Erk*, respectivement) sous l'influence d'afférences cholinergiques septo-hippocampiques différentes (Tronson et al., 2009).

Plus frappant encore, d'autres groupes ont montré qu'à l'image des neurones GABAergiques (Klausberger et al., 2003) les neurones pyramidaux de CA1, mais aussi de CA3, pouvaient être classés en fonction de leur décharge pendant les activités de l'hippocampe impliquées dans les processus de mémorisation et de représentation spatiale au cours des différentes phases de veille. Ainsi, il existe *in vivo* deux populations de neurones pyramidaux dans CA1 et CA3 ; l'une décharge en relation avec les activités rythmiques thêta, alors que la deuxième population est composée de neurones silencieux ou dont la décharge n'est pas corrélée au rythme (Bland et al., 2005). En outre, un autre groupe a montré que les neurones

pyramidaux de CA1 et CA3 participant à l'activité rythmique gamma générée pendant l'éveil pouvaient être séparés selon leur préférence de phase : ainsi une population décharge préférentiellement pendant le pic négatif, et l'autre pendant la phase ascendante du rythme (Senior et al., 2008). Enfin, un groupe a montré récemment que les différences fonctionnelles entre neurones pyramidaux de l'hippocampe étaient agencées selon l'axe radial de CA1. En effet, les neurones situés dans la partie la plus profonde du *stratum pyramidale* modifient leur préférence de phase selon l'état de veille cérébral. Ainsi, leur préférence de phase de décharge pendant les activités thêta durant l'éveil est distincte de celle durant le sommeil paradoxal. De plus, cette population de neurones profonds se distingue également des neurones pyramidaux superficiels par une plus grande proportion de cellule de lieu, mais aussi de cellules participant aux SPW-R, ainsi qu'une préférence de phase distincte pendant les activités gamma survenant à l'état éveillé (Mizuseki et al., 2011). L'ensemble de ces résultats suggère qu'il existe une ségrégation fonctionnelle des neurones pyramidaux de CA3 et de CA1 dans des conditions physiologiques.

Une ségrégation similaire a également été mise en évidence dans des conditions pathologiques. Ainsi, le groupe de Richard Miles (de la Prida et al., 2006) a identifié des populations de neurones pyramidaux de CA3 au comportement de décharge différent pendant des activités épileptiformes. Parmi ces deux populations, distribuées cette fois le long de l'axe proximo-distal, l'une décharge dès la phase d'initiation (ou *build-up*) des activités épileptiformes, alors que l'autre ne décharge que pendant l'évènement proprement dit. En outre, les neurones pyramidaux actifs pendant la phase d'initiation permettraient de franchir le seuil d'excitation nécessaire au réseau pour déclencher une activité épileptiforme (Wittner and Miles, 2007; de la Prida et al., 2006).

Les études rapportées ci-dessus suggèrent qu'il existe des populations de neurones pyramidaux distinctes, impliquées dans des fonctions physiopathologiques différentes, et qui se répartissent selon les axes radial et proximo-distal de l'hippocampe.

En résumé :

Au cours de ce chapitre, nous avons établi que les neurones pyramidaux de CA3 disposaient de propriétés biochimiques, électrophysiologiques, morphologiques et des connexions afférentes et efférentes qui pouvaient être différentes d'un neurone à l'autre. A cela s'ajoutent des fonctions physiopathologiques distinctes. Au cours de cette thèse, nous avons mis en évidence d'autres propriétés morpho-fonctionnelles qui distinguent les neurones pyramidaux de CA3 entre eux (voir partie résultats, p90).

Dans le cadre de notre problématique, nous voulions établir s'il existait un lien entre la diversité morpho-fonctionnelle des neurones pyramidaux avec leur développement. C'est pourquoi nous discuterons dans le chapitre suivant des différents processus de développement des neurones pyramidaux.

Chapitre 4 : Développement des Neurones pyramidaux de CA3

Nous avons discuté dans le chapitre précédent des propriétés des neurones pyramidaux et nous avons vu qu'il existait une grande variété de neurones pyramidaux dans la région CA3 de l'hippocampe. Or les propriétés des neurones adultes changent relativement peu ; c'est pendant les phases de *développement* que les neurones acquièrent une grande partie de leurs caractéristiques. Cela suggère donc que c'est pendant les phases de développement qu'est déterminée la diversité morpho-fonctionnelle des neurones. C'est pourquoi nous allons décrire dans ce chapitre les grandes étapes du développement, avant de relier certaines d'entre elles à la diversité morpho-fonctionnelle des neurones pyramidaux.

Le développement neuronal peut se définir par une succession de processus biologiques aboutissant à la génération d'un nouveau neurone aux propriétés matures, correctement intégré du point de vue fonctionnel au réseau. Dans le cas des neurones pyramidaux de la région CA3 de la souris, le développement commence dès la seconde moitié de la vie embryonnaire, et ne s'achève pas avant la fin du premier mois de vie postnatale.

Le processus développemental initial est celui de la **neurogenèse**, c'est-à-dire la naissance d'un précurseur neuronal immature post-mitotique à partir d'une cellule souche neuroprogénitrice. Intimement liée à la neurogenèse, la **migration** consiste en un déplacement du précurseur neuronal de sa zone de genèse vers sa localisation définitive, parfois relativement éloignée. En parallèle, le précurseur neuronal acquiert un certain nombre de traits de caractères intrinsèques qui forment son identité finale ; c'est ce qu'on appelle la **différentiation** neuronale.

Enfin, le neurone en maturation s'intègre au réseau neuronal en développant des connexions synaptiques : c'est la **synaptogenèse**, voir Figure 10.

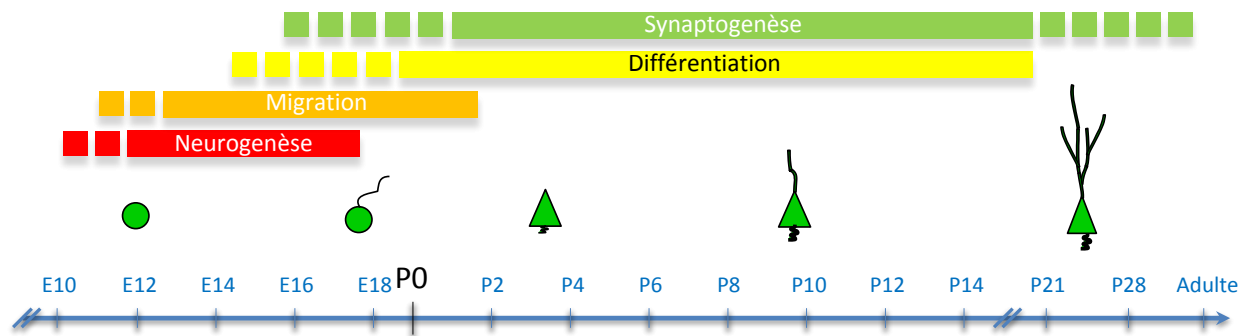


Figure 10 : Répartition temporelle des processus développementaux des neurones pyramidaux de la région CA3 de l'hippocampe.

Les neurones subissent successivement quatre grandes étapes développementales : neurogenèse, migration, différenciation et synaptogenèse. La neurogenèse des neurones glutamatergiques se déroule de E10 à E18 environ, puis leur migration vers leur localisation définitive s'étend de E12 à P2 environ. Ensuite, les neurones se différencient pour acquérir leurs propriétés morphophysiologiques matures à la fin de la troisième semaine postnatale (P21). Par ailleurs, les neurones forment leurs connexions synaptiques afférentes et efférentes pendant le processus de synaptogenèse durant les trois premières semaines de vie postnatale (P0-P21). Pour revue, voir (Danglot et al., 2006).

I. Neurogenèse et migration des neurones pyramidaux de CA3 :

La neurogenèse et la migration des cellules pyramidales chez le rongeur ont été principalement étudiées dans le néocortex. Pour autant, malgré leurs différences histologiques, les neurones pyramidaux de la Corne d'Ammon et du néocortex partagent de nombreux mécanismes au cours de la naissance et la migration des cellules pyramidales (Altman and Bayer, 1990a; Altman and Bayer, 1990b; Nakahira and Yuasa, 2005). Nous verrons ici les grandes lignes de la neurogenèse et de la migration des neurones pyramidaux dans le cortex en général, en insistant sur les spécificités propres à l'hippocampe.

1. Les zones germinatives et les différents progéniteurs neuronaux :

Les neurones glutamatergiques pyramidaux du néocortex et de l'hippocampe ont pour origine une zone germinative neuroépithéliale qui tapisse la paroi d'une cavité (appelée *ventricule*) de la partie dorsale du télencéphale, région embryonnaire qui donne naissance

au cerveau. Cette zone germinative, est composée de cellules *neuroprogénitrices*, dont nous verrons plus loin différents types, qui produisent la majorité des neurones glutamatergiques (dont les cellules pyramidales) du néocortex et de l'hippocampe. Elle est organisée en mosaïque, ce qui veut dire qu'elle est divisée en territoires germinatifs qui donnent chacun naissance à une région particulière du cortex. Ainsi, c'est l'un de ces territoires, appelé *neuroépithélium des cornes d'Ammon*, qui donnera spécifiquement naissance aux neurones glutamatergiques des régions CA1 et CA3 de l'hippocampe (Altman and Bayer, 1990a; Altman and Bayer, 1990b).

La genèse de neurones pyramidaux de l'hippocampe s'étend pendant la seconde moitié de la vie embryonnaire de la souris, entre les jours embryonnaires E10 et E18, et est maximale vers E14 (Angevine, 1965; Manent et al., 2005), voir Figure 10 et Figure 11.

Le territoire germinatif du cortex est composé initialement de cellules multipotentes précoces appelés *cellules neuroépithéliales* qui se transforment en neuroprogéniteurs primaires appelés *glies radiaires* (Götz and Huttner, 2005). Ces glies radiaires sont remarquables par leurs prolongements qui s'étendent sur toute l'épaisseur du cortex en formation. Les glies radiaires qui produiraient une grande partie des neurones glutamatergiques du cortex (Noctor et al., 2001), soit directement, soit indirectement.

Directement, par des divisions mitotiques asymétriques, c'est-à-dire qui donnent naissance à deux cellules filles distinctes : une nouvelle glie radiaire mitotique, pour conserver intact le stock de cellules progénitrices, et un précurseur neuronal mitotique, qui achève son cycle de division (il devient alors *post-mitotique*) avant d'amorcer sa différenciation (Malatesta et al., 2003).

Indirectement, et toujours par divisions asymétriques, par la production d'une famille de progéniteurs secondaires appelés *progéniteurs intermédiaires*, ou *progéniteurs basals* qui forment essentiellement des neurones par divisions symétriques (Kowalczyk et al., 2009; Noctor et al., 2004).

Les glies radiaires et les progéniteurs basals ont été identifiées dans l'hippocampe (Kowalczyk et al., 2009). En outre, d'autres types de neuroprogéniteurs glutamatergiques ont été identifiés dans le néocortex de la souris (Reillo and Borrell, 2011), tels que des *progéniteurs neuronaux courts* (Gal et al., 2006; Stancik et al., 2010) ou des *progéniteurs de*

type glie radiaire de la zone sous ventriculaire externe (ZSVe, (Reillo et al., 2011; Shitamukai et al., 2011; Wang et al., 2011), mais ces progéniteurs n'ont pas été mis en évidence dans l'hippocampe. De plus, ils sont impliqués dans les territoires corticaux qui connaissent l'expansion la plus considérable (Reillo et al., 2011), ce qui n'est pas le cas *a priori* de l'hippocampe.

Ainsi, dans l'hippocampe, les glies radiaires et les progéniteurs basals associent leur pouvoir prolifératif jusqu'à l'épuisement du stock de neuroprogéniteurs glutamatergiques, qui survient aux alentours de P18 (Angevine, 1965; Manent et al., 2005). Les neurones sont générés dans les zones germinatives mais ne s'y éternisent pas ; dans les 24 heures qui suivent leur genèse, ils amorcent leur migration vers leur localisation définitive (Altman and Bayer, 1990a; Altman and Bayer, 1990b). Ce sont ces mécanismes de migration que nous décrirons dans la partie suivante.

2. Les mécanismes de migration corticale :

La migration neuronale étant intimement liée à la neurogenèse, elle se déroule pendant des périodes de temps qui recouvrent partiellement la période de naissance des précurseurs neuronaux glutamatergiques. Ainsi, dans l'hippocampe, la migration des précurseurs de neurones pyramidaux s'étendrait de E12 à P2 chez la souris (Nakahira and Yuasa, 2005). A l'image des mécanismes de neurogenèse, les processus de migration des précurseurs de cellules pyramidales ont été décrits principalement dans le néocortex (Kriegstein and Noctor, 2004; Miyata et al., 2001; Nadarajah et al., 2003), mais des observations très similaires ont été effectuées dans l'hippocampe (Altman and Bayer, 1990; Nakahira and Yuasa, 2005), voir Figure 11.

Pendant les phases initiales de la migration corticale, les neurones nouveaux-nés se déplacent de manière autonome, par *translocation somatique*, perpendiculairement à la surface du ventricule, en direction des régions superficielles (côté méninges dans le néocortex, et côté fissure dans l'hippocampe). Ils se déplacent majoritairement radialement, c'est-à-dire dans le sens de l'épaisseur de l'hippocampe et du cortex en formation,

perpendiculairement à la surface ventriculaire. Pendant cette phase de translocation, les précurseurs en migration étendent deux prolongements (on dit qu'ils deviennent *bipolaires*); un prolongement de « proue » (*leading process*) ancré du côté des régions superficielles et un prolongement de « sillage » (*trailing process*) du côté opposé. Le prolongement de proue constitue une sorte de « grappin » qui permet au soma de se hisser jusqu'à la zone appropriée (Nadarajah et al., 2003). Ce « grappin » pourrait être hérité de leur cellule-mère, la glie radiaire neuroprogénitrice (Miyata et al., 2001).

Plus tard, le néocortex et l'hippocampe en développement se sont significativement épaissis, au point que les nouveaux neurones générés ne peuvent plus projeter de prolongements suffisamment longs pour atteindre les régions superficielles. Ils utilisent alors un procédé de migration alternatif appelé *locomotion guidée par la glie radiaire* (Kriegstein and Noctor, 2004). C'est pour cela qu'on associe classiquement les processus de neurogenèse et de migration ; dans le cortex, ce sont les mêmes cellules, en l'occurrence les glies radiaires, qui donnent naissance aux précurseurs neuronaux et qui servent de support à leur migration.

Ce mode de déplacement par locomotion tire profit du fait que les glies radiaires conservent, malgré leurs divisions successives, leurs prolongements qui s'étendent sur toute l'épaisseur du cortex en formation. Ces prolongements fournissent un tuteur autour duquel s'enroulent les neurones en migration comme une personne qui grimpe une corde. Cette locomotion fait appel à des mécanismes d'adhésions cellulaires, notamment des jonctions adhérentes de type gap (Elias and Kriegstein, 2008).

Pendant cette phase de locomotion, les précurseurs neuronaux traversent successivement des épisodes de progression rapide où elles empruntent une morphologie bipolaire, et des phases où elles acquièrent une morphologie multipolaire dynamique (Kriegstein and Noctor, 2004; Nakahira and Yuasa, 2005). Pendant cette phase multipolaire, les précurseurs neuronaux marquent une pause dans la migration, pendant laquelle ils étirent, puis rétractent des prolongements dans toutes les directions, à l'image d'un poulpe. Il semble qu'ainsi ils puissent se désolidariser de la fibre radiaire à laquelle ils sont attachés, pour se fixer à une fibre parallèle, passant de fibres en fibres à l'image d'un Tarzan sur sa liane (Tabata and Nakajima, 2003). Cette pause dure 4 à 5 jours dans l'hippocampe, contre 1 à 2 dans le néocortex (Altman and Bayer, 1990).

A cause de la forme courbée de CA3, une partie des neurones, générés pendant les phases tardives, utilise un mode migratoire alternatif. Pendant leur phase multipolaire, ces neurones se détachent du flux migratoire radial pour se déplacer *tangentiellement* (c'est-à-dire non plus perpendiculairement, mais parallèlement à la surface ventriculaire), avant d'utiliser à nouveau un mode migratoire dépendant de la glie radiaire afin d'atteindre leur destination appropriée (Nakahira and Yuasa, 2005).

Ainsi, les cellules pyramidales CA3 semblent former deux schémas de répartition qui se superposent : une répartition radiale commune à l'ensemble des neurones du cortex (Altman and Bayer, 1990a; Altman and Bayer, 1990b; Manent et al., 2005), et une répartition proximo-distale propre à la région CA3 avec des neurones pyramidaux générés pendant les phases tardives de la neurogenèse qui sont localisés préférentiellement côté gyrus (Nakahira and Yuasa, 2005). Nous verrons dans la partie suivante que la répartition des cellules en migration est à l'origine de la formation des couches du néocortex et de l'hippocampe.

3. La formation des couches de l'hippocampe :

Les couches du néocortex et de l'hippocampe se forment par naissance et migration de vagues successives de neurones, voir Figure 11. Pendant les phases les plus précoces du développement (E10-E12,5), le néocortex et l'hippocampe ne sont composés que d'une seule couche composés de neuroprogéniteurs, appelée *zone ventriculaire*. Ensuite, une première vague de neurones appelés « pionniers » colonise une couche superficielle primitive distincte de la zone ventriculaire, appelée *préplaque*.

Cette préplaque est elle-même formée de trois couches différentes, de la plus superficielle à la plus profonde : la *zone marginale*, la *sous-plaque*, et la *zone intermédiaire*.

La couche la plus superficielle, appelée *zone marginale*, est colonisée par une catégorie particulière de neurones glutamatergiques d'origine subcorticale, les cellules de Cajal-Retzius (Soriano and Del Río, 2005). Ces cellules jouent un rôle central pendant la migration des neurones sous-jacents via la sécrétion de Reeline (Frotscher, 1998; Tissir and Goffinet, 2003), et pendant la formation des connexions des neurones du cortex (Aguiló et al., 1999; Ceranik et al., 1999; Marín-Padilla, 1998).

La sous-plaque est peuplée par les premiers neurones générés par la zone ventriculaire, qui jouent également un rôle important pendant le développement, en assurant notamment le guidage des prolongements et en facilitant la formation des connexions effectuées par les neurones en développement (Kanold and Luhmann, 2010; Supèr et al., 1998). Enfin, la zone *intermédiaire*, qui contient les neurones en cours de migration et les prolongements en formation des neurones supérieurs.

Ces trois régions sont provisoires, c'est-à-dire que les cellules qu'elles contiennent, nécessaires au développement correct du cortex, disparaîtraient après la première semaine de vie postnatale par mort programmée une fois leur fonction assurée (Kanold and Luhmann, 2010; Soriano and Del Río, 2005; Supèr et al., 1998). En outre, ces couches serviraient de support à la migration tangentielle des cellules GABAergiques (Danglot et al., 2006), voir Figure 11.

Par la suite, la région germinative se compose de deux couches distinctes : la *zone ventriculaire*, accolée à un compartiment plus tardif, appelé *zone sous-ventriculaire* (Nakahira and Yuasa, 2005). Les vagues de neurones générés par ces compartiments germinatifs forment une couche qui s'élargit entre la zone marginale et la sous-plaque. Cette couche constitue la *plaque hippocampique* de l'hippocampe (*plaque corticale* dans le néocortex (Altman and Bayer, 1990)). Chaque vague de neurones n'interrompt sa migration que lorsqu'elle a dépassé les couches de neurones plus précoces dans la plaque corticale. De ce fait, les neurones pyramidaux se répartissent de telle manière que les premiers neurones à être générés se situent dans les couches profondes et les derniers dans les couches les plus superficielles. Trivialement, on parle d'un agencement radial « premiers à l'intérieur/ derniers à l'extérieur » (*inside first/outside last*) qu'on retrouve dans le néocortex (Angevine and Sidman, 1961), mais aussi de manière plus discrète dans l'hippocampe ((Altman and Bayer, 1990; Manent et al., 2005), voir aussi résultats). Dans CA3, nous l'avons vu précédemment, un gradient proximo-distal s'ajoute à cet agencement radial en raison d'une migration partiellement tangentielle (Nakahira and Yuasa, 2005), voir Figure 11.

Les couches décrites ci-dessus forment un support pour les couches définitives de l'hippocampe et du néocortex. Une fois la migration des neurones glutamatergiques et GABAergiques achevées (vers P2, (Nakahira and Yuasa, 2005)), la zone marginale constitue la

couche 1 du néocortex, ainsi que les strata *lacunosum-moleculare* et *radiatum* de l'hippocampe. La plaque corticale forme les couches 2 à 6 du néocortex, alors que la plaque hippocampique constitue le *stratum pyramidale* de l'hippocampe. Enfin, la sous-plaque est à l'origine du *stratum oriens* de l'hippocampe (Danglot et al., 2006). Dans l'hippocampe, contrairement au néocortex, seule la couche pyramidale contient des cellules glutamatergiques (mis à part quelques rare exceptions, voir p46). Enfin, le *stratum lucidum* se forme en dernier au moment où les fibres myélinisées des cellules granulaires du gyrus denté colonisent l'hippocampe et forment des connexions avec les dendrites apicales proximales des neurones pyramidaux (Amaral and Dent, 1981), voir Figure 11.

Dans les paragraphes précédents, nous avons vu que le destin des neurones glutamatergiques pyramidaux était déterminé en *lieu* par le type de neuroépithélium dans lequel elle est générée, qui spécifie un avenir dans le néocortex, dans les cornes d'Ammon, ou bien dans le gyrus denté (Altman and Bayer, 1990). L'avenir des neurones glutamatergiques pyramidaux est également déterminé en *temps* par la date de naissance relative du neurone, qui conditionne la localisation des neurones pyramidaux dans les différentes couches du néocortex (Angevine and Sidman, 1961), mais aussi dans l'hippocampe (Altman and Bayer, 1990; Manent et al., 2005). Dans le paragraphe suivant, nous discuterons de la différenciation des neurones pyramidaux et de la formation de leurs connexions afférentes et efférentes, et nous verrons que la date de neurogenèse détermine également en partie le déroulement de ces processus développementaux.

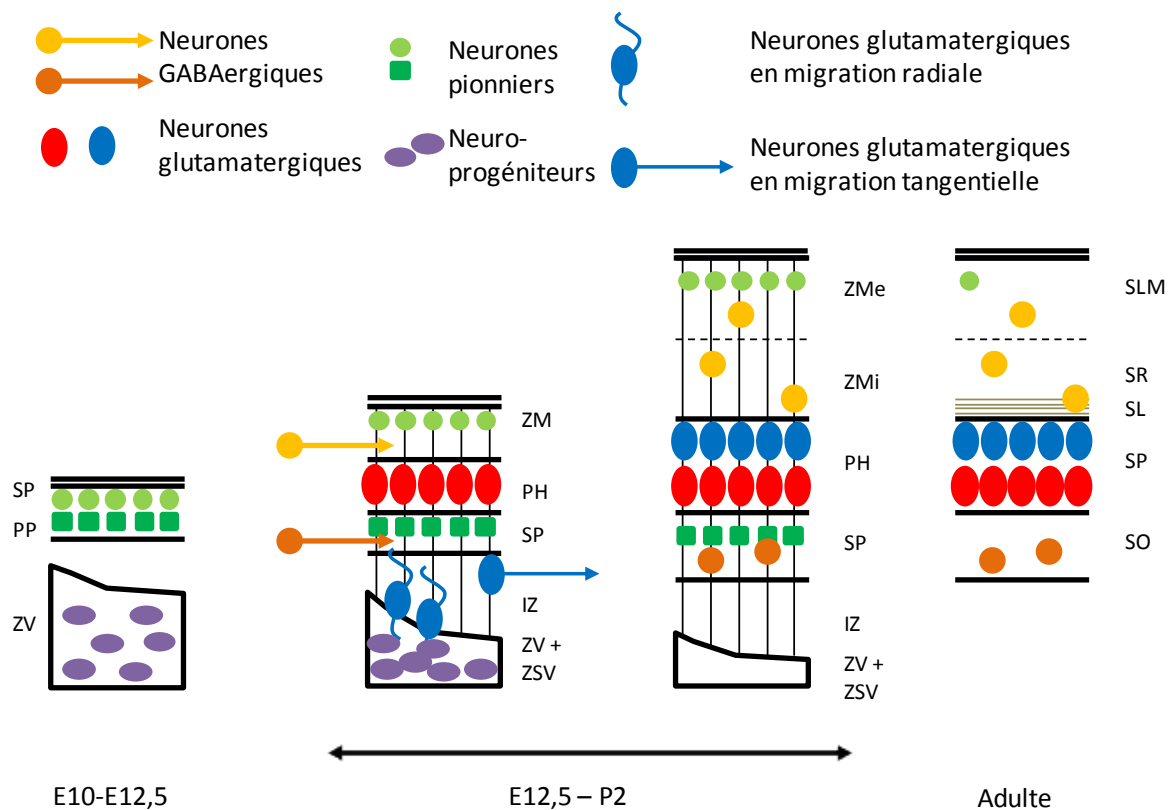


Figure 11 : Neurogenèse, migration, et formation des couches dans la région CA3 de l'hippocampe.

E10-E12,5 : L'hippocampe est initialement composé d'une couche germinative unique, la zone ventriculaire (ZV), et d'une couche appelée préplaque (PP) constituée par les neurones pionniers de l'hippocampe. **E12,5-P2 :** La zone germinative est d'abord uniquement composée de la ZV, puis s'adjoint d'une deuxième couche germinative, appelée zone sous-ventriculaire (ZSV). Les neurones glutamatergiques générés dans la ZV et la ZSV migrent à travers une zone transitoire appelée zone intermédiaire (ZI) et séparent la préplaque en deux couches, la zone marginale (ZM) et la sous-plaque (SP), pour former la plaque hippocampique (PH). Chaque nouvelle vague de neurone généré ne stoppe sa migration que lorsqu'elle a dépassé la vague précédente. Par ailleurs, les neurones GABAergiques, générés dans les éminences, migrent de manière tangentielle dans les couches en formation. **Adulte :** les neurones pionniers dégénèrent et les couches transitoires forment les couches définitives de l'hippocampe. Les fibres en provenance du gyrus denté forment le *stratum lucidum* (SL). SO : *Stratum oriens*, SP : *Stratum Pyramidale*, SL : *Stratum lucidum*, SR : *Stratum Radiatum* SLM : *Stratum Lacunosum-moleculare*.

II. Différentiation des neurones pyramidaux de CA3 :

Dès que le précurseur neuronal de la cellule pyramidale de CA3 amorce sa migration, il acquiert progressivement les caractéristiques d'un neurone mature. Ainsi, le futur neurone développe son arborisation neuritique, et forme des connexions synaptiques. Au même moment, le futur neurone pyramidal subit des modifications de ses propriétés électrophysiologiques et biochimiques. Nous aborderons brièvement ces phases de maturation dans les premiers paragraphes de cette partie.

1. Développement des propriétés physiologiques:

Pendant leur développement, les neurones pyramidaux de CA3 subissent une maturation de leurs propriétés électrophysiologiques, qui s'étend jusqu'après la troisième semaine de vie du rongeur. Nous verrons que cette maturation n'est pas toujours progressive ; à certains stades, les neurones pyramidaux possèdent des propriétés transitoires uniques, dues notamment au profil d'expression régulé par le développement de certains canaux ioniques, de sous-unités de récepteurs ou de transporteurs.

Le développement s'accompagne de **l'expression de nombreux canaux ioniques**, notamment des canaux ioniques dépendants du voltage perméables au sodium (Wang et al., 2009) et au potassium (Grosse et al., 2000; Safiulina et al., 2008). L'expression de ces canaux débute pendant la première semaine de vie (P2-P7), mais ne s'achève pas avant la troisième semaine de vie postnatale du rongeur (P15-P21, (Wang et al., 2009)). De plus, l'accroissement de la surface membranaire pendant le développement des neurites provoque une augmentation de la capacitance et une diminution de la résistance membranaire pendant les trois premières semaines de vie (Shao and Dudek, 2009; Tyzio et al., 2003).

Ainsi, les propriétés membranaires ainsi que le profil d'expression immature des canaux ioniques pendant les deux premières semaines de vie postnatale se traduisent par une propension plus élevée des neurones pyramidaux immatures à décharger de manière

soutenue, ou selon un mode de décharge en bouffées (Safiulina et al., 2008; Shao and Dudek, 2009).

De plus, les neurones pyramidaux subissent pendant les trois premières semaines de vie des modifications qui affectent la **neurotransmission GABAergique et glutamatergique**. Ainsi, les neurones pyramidaux expriment progressivement les récepteurs à neurotransmetteurs, selon la séquence suivante : les récepteurs GABA_A, puis les récepteurs glutamatergiques de type NMDA, puis les récepteurs AMPA (Ben-Ari et al., 1997; Durand et al., 1996; Tyzio et al., 1999).

Par ailleurs, les neurones pyramidaux de CA3 subissent des remaniements importants au niveau de l'expression et de l'activité des *transporteurs de chlore*, dont les principaux sont NKCC1 et KCC2 (Ben-Ari et al., 2007). Ces derniers permettent respectivement l'entrée et la sortie de chlore de part et d'autre de la membrane, et leur action conjuguée permet de réguler la concentration intracellulaire en chlore. Pendant la première semaine de vie, NKCC1 est très actif dans les cellules pendant les stades précoces du développement, accumulant le chlore à l'intérieur de la cellule à un moment où KCC2 est très peu actif. Progressivement, l'activité de NKCC1 décroît après la première semaine de vie, d'abord dans le soma puis dans les dendrites (Romo-Parra et al., 2008), tandis l'expression de KCC2 augmente (Dzhala et al., 2005; Li et al., 2002; Marandi et al., 2002; Rivera et al., 1999).

Or la régulation de la concentration intracellulaire en chlore régule la réponse post-synaptique à l'activation des récepteurs GABA_A, perméables au chlore. Ainsi aux stades où le transporteur NKCC1 est très actif, l'activation des récepteurs GABA_A provoque souvent une dépolarisation membranaire. Cette dépolarisation a été enregistrée dans l'ensemble des compartiments cellulaires pendant la première semaine de vie, et persiste jusqu'à la troisième semaine de vie postnatale dans les dendrites apicales (Ben-Ari et al., 2007; Romo-Parra et al., 2008).

De même, la composition en sous-unités des récepteurs change pendant les premières semaines de vie et attribue des propriétés transitoires aux récepteurs glutamatergiques spécifiques des stades immatures. Pendant la première semaine de vie, les neurones pyramidaux expriment préférentiellement la sous-unité NR2B, qui confère aux récepteurs une fenêtre d'ouverture plus longue, tandis que la sous-unité NR2A devient majoritaire après P20 (Monyer et al., 1994; Yashiro and Philpot, 2008). En outre, les neurones

pyramidaux expriment des récepteurs AMPA perméables aux ions calcium, dépourvus de la sous-unités gluR2 pendant les premières semaines de vie, alors que les récepteurs imperméables aux ions calcium, majoritaires aux stades matures, deviennent prédominants à partir de P17 (Ho et al., 2007).

En parallèle, l'**ion zinc**, apparaît dans les neurones pyramidaux de CA3 dès P0, et atteint un niveau d'expression semblable aux stades adultes dès P7 (Slomianka and Geneser, 1997). Il pourrait à ces stades précoces participer à la synaptogenèse (Grabrucker et al., 2011).

De manière concomitante à l'acquisition de leurs propriétés électrophysiologiques et biochimiques matures, les neurones pyramidaux développent leur arborisation neuritique et leurs connexions afférentes et efférentes, que nous décrivons dans le paragraphe suivant.

2. Développement de l'arborisation neuritique :

Les neurones pyramidaux développent leur arborisation neuritique très tôt, dès l'initiation de leur migration, selon une séquence canonique : l'axone se développe avant les dendrites, et les dendrites apicaux se forment avant les dendrites basaux (Tyzio et al., 1999).

La morphologie bipolaire apico-basale caractéristique des neurones pyramidaux matures est héritée de la morphologie bipolaire adoptée par les précurseurs dès l'initiation de leur migration (Calderon de Anda et al., 2008). Ainsi, au moment d'amorcer la migration, le neurone acquiert deux prolongements qui lui permettent de se mouvoir, le prolongement de proue et le prolongement de sillage (voir p70). Pendant la migration, le prolongement de sillage acquiert les caractéristiques des axones. A l'opposé, le prolongement de proue forme la première dendrite apicale ((Nadarajah and Parnavelas, 2002; Noctor et al., 2004), pour revues, voir (Barnes and Polleux, 2009; Polleux and Snider, 2010) Enfin, les dendrites basales, apparaissent en dernier, vers la naissance (Tyzio et al., 1999).

Une fois leur polarité établie, les neurites subissent une phase de forte croissance. Sous l'instruction de signaux environnementaux, les dendrites et l'axone s'allongent et se ramifient (Scott and Luo, 2001). Ainsi, entre la période périnatale (P0) et la troisième semaine de vie postnatale chez la souris, les dendrites apicales et basales multiplient leur taille par cinq et treize respectivement (Pokorný and Yamamoto, 1981; Zhang, 2004), alors

que l'axone, plus long, croîtrait dix fois plus vite (Polleux and Snider, 2010). A cette croissance rapide s'opposent des signaux de terminaison qui restreignent la croissance des neurites (et surtout les dendrites) dans des limites données (Scott and Luo, 2001). Ainsi les dendrites apicales s'arrêtent à la fissure hippocampique (hormis celles de CA3c, limitées par les bras du gyrus denté), et les dendrites basales à la partie la plus profonde du *stratum oriens*.

Du fait de l'étalement de la période de neurogenèse (E10-E18) et de migration (E12-P2), les neurones pyramidaux n'acquièrent par leurs propriétés matures au même rythme. En effet, les neurones pyramidaux de l'hippocampe sont caractérisés par une hétérogénéité des stades de maturation morphologique des neurones pyramidaux à un stade développemental donné (Tyzio et al., 1999). Or l'intégration des neurones pyramidaux au réseau ne se fait pas non plus au même rythme pour tous les neurones pyramidaux. Nous verrons au contraire dans la partie suivante que la formation des connexions afférentes et efférentes des neurones pyramidaux est intimement liée au stade de maturation des neurones pyramidaux individuels.

III. Etablissement des connexions afférentes et efférentes :

La formation des connexions afférentes et efférentes dans CA3 se déroule pendant une période d'intense synaptogenèse. Celle-ci commence pendant la vie embryonnaire, avec la formation de connexions transitoires formées par les cellules pionnières telles que les cellules de Cajal-Retzius et de la sous-plaque (Kanold and Luhmann, 2010; Soriano and Del Río, 2005), et qui s'étale pendant les trois premières semaines de vie postnatales chez le rongeur pour ce qui concerne les connexions formées par les neurones pyramidaux et les neurones GABAergiques de l'hippocampe (Danglot et al., 2006; Steward and Falk, 1991). Cette période de synaptogenèse s'achève par une période d'élagage (*sprouting*) et d'élimination des synapses inappropriées ou peu fonctionnelles (Bastrikova et al., 2008; Katz and Shatz, 1996), et qui survient dans l'hippocampe après la troisième semaine de vie postnatale chez le rongeur (Aniksztejn et al., 2001; Gomez-Di Cesare et al., 1997; Paolicelli et al., 2011).

Il existe un débat actuellement sur la spécificité des connexions synaptiques qui s'établissent au cours de la synaptogenèse (Nelson, 2002). Ainsi, dans le néocortex, les connexions des neurones GABAergiques sur les neurones pyramidaux semblent se former de manière aspécifique (Fino and Yuste, 2011; Packer and Yuste, 2011). A l'inverse, les cellules pyramidales du néocortex forment préférentiellement des connexions avec des cellules pyramidales « sœurs » issues de la même cellule neuroprogénitrice « mère ». Cette forme de « népotisme » neuronal pourrait être à l'origine de l'élaboration des colonnes corticales fonctionnelles (Yu et al., 2009).

Dans l'hippocampe, la couche pyramidale est beaucoup plus fine que dans le néocortex, et aucune organisation verticale (à l'image des colonnes) n'a été clairement mise en évidence. Il est donc difficile de dire si l'établissement des connexions suit les mêmes règles que dans le néocortex. Toutefois, les connexions afférentes et efférentes des neurones pyramidaux semblent être régies par des règles de spécificité, puisque les neurones pyramidaux forment des connexions avec certains types cellulaires, au niveau de compartiments cellulaires bien définis (voir p50). C'est le cas par exemple des fibres moussues des cellules granulaires qui établissent un contact préférentiellement avec les neurones pyramidaux de CA3 au niveau des dendrites situées dans le *stratum lucidum*. Nous discuterons ici des règles qui semblent régir l'établissement des connexions synaptiques afférentes et efférentes des neurones pyramidaux de l'hippocampe pendant la période de synaptogenèse.

Roman Tyzio et collaborateurs ont montré que les neurones pyramidaux de l'hippocampe sont caractérisés par une diversité de leur stade de maturation morphologique à P0 (Tyzio et al., 1999). Les auteurs montrent en outre qu'à ce stade les neurones immatures sont dépourvus de synapses fonctionnelles, alors que les plus développés du point de vue morphologique possèdent des synapses GABAergiques fonctionnelles, voire à la fois des synapses GABAergiques et glutamatergiques fonctionnelles. Cela suggère que le nombre et le type de synapses que reçoivent les neurones pyramidaux au même stade dépend de leur stade de maturation dendritique.

Le stade de maturation semble également définir le compartiment cellulaire où se forment les connexions afférentes glutamatergiques des neurones pyramidaux de CA3. Ces derniers

reçoivent connexions afférentes glutamatergiques en provenance de trois régions : le cortex entorhinal, le gyrus denté, mais aussi CA3 via les axones récurrents et commissuraux. Ces afférences glutamatergiques atteignent la région CA3 à différents stades de développement des neurones pyramidaux, et forment des contacts avec des compartiments dendritiques distincts (Frotscher and Heimrich, 1993). Ainsi, les axones du cortex entorhinal sont les premiers à atteindre l'hippocampe, à E15 (Snyder et al., 1991; Witter et al., 1988). Ils se servent des cellules de Cajal-Retzius comme d'un tuteur pour projeter dans la zone marginale (futur *stratum lacunosum-moleculare*) avant de contacter les neurones pyramidaux de CA3 lorsque ceux-ci sont suffisamment matures du point de vue morphologique pour étendre leurs dendrites dans le *stratum lacunosum-moleculare* (Ceranik et al., 1999).

Les fibres commissurales et associationnelles, qui se forment à des stades intermédiaires, à partir de E18 (Bayer, 1980), se répartissent sur les dendrites apicales du *stratum radiatum* et les dendrites basales du *stratum oriens*. Elles forment des contacts synaptiques préférentiellement avec des neurones glutamatergiques qui possèdent déjà une arborisation dendritique, quelque soit leur localisation (Deller et al., 1999; Deller et al., 1999).

Enfin, à cause de la genèse retardée des cellules granulaires, les fibres moussues sont les dernières à atteindre l'hippocampe, vers P3 (Amaral and Dent, 1981), et forment des connexions préférentiellement au niveau du *stratum lucidum*.

Les observations citées ci-dessus suggèrent qu'il existe une ségrégation temporelle de la formation des connexions afférentes pendant le développement qui aboutit à une ségrégation spatiale de la répartition des connexions le long de l'axe dendritique des neurones pyramidaux de CA3.

Enfin, le groupe de recherche de Pico Caroni a démontré qu'il existait un codage de l'établissement des connexions synaptiques dans l'hippocampe selon des règles de *chevauchement temporel* (*temporal matching rules*, (Deguchi et al., 2011)). Leur étude se base sur des lignées de souris transgéniques permettant le marquage de deux populations de neurones glutamatergiques hippocampiques distinctes par leur fenêtre temporelle de neurogenèse et de synaptogenèse. Grâce à ce modèle, les auteurs ont étudié les connexions formées entre les cellules granulaires et CA3, mais aussi entre cellules pyramidales de CA3 et de CA1. Ils ont montré que la quasi-totalité des connexions se forme entre neurones générés

pendant la même période de neurogenèse, et qui partagent la même fenêtre temporelle de synaptogenèse. Afin de déterminer si cette préférence des connexions était due à la coïncidence des périodes de synaptogenèse, ou bien d'une complémentarité moléculaire ou génétique des neurones, les auteurs ont effectué des expériences de co-cultures *hétérochroniques* dans lesquelles ils ont fait coïncider les stades de maturation des deux populations générées pendant des fenêtres de neurogenèse distinctes. Ce faisant, ils ont montré que dans ces conditions des connexions pouvaient se former entre deux populations générées à des périodes différentes de neurogenèse, ce qui exclut l'hypothèse d'une incompatibilité moléculaire.

Ces résultats suggèrent que les neurones se connectent entre eux non pas uniquement grâce à un facteur génétique commun, mais grâce au chevauchement de leur période de synaptogenèse, qui est définie par des dates de neurogenèse similaires.

Ainsi, la période de neurogenèse n'est pas seulement l'élément initiateur des processus développementaux ultérieurs, tels que la migration et le développement des propriétés morphologiques, la date de neurogenèse définit aussi les connexions afférentes et efférentes formées par un neurone pyramidal donné (Deguchi et al., 2011). Cela suggère que la date de neurogenèse relative d'un neurone pourrait se traduire par un rôle fonctionnel différent. Cette hypothèse est particulièrement intéressante dans le cadre de notre problématique qui visait à relier l'hétérogénéité morpho-fonctionnelle des neurones pyramidaux de CA3 avec leur développement. C'est pourquoi au cours de cette thèse, nous avons testé s'il existait un lien entre le rôle fonctionnel des neurones pyramidaux de CA3 et leur date de neurogenèse. Or la neurogenèse des neurones pyramidaux de CA3 provient, de la décision d'un neuroprogéniteur de quitter son cycle de division pour former un précurseur neuronal immature et postmitotique qui amorce dès lors les processus de migrations et de différenciation. Cette décision prise par le neuroprogéniteur implique une cascade de facteurs de transcription que nous décrivons dans la partie suivante.

IV. Aspects moléculaires du développement précoce.

1. Les cascades moléculaires architectes du développement du cortex :

A l'image d'un architecte, qui intervient dès l'achat du terrain, effectue les plans, et supervise le début des travaux de construction d'un bâtiment, il existe une cascade moléculaire architecte qui intervient dans un tissu vierge de neurones, prend en charge les premières étapes du développement neuronal et détermine les traits de caractère primordiaux des neurones glutamatergiques, dont les pyramides de l'hippocampe. Ces molécules architectes, exprimées très tôt par les neuroprogéniteurs, participent à la décision de ces derniers d'arrêter leur cycle cellulaire et de devenir des précurseurs neuronaux post-mitotique, leur assigne une identité glutamatergique et corticale, avant d'amorcer chacun des grands processus initiaux du développement des neurones pyramidaux que nous avons décrits dans les parties précédentes.

Cette cascade, très conservée dans l'évolution (Hevner et al., 2006), s'articule autour d'un tronc central de *facteurs de transcription* (appelés aussi « facteurs proneuronaux ») c'est-à-dire de protéines capables de se fixer à l'ADN et d'influencer l'expression des gènes. Ces facteurs de transcription s'expriment séquentiellement dans l'ordre selon lequel nous les présentons ici : Pax6, Ngn2, Tbr2, NeuroD, Tbr1. Chacun de ces facteurs s'exprime de manière transitoire, par le neuroprogéniteur, puis par le précurseur postmitotique, dans un compartiment particulier du néocortex et de l'hippocampe en développement. Ainsi, Pax6 s'exprime dans la zone ventriculaire, Ngn2 dans la zone ventriculaire pendant les phases précoces et intermédiaires, puis dans la zone sous ventriculaire pendant les stades tardifs, Tbr2 dans la partie supérieure de la zone ventriculaire ainsi que dans la zone sous ventriculaire (qui sont des régions de prolifération et de spécification de l'identité neuronale), NeuroD dans la partie supérieure de la zone sous-ventriculaire et la zone intermédiaire (région de migration et de différenciation), Tbr1 dans la partie supérieure de la zone intermédiaire et dans la plaque corticale (zone de maturation et de guidage de l'axone). Chacun de ces facteurs, dont l'expression est contrôlée en temps et en lieu par le

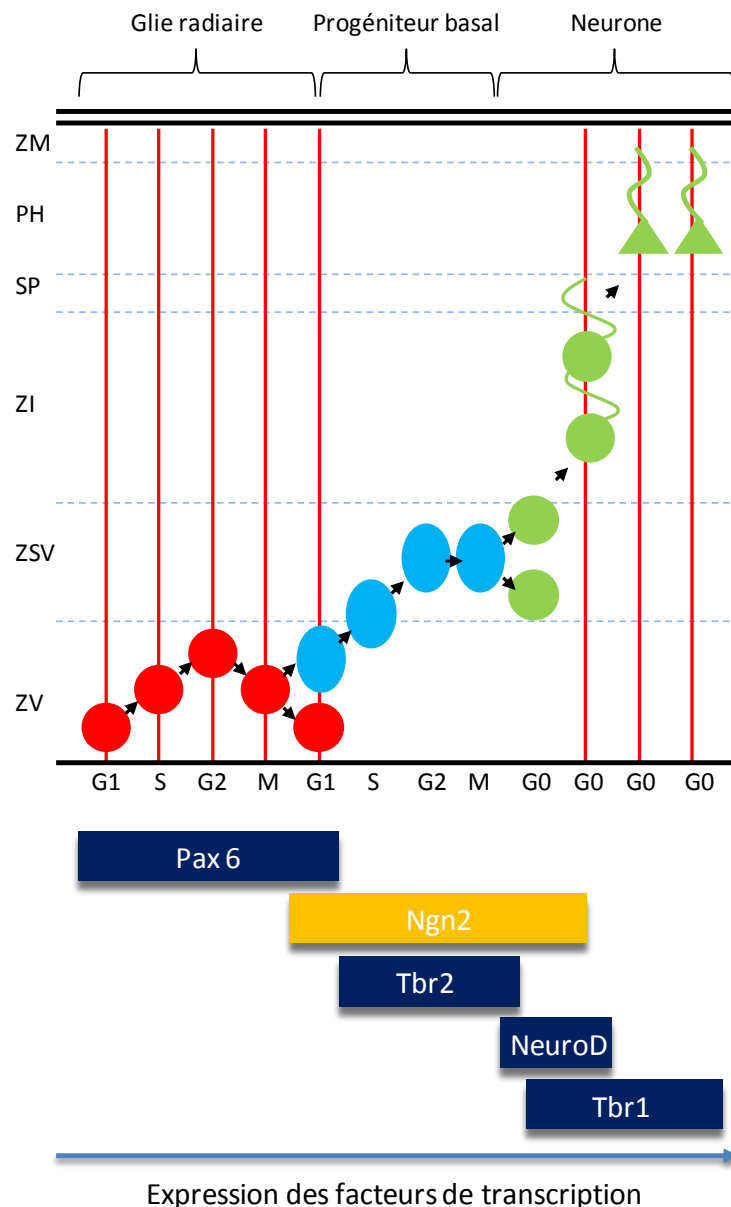


Figure 12 : Expression des molécules de la cascade architecte pendant les phases initiales du développement des neurones pyramidaux de l'hippocampe.

Les glies radiaires de la zone ventriculaire (ZV) subissent une division asymétrique (phase M de leur cycle), générant souvent une nouvelle glie radiaire, ainsi qu'un progéniteur basal. Le progéniteur basal subit une division symétrique dans la zone sous-ventriculaire (ZSV), générant deux neurones post-mitotiques (leur cycle est arrêté en phase G0) qui migrent dans la zone intermédiaire jusqu'à leur localisation définitive dans la plaque hippocampique où ils se différencient. Pax6 s'exprime dans les glies radiaires et son expression diminue au stade de progéniteur basal. Tbr2 s'exprime pendant le stade de progéniteur basal. Ngn2 s'exprime également pendant le stade progéniteur basal, mais aussi chez des neurones post-mitotiques. NeuroD et Tbr1 s'expriment uniquement dans les neurones en migration et en différenciation. Les phases du cycle cellulaire sont notées successivement G1, S, G2 et M, alors que G0 signifie l'arrêt du cycle. Zi : zone intermédiaire, SP : sous-plaque, PH : plaque hippocampique, ZM : zone marginale. Voir (Hevner et al., 2006; Hevner, 2006).

neurone en différenciation, supervise une étape du développement et met en route l'expression des facteurs nécessaires à l'étape suivante, voir Figure 12.

Dans le paragraphe suivant, nous discuterons plus dans le détail du rôle de Ngn2, molécule qui sert de base à un modèle de souris que nous avons utilisé au cours de cette thèse.

2. Ngn2 est indispensable au développement des neurones glutamatergiques

Ngn2, (appelé aussi *Neurogénine 2*, ou encore *NeuroG2*) est un facteur de transcription de type bHLH (pour *basic helix-loop-helix*, du nom du motif de conformation en hélice-boucle-hélice caractéristique de cette famille de protéines). Ngn2 joue un rôle important, et à plusieurs facettes, pendant les différents stades de développement des neurones pyramidaux, et qui a été étudié principalement dans le néocortex, mais aussi dans l'hippocampe (Galichet et al., 2008; Roybon et al., 2009).

2.1. Ngn2 et les phases précoces du développement.

Pendant les premiers stades de la genèse des neurones glutamatergiques (E10-E14,5 chez la souris), ce facteur est engagé dans une kyrielle de fonctions fondamentales du développement précoce. Tout d'abord, Ngn2 est exprimé dans les zones germinatives (principalement dans la zone ventriculaire, dans une moindre mesure sous-ventriculaire, Figure 12). Il est exprimé par des progéniteurs intermédiaires (exprimant le marqueur Tbr2, (Hevner et al., 2006)), mais aussi dans les neurones nouveaux-nés (exprimant NeuN, (Hand et al., 2005)). L'expression de Ngn2 est pratiquement nulle dans la zone intermédiaire, compartiment de migration, ce qui suggère qu'il s'exprime transitoirement, au moment de la transition de l'état de progéniteur intermédiaire vers l'état de précurseur post-mitotique qui amorce sa différenciation. Exprimé par les progéniteurs intermédiaires pendant la phase G1 de leur cycle, il participe à une première prise de décision fondamentale de la cellule : celle de sortir du cycle pour devenir un précurseur neuronal postmitotique, plutôt que de réengager la cellule dans un nouveau cycle de division destiné au renouvellement du stock de neuroprogéniteurs (Ali et al., 2011; Bertrand et al., 2002). Après ce premier choix d'un

avenir neuronal plutôt que glial, Ngn2 participe à une deuxième décision: celle de spécifier au précurseur neuronal un avenir glutamatergique plutôt que GABAergique. Pour cela, Ngn2 réprime les signaux visant à spécifier un avenir GABAergique, en inhibant Mash1. Dans le même temps, il induit au contraire l'expression du neurotransmetteur glutamate, et de marqueurs glutamatergiques classiques tel que la protéine vésiculaire Vglut1 (Fode et al., 2000; Schuurmans et al., 2004)).

Par la suite, Ngn2 seul, ou associé à un certain nombre d'auxiliaires dont il régule parfois lui-même l'expression initie un grand nombre de processus développementaux pendant les phases précoces du développement. Ainsi, il donne le signal de départ de la migration en conférant aux précurseurs une morphologie bipolaire stable, qui facilite la locomotion radiale des neurones vers la surface du cortex (Hand et al., 2005; Heng et al., 2008). De plus, il participe à l'étape de différenciation des précurseurs neuronaux, non seulement en induisant l'expression de marqueurs, mais également en conférant aux neurones du cortex leur arborisation dendritique caractéristique (Hand et al., 2005).

D'une manière assez curieuse, le rôle initiateur de Ngn2 est restreint aux phases précoces du développement du cortex, au moment de la constitution des couches profondes du néocortex (couches V et VI), c'est-à-dire avant le jour embryonnaire E14,5 de la souris. Passée cette date, Ngn2 est toujours exprimé par les précurseurs, mais les fonctions de neurogenèse, de migration et de différenciation initiale se déroulent d'une manière largement indépendante de son activité. A ces stades, Ngn2 participe à d'autres fonctions développementales que nous décrivons ci-dessous.

2.2. Ngn2 et les phases tardives du développement.

Aux stades tardifs du développement (passée la deuxième semaine de vie embryonnaire), Ngn2 joue un rôle tout à fait différent de celui décrit précédemment: il participe à l'établissement de la connectivité, c'est-à-dire dans le guidage des axones vers leur cible finale. Ce rôle de Ngn2 a été préalablement mis en évidence dans le thalamus (Seibt et al., 2003), où il participe à l'établissement des cartes de connexions thalamo-corticales. Dans le néocortex, un rôle similaire a été mis en évidence pour Ngn2, qui permettrait aux neurones générés pendant les phases tardives de se connecter avec leur cible *ad hoc* dans le cortex controlatéral via le corps calleux, plutôt que dans les régions subcorticales comme le font les

neurones générés pendant les phases les plus précoces (Hand and Polleux, 2011). Dans le thalamus et le néocortex, Ngn2 remplirait cette fonction en modulant la capacité du neurone à capter les signaux environnementaux de guidage d'axone, en régulant l'expression de récepteurs de la famille des Ephrine, des Semaphorines, ou encore des Nétrines (Mattar et al., 2004).

Enfin, lorsqu'un précurseur franchit un stade de maturation donné, l'expression de Ngn2 s'éteint progressivement. Ses fonctions alors sont prises en relais par les éléments en aval dans la cascade architecte, dont Ngn2 contrôle en grande partie l'expression aux stades précoces du développement (Mattar et al., 2004; Mattar et al., 2008).

Les facteurs que nous avons évoqués ci-dessus dirigent une partie des étapes du développement dès la naissance d'un neurone individuel. Autrement dit, l'histoire développementale particulière d'un neurone semble en grande partie déterminée de manière autonome par la *date de naissance individuelle* des neurones issus du même territoire germinatif. Or dans le cadre de notre problématique, nous voulions discriminer les neurones pyramidaux selon leur histoire développementale, avant de la relier avec leur poids fonctionnel dans le réseau. Dans cette optique, certains facteurs de la cascade architecte tels Ngn2 constituent des marqueurs intéressants. Ngn2 s'exprime de manière très précoce et transitoire dans des progéniteurs secondaires, participe à leur différenciation en neurone postmitotique, puis initie les processus développementaux ultérieurs. Le marquage des cellules exprimant Ngn2 à un stade donné permettrait de suivre l'évolution de neurones nés à ce stade (et seulement à ce stade) tout au long de la vie.

En résumé :

Tout au long de cette introduction générale, nous avons vu que les neurones pyramidaux de CA3 présentent une considérable diversité de propriétés, qui s'ajoutent à une variété des rôles fonctionnels au sein du réseau. Ensuite, nous avons vu qu'un grand nombre de propriétés des neurones étaient acquises au cours des processus développementaux qui surviennent pendant les phases précoces de la vie. Ces faits semblent s'imbriquer pour donner de la substance à notre hypothèse de départ selon laquelle les propriétés fonctionnelles hétérogènes des neurones pyramidaux seraient acquises pendant le développement. Or la date de neurogenèse est le processus initial et initiateur du développement, qui amorce les processus suivants, comme la migration, et la différenciation neuronale, laquelle conditionne la formation des connexions afférentes et efférentes. La date de neurogenèse est déterminée par la prise de décision d'une cellule neuroprogénitrice à cesser son cycle, sous l'influence de facteurs de transcriptions tels que Ngn2.

Nous avons donc utilisé un modèle de souris qui nous permet de discriminer les neurones pyramidaux selon leur date de naissance, qui s'appuie sur l'expression de l'une des molécules de la cascade architecte que nous avons décrite, Ngn2, qui s'exprime au moment de la genèse des neurones pyramidaux. Grâce à ce modèle, nous avons étudié le rôle fonctionnel des neurones pyramidaux nés à différent stades de la neurogenèse en utilisant le modèle d'activités épileptiformes générées par blocage de la transmission GABAergique (voir p35), et qui a permis par le passé d'identifier des classes fonctionnellement distinctes de neurones pyramidaux de CA3 (Miles and Wong, 1983; Wittner and Miles, 2007; de la Prida et al., 2006).

Partie 2 : Résultats

La diversité fonctionnelle des cellules glutamatergiques de la région CA3 provient de leurs différentes fenêtres temporelles de neurogenèse.

Thomas Marissal, Paolo Bonifazi, Michel Picardo, Romain Nardou, Ludovic Petit, Agnes Baude , Gordon Fishell, Yehezkel Ben-Ari* et Rosa Cossart*

Résumé et approche expérimentale :

Le travail de thèse décrit dans ce chapitre a démarré dans le contexte de la mise en évidence par Paolo Bonifazi et collaborateurs de neurones GABAergiques « hubs » capables de moduler l'occurrence des activités immatures du réseau de CA3 qui surviennent pendant la première semaine de vie, les GDPs.

A partir de ces observations, le projet consistait à déterminer si certains neurones glutamatergiques pouvaient jouer un rôle similaire à celui des « hubs » GABAergiques. C'est pourquoi nous avons étudié les dynamiques du réseau hippocampique à P7 en l'absence de transmission GABAergique rapide fonctionnelle, dans des conditions où les « hubs » GABAergiques sont inactifs. Nous avons bloqué la transmission GABAergique rapide en bloquant les récepteurs de type GABA_A grâce à des agents pharmacologiques tels que la bicuculline ou la GABAzine.

Grâce à des techniques d'imagerie calcique et d'électrophysiologie, combinées à une analyse mathématique, nous avons observé que le réseau génère des activités épileptiformes en l'absence de transmission GABAergique fonctionnelle. De plus, nous avons montré que les neurones pouvaient être classés en deux populations en fonction de leur décharge individuelle relative au *pic* de décharge du réseau ; le pic étant défini comme le moment où le nombre de cellules coactives est maximal pendant une activité corrélée. En effet, une population de neurones décharge préférentiellement pendant les phases initiatrices (ou *build-up*) des activités épileptiformes, alors que la deuxième population décharge pendant le pic. Nous avons appelé ces deux populations EFN et LFN respectivement (pour *early* et *late firing neurons* ; neurones à décharge précoce et tardives).

En outre, l'enregistrement des EFNs et les LFNs par des techniques de patch-clamp et leur remplissage par un marqueur fluorescent (la neurobiotine) nous a permis d'étudier leurs propriétés électrophysiologiques, et de reconstruire *post-hoc* leur arborisation axo-dendritique. Ainsi, nous avons montré que la longueur totale des neurites, ainsi que la valeur de capacitance des EFNs était significativement plus élevée que celle des LFNs à P7. Les propriétés morpho-physiologiques plus développées des EFNs suggèrent qu'ils sont à un stade de maturation plus avancé. C'est pourquoi nous avons testé l'hypothèse qu'ils seraient

générés à des stades plus précoces de la neurogenèse glutamatergique. Dans ce but, nous avons utilisé une lignée de souris transgéniques qui nous permettait d'induire un marquage GFP dans les neurones pyramidaux de manière dépendante de leur date de neurogenèse (voir Figure 13). Nous avons ainsi marqué une population de neurones nés aux stades les plus précoces de la neurogenèse glutamatergique (l'induction ayant lieu à E11-12), appelés EGNs (pour *early generated neurons*) ainsi que des neurones générés pendant les stades tardifs de la neurogenèse glutamatergique (E15-16), que nous avons appelés LGNs (*late generated neuron*, voir Figure 13).

En accord avec notre hypothèse, les EGNs sont similaires aux EFNs du point de vue de leurs propriétés morpho-physiologiques. De plus, ils déchargent préférentiellement pendant les phases initiatrices des activités épileptiformes. Ces résultats suggèrent que les neurones nés pendant les périodes précoces de la neurogenèse glutamatergique forment une population d'EFNs.

Ainsi, les propriétés des EGNs et des EFNs nous ont amené à poser l'hypothèse que ces neurones pouvaient jouer un rôle fonctionnel différent dans la génération des activités épileptiformes. Pour tester cette hypothèse, nous avons stimulé individuellement des EFNs/EGNs et LFNs/LGNs à P7 par des techniques d'électrophysiologie, tout en enregistrant en simultané l'activité du réseau en imagerie calcique. Cependant, la stimulation individuelle des EFNs et des LFNs, ou des LGNs et EGNs, ne modifie pas significativement les dynamiques du réseau à P7.

Nous avons alors émis l'hypothèse que les propriétés des neurones pyramidaux et du réseau de la région CA3 n'étaient pas suffisamment matures à P7 pour qu'un simple neurone pyramidal puisse générer des activités de réseau à ce stade. En effet, les travaux de Richard Miles, qui montrent un rôle des neurones pyramidaux dans les activités épileptiformes ont été effectués dans un contexte adulte (Miles and Wong, 1983).

Nous avons donc stimulé par électrophysiologie des EGNs et des LGNs à des stades plus matures, pendant la troisième semaine de vie du rongeur (autour de P15), et étudié l'effet de cette stimulation sur l'activité du réseau, enregistré en extracellulaire, en absence de

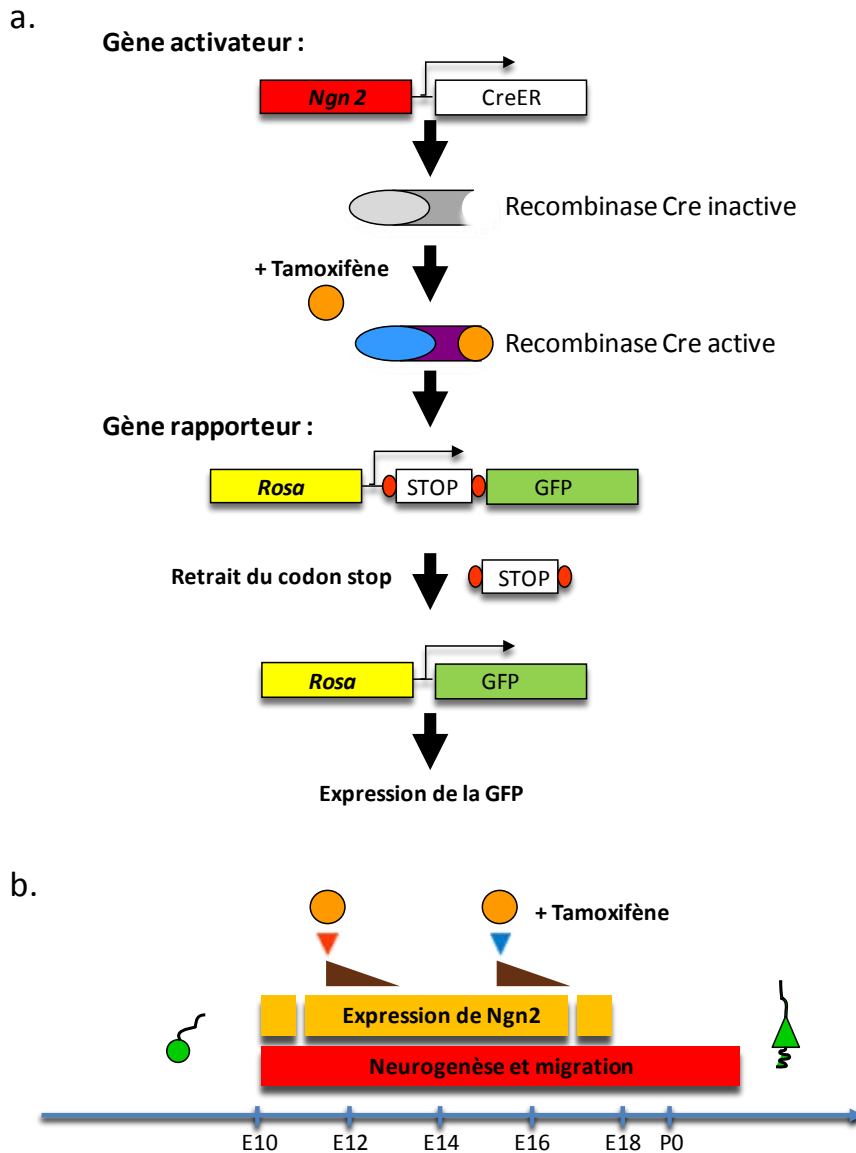


Figure 13 : Système d'induction du marquage des neurones glutamatergiques en fonction de leur date de neurogenèse.

Le marquage des neurones glutamatergiques en fonction de leur date de neurogenèse repose sur une lignée de souris transgéniques exprimant un gène activateur et un gène rapporteur. **(a.)** Le gène **activateur** est composé de la séquence codante d'une recombinaise CRE liée à un récepteur à œstrogène (*Estrogen Receptor*, ER), sous le contrôle du promoteur de Ngn2. Le complexe Cre-ER, qui s'exprime donc aux stades où s'exprime la protéine Ngn2 nécessite la liaison du Tamoxifène avec le récepteur ER pour être activé. Le gène **rapporteur** est composé de la séquence codante de la protéine fluorescente verte GFP (*green fluorescent protein*) sous le contrôle d'un promoteur ubiquitaire, Rosa. La séquence codante et le promoteur sont séparés par un codon stop entouré de séquences *lox* qui bloquent la transcription. Le codon stop peut être retiré par la CRE, ce qui permet l'expression de la GFP. En résumé, l'expression de la GFP dans les futures cellules glutamatergiques (exprimant Ngn2) est induite par le tamoxifène. **(b.)** L'expression de Ngn2 étant prénatale, le tamoxifène est délivré aux embryons par gavage de souris femelles pendant la gestation. Le tamoxifène ayant une durée de vie d'environ 24h, les gavages à E11-E12 ou E15-16 de la neurogenèse permettra le marquage des neurones glutamatergiques générés pendant les stades précoces ou tardifs de la neurogenèse.

transmission GABAergique rapide. Cette fois, nous avons montré que les EGNs, mais pas les LGNs, pouvaient générer des activités de réseau à ces stades.

De plus, les EGNs conservent aux stades matures des propriétés morpho-physiologiques distinctes de celles des LGNs, telle une propension à générer des potentiels d'action selon un mode de décharge en bouffée, une différence entre le potentiel de repos et le seuil de genèse des potentiels d'action plus faible, et un segment initial de la dendrite apicale plus long. Certaines de ces propriétés pourraient être à l'origine du rôle fonctionnel distinct des EGNs aux stades juvéniles.

Ces résultats suggèrent qu'un simple neurone pyramidal peut affecter les dynamiques de réseau à P15, mais pas à P7. Or des travaux suggèrent qu'à des stades matures, les neurones pyramidaux individuels sont capables de générer des activités de réseau car ils fournissent au réseau l'excitation nécessaire pour franchir le seuil de genèse des activités épileptiformes aux stades matures (de la Prida et al., 2006). A partir de ces observations, nous avons émis l'hypothèse que l'excitation d'un seul neurone pyramidal à P7 ne permettait pas de franchir ce seuil, mais que l'excitation fournie simultanément par plusieurs EGNs ou EFNs pourrait être suffisante pour générer des activités épileptiformes à P7.

Etant donné que le petit nombre d'EGNs par hippocampe, nous avons stimulé par des techniques optiques successivement des petits groupes de 2 à 4 EFNs puis de 2 à 4 LFNs à P7, tout en enregistrant l'activité du réseau en imagerie calcique. En accord avec notre hypothèse, la stimulation de groupes d'EFNs déclenche significativement des activités de réseau, et plus souvent que la stimulation de groupes de LFNs.

L'ensemble de ces résultats suggère qu'il existe des populations de neurones pyramidaux de CA3 distincts par leurs propriétés morpho-physiologiques, mais aussi fonctionnelles. Ces différences fonctionnelles se manifestent d'une part par leur préférence de décharge pendant les activités épileptiformes générées en l'absence de transmission GABAergique, et d'autre part par leur capacité à générer, ou non, des activités de réseau lorsqu'ils sont stimulés en groupe à P7, et lorsqu'ils sont stimulés individuellement à P15. Enfin, nous montrons cette diversité morpho-fonctionnelle des neurones pyramidaux a pour origine des dates de neurogenèse différentes.

Functionally distinct CA3 hippocampal glutamatergic cells reflect their discrete temporal embryonic origins

Thomas Marissal, Paolo Bonifazi, Michel Picardo, Romain Nardou, Ludovic Petit, Agnes Baude , Gord Fishell, Yehezkel Ben-Ari* and Rosa Cossart*

Abstract (148 words)

The developing CA3 hippocampus is comprised by highly connected hub neurons that are particularly effective in achieving network synchronization, through their orchestration of spontaneous network dynamics. Functional hub neurons were shown to be exclusively GABAergic, suggesting that the contribution of glutamatergic neurons to physiological synchronization processes at early postnatal stages is minimal. However, without GABAergic transmission, a different situation may prevail. In the adult CA3, blocking fast GABAergic transmission induces the generation of network bursts that can be triggered by the stimulation of single pyramidal neurons. We therefore revisit the network function of CA3 glutamatergic neurons from a developmental viewpoint, in the absence of GABAergic transmission. We observe that a subpopulation of early-generated glutamatergic neurons single-handedly impacts network dynamics when stimulated at juvenile stages. Additionally, this population displays distinct morphophysiological features. Therefore, the apparently homogeneous glutamatergic cell population actually displays a functional diversity rooted in temporal embryonic origins.

Introduction

Synchronized discharges of cell populations are a characteristic feature of epileptic networks as well as a hallmark of developing neuronal structures. Such network dynamics are highly dependent on the connectivity between various types of neurons. At early postnatal stages, the developing hippocampus displays spontaneous, synapse-driven network synchronizations in the form of Giant Depolarizing Potentials (GDPs) ¹. We have previously shown that GDPs are dependent on superconnected GABAergic hub neurons for their generation, and that stimulating a single hub cell could affect GDPs in the CA3 region of mouse hippocampal slices ². Despite the profound contribution of GABAergic neurons to signalling, the majority of neurons contributing to the CA3 hippocampal network are

pyramidal glutamatergic cells. Interestingly, although some glutamatergic neurons displayed an exceptionally high functional connectivity degree ², none of them impacted GDPs occurrence when stimulated. This suggests that despite their large numbers, the contribution of single glutamatergic neurons to physiological synchronization processes in the immature postnatal hippocampus is minimal.

In the adult hippocampus, blocking the fast inhibitory GABAergic drive generates network bursts that are thought to mimic epileptic conditions. These interictal-like events synchronize the activity of large populations of neurons suggesting that, at least adult hippocampal networks can generate network bursts when only glutamatergic transmission operative. Miles and Wong have shown that stimulating a single CA3 pyramidal neuron in hippocampal slices from the adult guinea pig triggers network synchronization after pharmacological suppression of the GABAergic inhibitory drive ³. Spontaneous firing in CA3a cells preceded population bursts in a larger proportion than in other regions ⁴ while evoked firing in these cells more reliably induced an increase in multiunit activity ⁵. Last, CA3a glutamatergic cells displayed distinct morpho-physiological properties including a greater excitability as well as enhanced synaptic connectivity ⁵. Therefore, a subpopulation of glutamatergic neurons is capable of entraining large networks without the contribution of GABAergic signals. This population was proposed to act as “pacemaker” cells ⁵. Here, we investigated whether, already at early developmental stages, glutamatergic neurons could trigger comparable network bursts without the contribution of GABAergic transmission. Given that embryonic origin was recently shown to predict GABAergic hub cell fate ⁶, we investigated whether “pacemaker” glutamatergic neurons also originate from specific embryonic time points.

To address the above issues, we studied the postnatal maturation of the network function of single CA3 pyramidal neurons in the absence of fast GABAergic transmission. We used multibeam calcium imaging to analyze online the sequential activation of hundreds of CA3 neurons within the network bursts generated after GABA_A-R blockade. Immature (P7) and juvenile (P15) postnatal stages were compared. Targeted patch-clamp recordings were then performed to assess the network power of individual neurons as a function of their temporal recruitment and to determine their morpho-physiological properties. Inducible genetic fate mapping approaches were used to compare the network involvement of early and late generated glutamatergic neurons. We show that neurons are sequentially recruited into

network bursts according to their temporal embryonic origin, with early generated cells being recruited prior to later generated ones. Moreover, small assemblies of early generated CA3 glutamatergic neurons can trigger network bursts when stimulated at P7, while individual ones can generate similar bursts at P15. In contrast, stimulating late generated neurons has no impact on network dynamics. Additionally, early generated pyramidal neurons segregate in the deeper parts of CA3a/b and display a combination of morpho-physiological features that enables them to be early activated and influence the activity of other neurons. Therefore, the morpho-physiological and functional diversity of glutamatergic neurons is generated in direct relation to their date of birth. Most intriguing, a subpopulation of early-generated pyramidal neurons strengthens the link between functional and effective connectivity during the course of postnatal maturation and can drive the generation of epileptiform events in the absence of fast GABAergic transmission.

Results

In order to measure the development of the contribution of single CA3 pyramidal neurons to network function one needs to be able to simultaneously control the activity of targeted individual neurons, while measuring large-scale spontaneous network dynamics. In the developing hippocampus (P7), this can be achieved using two-photon calcium imaging in combination with electrophysiological recordings². Unfortunately, at juvenile (P15) and adult stages typically only a small fraction of CA3 neurons can be loaded with AM-dyes in slices (less than 25%⁷). This precludes using calcium imaging approaches to reliably monitor network activities in that region. Therefore, the network involvement of single neurons was tested by combining single-cell recordings with: (1) multi-neuron calcium imaging at P7; (2) using extracellular field potential recordings at P15.

A preferred initiation site for CA3 network bursts in the absence of GABAergic transmission

Cells that function in synchronizing neuronal activity are expected to be activated at the onset of spontaneous network events^{2, 5}. In order to identify such cells, we first analyzed in both age groups the spatio-temporal sequences of neuronal activation occurring spontaneously in the CA3 region, in contexts where fast GABAergic signaling is removed through the application of GABA_A-R antagonists (bicuculline 10 μ M, or GABA_Azine 5 μ M). To sample the widest hippocampal area possible and thus describe the activity of several hundred neurons,

we used a low magnification objective (10X, Fig. 1) at P7, and multiple field potential recordings or Microelectrode Arrays (MEAs, Fig. 2) at P15. At P7, spontaneous network bursts occurred on average every 13.7 ± 2.2 s and involved 71 ± 3 % of the imaged cells (n=18 movies). Similar event frequencies were observed at P15. At P7, the dynamic of a single network burst was characterized by a build up of activity lasting on average 575 ± 41 milliseconds (Fig. 1, n = 8 slices).

To reveal if a characteristic pattern of cells was recruited in the build-up period, we identified cells activated within 500 ms prior to the peak of synchrony. Similarity between cell activation patterns was measured using cluster analysis (see methods and ²). We observed that network bursts were characterized by a stereotypical spatio-temporal sequence of neuronal activation that accounted for most of the events occurring within the recording period (77 ± 6 % events, n = 5 slices, Fig. 1). This indicates that the sequences of neuronal activation in the absence of fast GABAergic transmission are almost invariable. In contrast, the network bursts occurring in physiological conditions display more variability since only one third of GDPs occurring within a recording period presented similar dynamics ². Based on the cross-correlation between the firing of cell pairs, for each neuron, we estimated the average correlation and time lag of activation relative to all other cells (Fig. 1, see methods and ²). In all recordings, these time lag-correlation graphs presented a bimodal distribution (Fig. 1) with neurons clustered on the upper left region of the graph being reliably activated during the build up of most network bursts (Early Firing Neurons, EFNs, see Methods, Fig.1) while neurons on the right were activated after (Late Firing Neurons, LFNs, Fig.1). In the low magnification recordings, we found that EFNs preferentially distributed in the CA3a/b region while LFNs were located in peripheral regions (CA1 and CA3c), suggesting that synchronization propagates laterally from the initiation site. Similarly, using MEAs or multiple field potential recordings at P15, CA3a/b was found to be a preferential initiation site (Fig. 2). Indeed, after bicuculline was washed in, MEA recordings of single unit activity indicated that synchronization first appeared in CA3a/b, sequentially followed by CA1 and CA3c with a delay of 9.8 ± 8.4 s and 18.4 ± 9.2 s, respectively (n=5 slices). In addition, once stable conditions of burst generation were reached, field potential recordings indicated that network bursts were initiated on average 4.5 ± 1.1 ms and 7.5 ± 1.2 ms in CA3a/b before CA1 and CA3c, respectively (n=5 slices). We conclude that at all postnatal stages CA3a/b is a preferred initiation site for population bursts occurring in the absence of fast GABAergic transmission.

Neurons are sequentially recruited in network bursts depending on their embryonic date of birth

We next asked whether specific types of cells were activated at particular times of synchronization dynamics. Given that only imaging approaches provide us with the cellular resolution necessary to address this type of question, experiments were first performed at P7. A first series of experiments performed in GAD67-KI mice indicated that GABAergic neurons accounted for a significant fraction of EFNs at P7 ($17 \pm 4 \%$, $n=6$ movies, not shown). However, since fast GABAergic transmission is blocked, we did not explore further the involvement of these cells. Instead, we focused on the differential involvement of glutamatergic neurons.

We have recently shown that early generated GABAergic neurons develop into functional hub cells ⁶, suggesting that the network function of a cell could be partly predetermined by its embryonic origin. We therefore tested in the absence of fast GABAergic transmission, whether Early Generated glutamatergic Neurons (EGNs) versus Later Generated ones (LGNs) were differentially involved in network synchronization. To achieve this aim, we used inducible genetic fate mapping approaches. During development, pyramidal glutamatergic neurons that originate from progenitors located in the dorsal telencephalon express a tightly regulated set of transcription factors including the proneural bHLH transcription factor Neurogenin2 (*Ngn2*). *Ngn2* is transiently expressed in glutamatergic neurons as they are becoming postmitotic. *Ngn2* plays a critical role in the specification of glutamate expression ^{8, 9} as well as in migration ^{10, 11}, acquisition of a pyramidal dendritic morphology ¹⁰, and axonal guidance ¹². We have fate mapped glutamatergic neuron precursors through the use of CreER, a tamoxifen-induced cre recombinase whose expression was placed under the control of the *Ngn2* loci (i.e. a *Ngn2*^{CreERTM} driver line ¹³ crossed with a Cre-dependent EGFP reporter line *RCE:LoxP* ¹⁴). Recombination of the reporter allele is achieved within 24 hours upon administration of tamoxifen, therefore temporally labelling glutamatergic cells as they become postmitotic (see Methods). *Ngn2* is expressed both in neuronal progenitors and early postmitotic neurons in the VZ and SVZ ¹⁰. Temporal precision is due to the fact that *Ngn2* expression is transitory and rapidly downregulated as soon as cells leave the cell cycle and start migrating towards their mature position within the cortical plate ^{10, 15, 16}. Between E11.5 and E16.5 glutamatergic progenitors express *Ngn2* in accordance with their exit from mitosis, hence the timing of *Ngn2* in this population provides a precise proxy indicator of their birthdate ¹⁷. Therefore, by using the *Ngn2*^{CreERTM} driver and *RCE:LoxP* reporter lines and by providing tamoxifen at two separate embryonic time points (early E11-

12 vs. later ones E15-16), we were able to label temporally distinct populations of glutamatergic neurons (EGNs vs. LGNs, see methods).

Only one third of the pups of the gavaged females were positive for GFP. On average 2.5 EGNs and 7.2 LGNs were found in the CA3 region per section (n=53, Fig. 3). The labelling thus obtained was quite sparse as 1 to 3 GFP positive cells could be imaged in the same focal plane as the calcium movie at P7 (n=24 GFP cells, 12 movies, Fig. 4). Immunohistochemical labelling for GFP at P15 and later revealed that EGNs and LGNs tended to localize in different hippocampal and neocortical regions. Interestingly, the layer distribution of GFP positive cells thus obtained in the neocortex matched the well established maturation gradient in this region since EGNs concentrated in deep cortical layers while LGNs populated layers II/III (Fig. 3). Similarly, different spatial distribution patterns could be observed in the hippocampus, with EGNs localized predominantly in the deep pyramidal layers, at the border with the *stratum oriens*, (63%, n=40 slices, 193 cells, Fig. 3) while the majority of LGNs concentrated into the *stratum pyramidale* (69%, n=13 slices, 187 cells, Fig. 3). In addition, almost half of the hippocampal EGNs preferentially distributed in CA3a/b (49%) rather than in CA3c (15%) or CA1 (7%, Fig. 3).

We next compared the distribution of EGNs and LGNs in time-correlation graphs obtained using calcium imaging at P7 as described above. We found that EGNs, in the presence of GABA_A-R blockers, were activated during the build up of network synchronization while the activation of LGNs occurred later (Fig. 4). Indeed, GFP positive cells in tamoxifen-induced *Ngn2*^{CreERTM}/*RCE:LoxP* pups at E11-12 (n=10 GFP cells, 5 movies) or E15-16 (n=14 GFP cells, 7 movies) concentrated on the upper left side and upper right side of time-correlation graphs respectively (p<0.001, Fig. 4). This was clearly revealed by pooling the data from different slices (n = 1789 imaged neurons, 24 GFP cells, 12 movies), as the majority of EGNs clustered on the upper left region of the pooled graph indicating a more reliable activation at the onset of synchronization while LGNs clustered in the region where neurons were activated last (n=10 GFP cells, 5 movies at E11-12, n=14 GFP cells, 7 movies at E15-16, Fig. 4). We therefore conclude that at P7 glutamatergic neurons are differentially recruited in the synchronization process depending on their birthdate; EGNs form a subpopulation of EFNs while LGNs are included in the LFNs group of cells.

Maturation of the morpho-physiological properties of Early Generated and Early Firing glutamatergic neurons

Given that at early postnatal stages, neurons are still immature and within the same slice can show quite varied state of development, we next asked whether EGNs/EFNs could be distinguished from LGNs/LFNs by their morpho-physiological properties. Following analysis of spontaneous calcium dynamics, in the CA3 region of P7 mice, we therefore targeted EFNs (n=22) and LFNs (n=17) for patch-clamp recordings. We also targeted EGNs (n=10) and LGNs (n=8) using GFP fluorescence. Cells were filled with neurobiotin while being recorded and histochemically processed *post hoc* (n=9 EFNs, 6 EGNs, 9 LFNs, 4 LGNs have been reconstructed). First, we observed that EGNs and EFNs displayed similar electrophysiological (n=22 and 10 respectively, $p>0.1$, see Methods) and morphological properties (n=9 and 6, respectively, $p>0.1$, see Methods), further confirming that they form overlapping cell populations. Next, we found that EFNs differed from LFNs in that they presented a higher membrane capacitance (n=22 and 17 neurons respectively, see Table, $p<0.05$). Accordingly, EFNs were morphologically more developed than LFNs since they displayed significantly longer dendrites and axons (n=9 EFNs and 9 LFNs, see Table, $p<0.05$). In addition, the first segment of the apical dendritic tree was significantly longer in EGN/EFNs than in LGN/LFNs ($p<0.05$, Table). A similar anatomical difference was observed in GFP immunofluorescence experiments (Fig. 3). EGNs and LGNs were also patched at P15, in juvenile mice, for morpho-physiological analysis. Except for the length of the first dendritic apical segment, most of the quantitative morphometric differences found at P7 were no longer present at P15 (see Table, n=12 EGNs, 11 LGNs, $p>0.1$). However, most EGNs displayed axonal collaterals ramifying within the stratum lucidum in contrast to LGNs which presented a less ramified axon immediately running towards the alveus (Fig. 5c). In addition, EGNs were more excitable than LGNs, as their resting membrane potential was closer to action potential threshold (n=30 EGNs, and 32 LGNs, $p<0.05$, see Table). We also analyzed the firing evoked in EGNs/LGNs by short suprathreshold current pulses (500ms, 10-150 pA). At P15, almost half of EGNs (52%, n=30 EGNs) displayed bursts of spikes at the onset of the current pulse while significantly fewer LGNs were bursting (20%, n = 32 LGNs, $p<0.05$; Table and Fig. 5).

We conclude that EGNs display distinct morpho-physiological properties both at P7 and P15 that altogether should contribute to their higher propensity to fire at the onset of network synchronisation.

Early Generated glutamatergic Neurons act as “pacemakers” for the generation of synchrony

Given their early activation during synchronization and their advanced maturation, EGN/EFNs could be endowed with a specific network function in the absence of fast GABAergic transmission as early as P7. To test this hypothesis, we targeted and recorded in current-clamp conditions, EFNs (n=19 cells)/EGNs (n=6 cells) or LFNs (n=15 cells)/LGNs (n=4 cells). Similarly to previous work^{3, 18}, we applied a phasic stimulation protocol, i.e. short suprathreshold current pulses repeated at 0.05-0.2 Hz (the frequency range of network events). Cell/network interaction was estimated based on the peristimulus time histogram plotting the occurrences of network bursts within a one second time window following cell stimulation (² see also Methods). A cell was considered as affecting network dynamics if the occurrences of network bursts in the first second following the stimulus was significantly different from chance level (see methods and ²). At P7, the stimulation of a single EFN rarely affected network dynamics: 3/19 EFNs significantly triggered network bursts ($p < 0.05$); for all EFNs, only $8 \pm 1\%$ of the phasic stimulations were followed by a network event within 1 second (Fig. 6a, $p < 0.05$). As expected, LFNs neither impacted on network dynamics when stimulated: only 2/15 LFNs significantly triggered network bursts with $9 \pm 2\%$ of all stimulations followed by a network burst within 1 second, i.e. within the chance level (Fig. 6a, $p < 0.05$). In line with the above results, neither GFP-positive EGNs (n=6) nor LGNs (n=4) significantly affected the network dynamics when stimulated at P7 (data not shown).

Next, we hypothesized that the simultaneous activation of more than one EGN/EFN could be required to exceed a threshold frequency of synaptic or cellular activity that will lead to burst generation⁴. To test this, we simultaneously activated small groups of EFNs using targeted LASER photostimulation to uncage MNI-glutamate (200 μ M). We compared multiple EFN vs. LFN stimulations within the same slice. Neurons were targeted based on their time of activation during network synchronization (i.e. EFN vs. LFN) rather than based on their developmental origin because as previously stated, too few GFP positive EGNs can be simultaneously imaged within the same network. We observed that multiple stimulations (3 cells on average) of EFNs could more efficiently trigger network bursts than stimulating the same number of LFNs (bursts time-locked to the stimulation could be triggered in $41 \pm 11\%$ vs. $24 \pm 9\%$ of the trials, n= 10 slices, $p < 0.05$, Fig. 6b). We considered as network bursts the peaks of significant neuronal coactivation that involved a similar fraction of cells during stimulation and control. However, we observed that photostimulation could also trigger local neuronal coactivations of small amplitude in the spatial vicinity of stimulated cells (Fig. 6);

these small synchronizations were more reliably triggered by EFNs than LFNs (in $62 \pm 9\%$ vs. $47 \pm 10\%$ of the trials, $n=10$ slices, $p<0.001$). Therefore, in the developing hippocampus (P7), the coactivation of small EFN/EGNs assemblies can trigger network bursts whereas single-cell stimulation does not provide enough excitation to the network.

The picture was different in juvenile mice (P15) since single-cell electrical stimulation of more than half of EGNs (5/9 cells) significantly triggered network bursts within one second following the stimulation (with $25 \pm 7\%$ of all stimulations followed by a network event, $n=9$, $p<0.05$, Fig. 6a). In contrast, only 1/12 LGNs significantly triggered network events ($p<0.05$), with $7 \pm 2\%$ of all LGNs stimulations followed by a network event within 1s. Note that even when considering the time period between one and two seconds after stimulation, the fraction of network events occurring within that period was also significantly higher for EGNs than for LGNs ($16 \pm 3\%$ and $8 \pm 2\%$, $n=9$ and 12 respectively, $p<0.05$, Fig. 6a).

We conclude that the threshold of excitation necessary for the generation of network bursts can be provided by a subpopulation of early generated and early firing glutamatergic neurons functioning as a small assembly in the developing hippocampus (P7) and later gaining a single-cell “pacemaker” function after juvenile stages.

Discussion

We found a functional subpopulation of CA3 pyramidal cells originating from the early stages of glutamatergic cell embryogenesis, enriched in the deeper parts of CA3a/b and endowed with distinct morpho-physiological properties. These findings confirm recent results suggesting functional heterogeneity of the principal cell population¹⁹ and indicates that early embryonic origin is a common attribute of the previously described “pacemaker” cell population⁵. These cells first operate as assemblies, in the developing hippocampus, and later become powerful single units capable of triggering network synchronization in the absence of fast GABAergic transmission. Therefore, the fact that “early-born” cells are central nodes in the functional organization of hippocampal networks (⁶ and present work) may well be a general principle albeit with important differences between GABAergic and glutamatergic neurons, the former but not the latter exerting their roles at an early developmental stage⁶. We propose that the temporal origin of neurons is a critical determinant of single-cell function that impacts the developmental sequence of physiological and pathological network dynamics.

Principal neurons are classically viewed as a fairly homogeneous cell population compared to their GABAergic partners which are typically defined by their morphological, chemical and electrophysiological diversity. It is now well established that the heterogeneity of interneuron subtypes lies in their different spatio-temporal embryonic origins²⁰. With some exceptions²¹, most cortical glutamatergic neurons share a common spatial origin, the ventricular zone of the pallium. However, we show here that the distinct temporal origin of EGNs confers them specific morpho-physiological features which could indicate that they constitute a distinct subpopulation of pyramidal cells. These distinct properties include: a specific regional and radial soma location, a longer primary dendrite, a denser axonal innervation of the stratum lucidum, a membrane potential closer to threshold and a higher propensity to generate spike bursts. It is now increasingly evident that principal cells display a high degree of genetic²², molecular^{23, 24}, morphological²⁵, electrophysiological²⁶ and functional diversity^{19, 27-30} (see³¹ for review). Interestingly, most of these properties segregate between deep and superficial pyramidal cell layers. In addition, most of the distinct features of EGNs listed above had already been previously reported for hippocampal principal neurons. For example, it was previously shown that bursting CA3 pyramidal cells were more frequently located at the border with stratum oriens and that they displayed a longer primary apical dendrite³², two properties that we now found associated with early generated pyramidal cells.

Our results show that “early-born” pyramidal neurons can single-handedly synchronize neuronal activity when stimulated in the absence of fast GABAergic transmission at juvenile stages. How does this correlation between embryonic origin and network power operate? This is unlikely to result merely from a maturation difference since, at P15, most CA3 pyramidal cells have acquired a similar set of morpho-physiological features. It is also unlikely that a difference in intrinsic excitability plays a determinant role on its own. Admittedly, EGNs display specific intrinsic properties that make them likely to be efficiently activated at the onset of synchronization processes and to reliably activate other neurons. Thus, their resting membrane potential is closer to spike threshold and they tend to fire in bursts, a property playing a primary role in reliable transmission of electrical signals³³ and frequently attributed to principal cells with a putative pacemaker function^{5, 34, 35} and more recently to CA1 place cells³⁰. However, the proportion of bursting EGNs was highest at early postnatal stages, when they failed to trigger synchronization when stimulated alone.

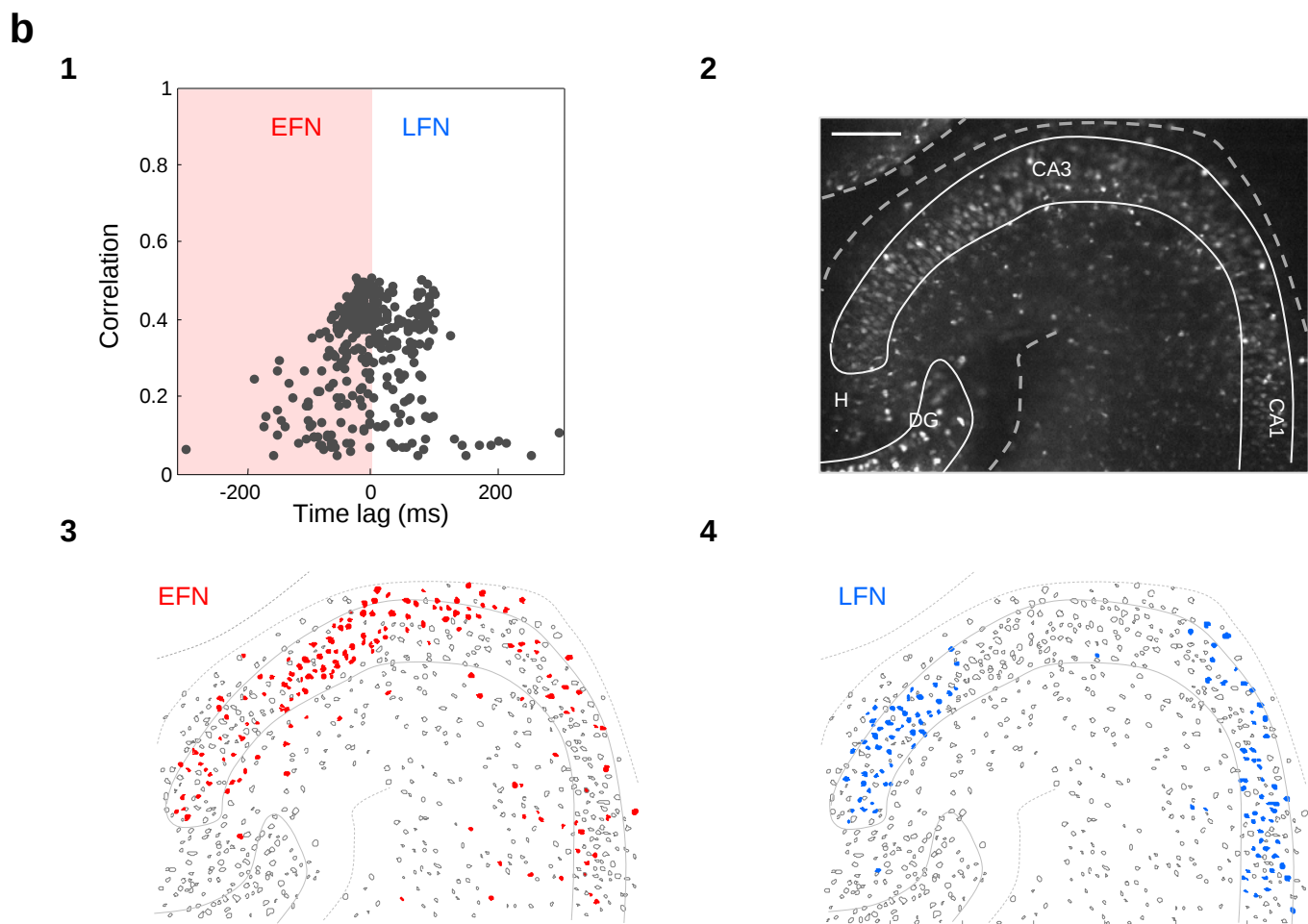
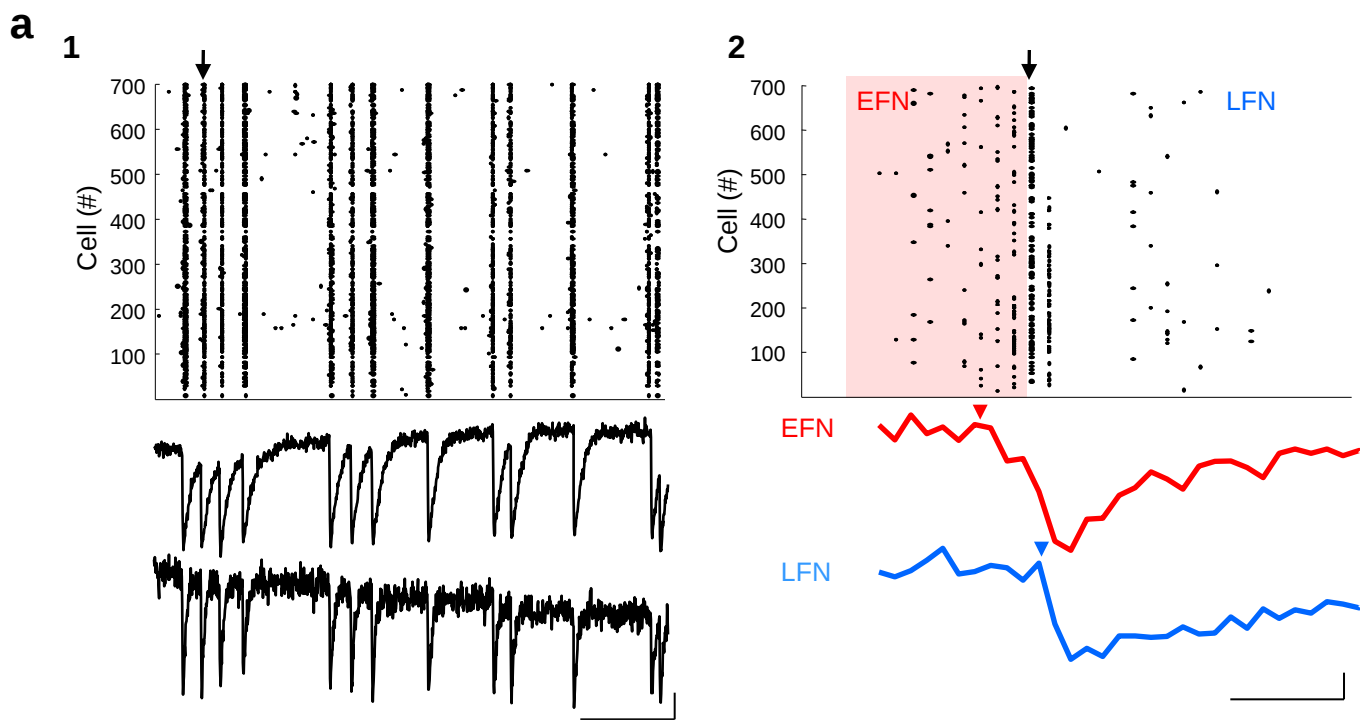
Taken together, previous work, as well as present findings indicates that functional excitatory interactions are likely to be the most instructive parameter for the function of early generated/firing principal cells. Indeed, it was shown that, in the absence of fast GABAergic transmission, hippocampal network bursts are initiated only when a threshold frequency of synaptic or cellular activity is exceeded⁴. Accordingly, the simultaneous activation of at least two EFNs reaches that threshold at immature stages whereas stimulating one cell is sufficient at later timepoints, presumably when the density of connectivity is adequate. The selective ability of EFN/EGN cells to generate such significant activity rise is also likely to originate from their denser collateral innervation in the stratum lucidum. Notably, EGNs are likely to form an interconnected network given that a “temporal matching rule” was recently uncovered by which early populations of hippocampal principal cells have a higher chance to connect to each other³⁶. Whether the presently described EGN population makes functional reciprocal connections is difficult to address at present, given the low density of GFP labelled cells per slice. From a developmental point of view, the mechanisms by which early connections are made is still unknown. Interestingly, molecular cues linking temporal identity with the development of axonal projections have been discovered³⁷. Moreover, it was recently established that *Ngn2* itself contributed to the specification of axonal projections in projection neurons^{12, 38}. It may also well be that related to their common origins, these cells display electrotonic interactions via gap junctions that would contribute to activity synchronization³⁹. However, we do not have at present any evidence in favour of this hypothesis, even though similar cell types are more likely to be gap-junction connected.

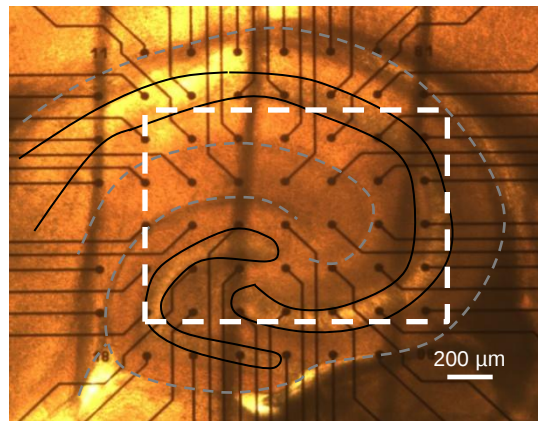
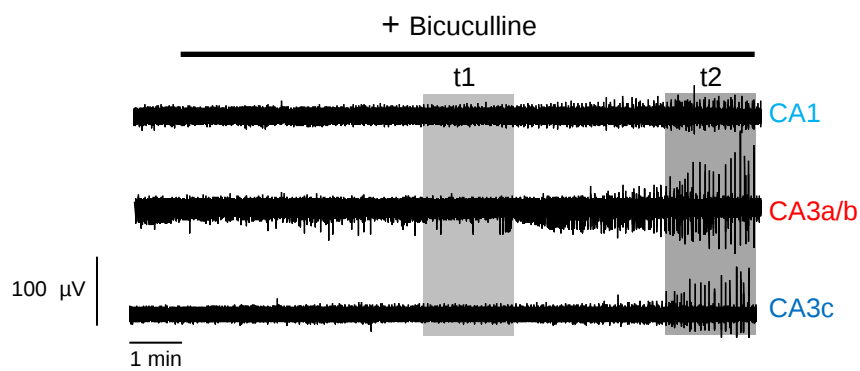
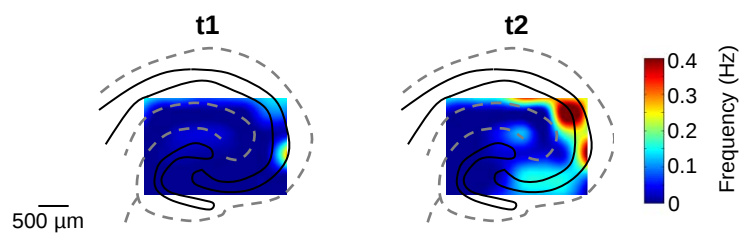
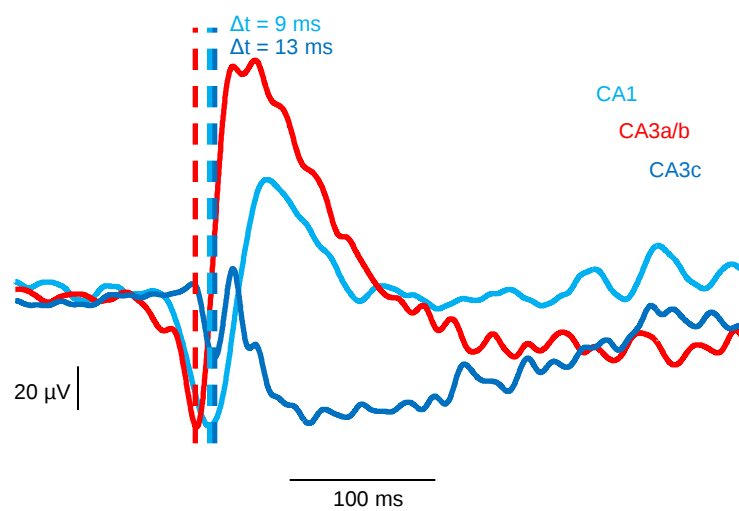
What would be the functional consequence of this regionalization of hippocampal principal layers into functionally and developmentally matched subnetworks? The CA3 region of the hippocampus is a critical structure in the initiation and maintenance of several physiological network dynamics, including gamma oscillations⁴⁰ and sharp waves⁴¹. In addition, it was recently shown that neurons located in the deeper parts of the pyramidal layer (in the CA1 region) were more likely to display place fields, theta phase-modulation strength during REM sleep, modulation by slow oscillations and sharp wave ripples during non REM sleep and gamma phase preference during wake state¹⁹. Within CA3, it is well documented that the CA3a/b subregions are particularly prone to the initiation of network events. For example, it was shown that during sharp wave ripple events neurons in the CA3a/b discharged first followed by CA3c and CA1⁴². Hence, early-generated glutamatergic neurons, that we found preferentially located in the deeper parts of CA3a/b may be selectively implicated in the generation of various physiological oscillations.

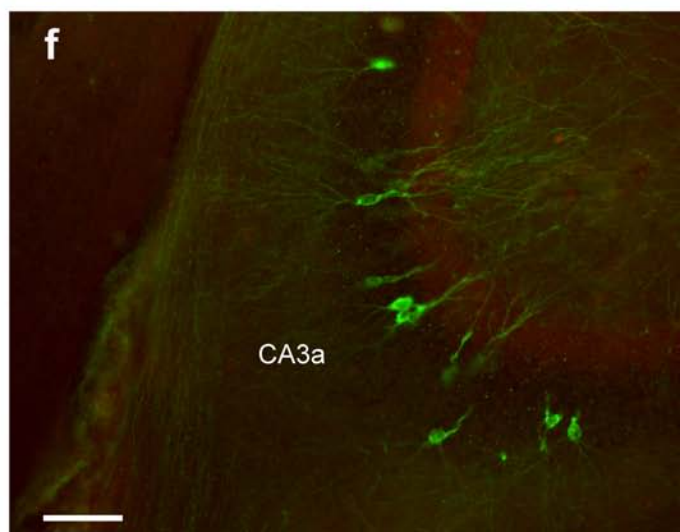
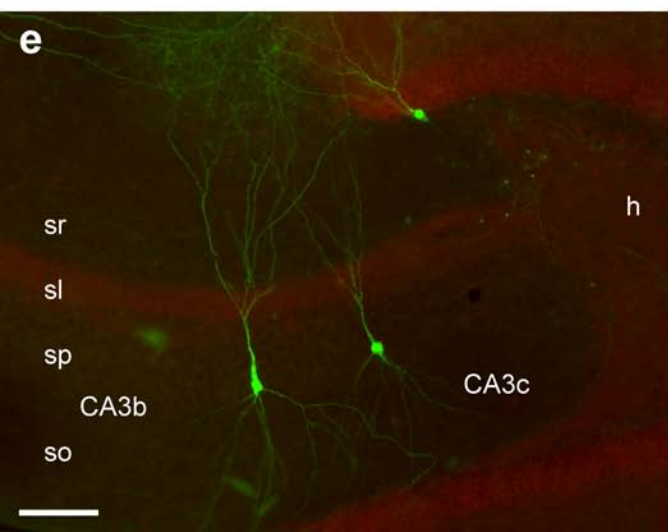
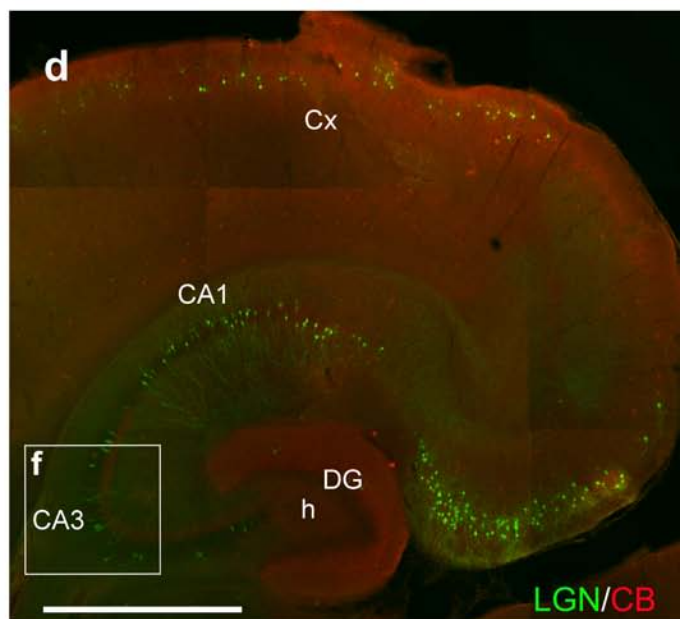
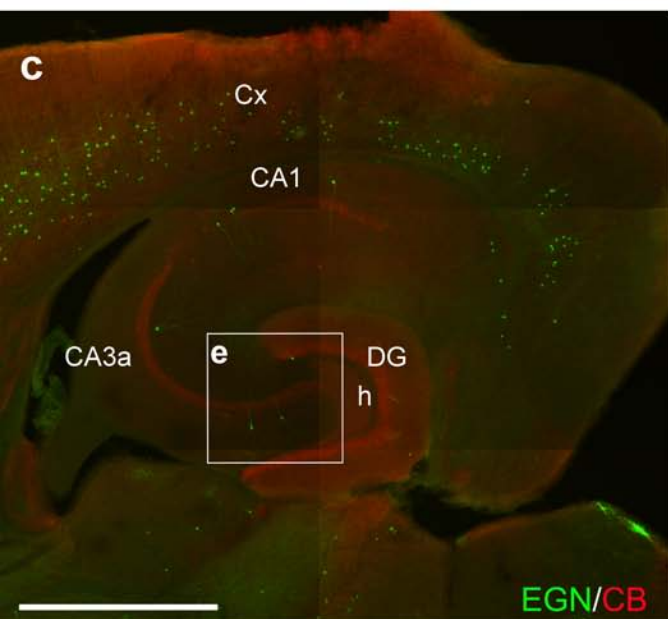
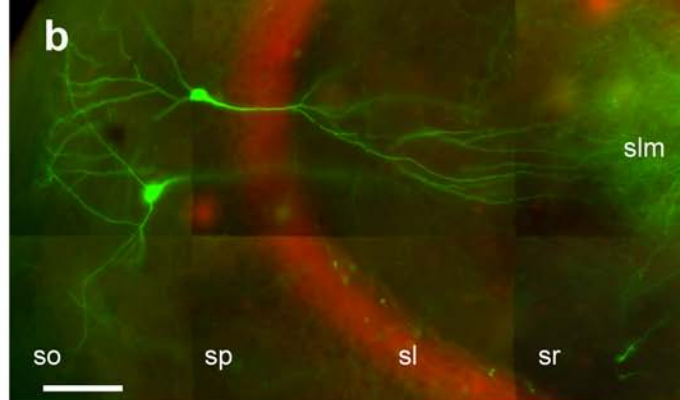
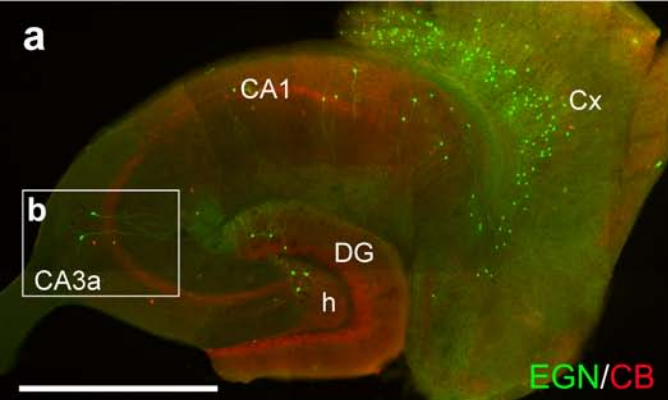
The present finding may also be interpreted from the perspective of pathology because the network bursts controlled by EGNs, generated when GABAergic signalling is blocked, are traditionally considered to model epileptiform synchronization^{5, 43-45}. Yet, there is now good evidence that synchronised activities generated in these conditions bear only partial relevance to epilepsies. Indeed, epileptogenesis is associated with network remodelling including differential cell vulnerability and axonal sprouting. Hence, in chronic epileptic networks, GABAergic transmission is not completely silent and sometimes even boosted⁴⁶. In addition, at early postnatal stages, interictal events produced in the presence of GABA_A receptor antagonists fail to transform a naïve network into a chronically epileptic one⁴⁷. Therefore blockade of fast inhibition in naïve hippocampal slices is probably more relevant to the understanding of network synchronization per se. In any case, it will be interesting to test whether EGNs survive epileptogenesis, and participate in network synchronization, in chronic animal models of epilepsy. It is in fact possible that neurons will be differentially vulnerable to pathological insults according to their temporal origin⁴⁸. If spared, given their higher firing propensity, EGNs could be activated at the onset of various epileptiform events, for example during the recently described pre-ictal glutamatergic discharges emerging at the transition to seizure in slices from human epileptic patients⁴⁹. In that case, small assemblies of EGNs could together preferentially participate in the expression of pathological activity patterns.

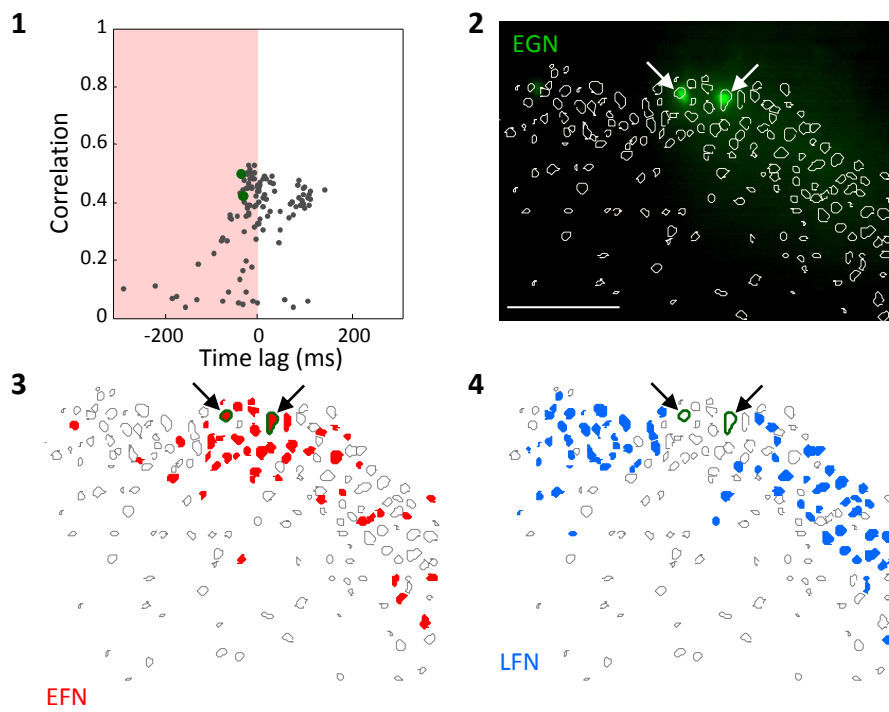
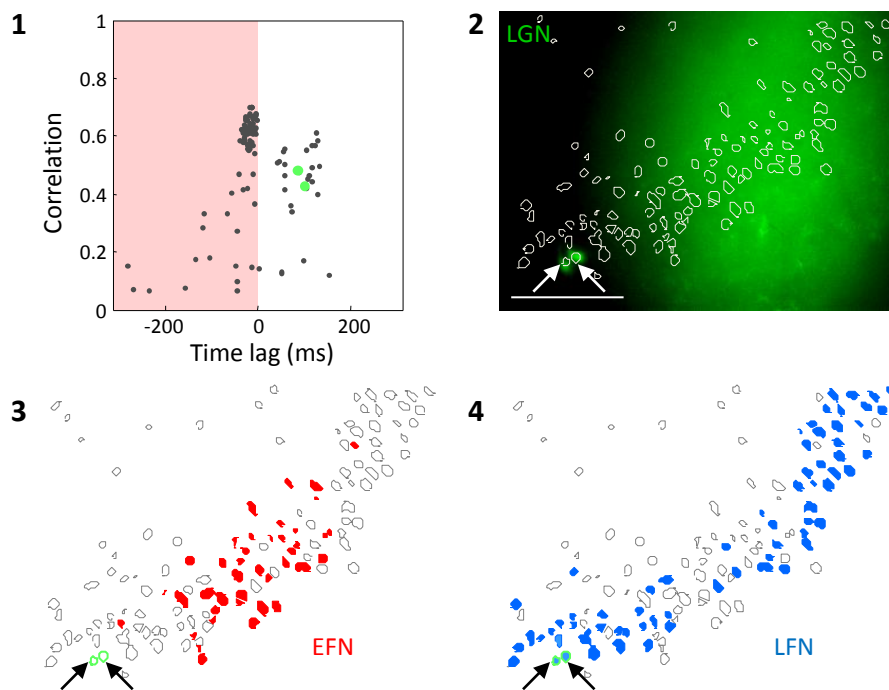
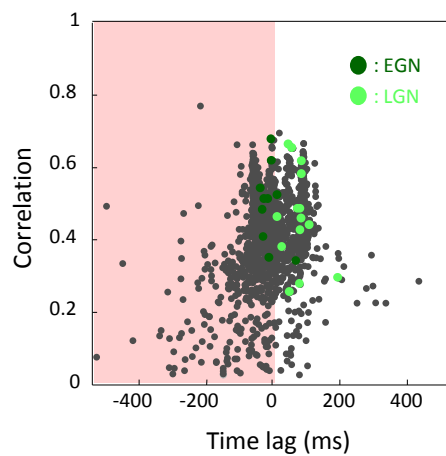
Acknowledgments

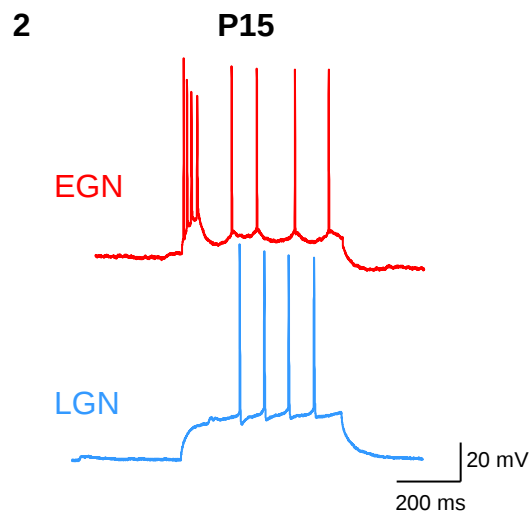
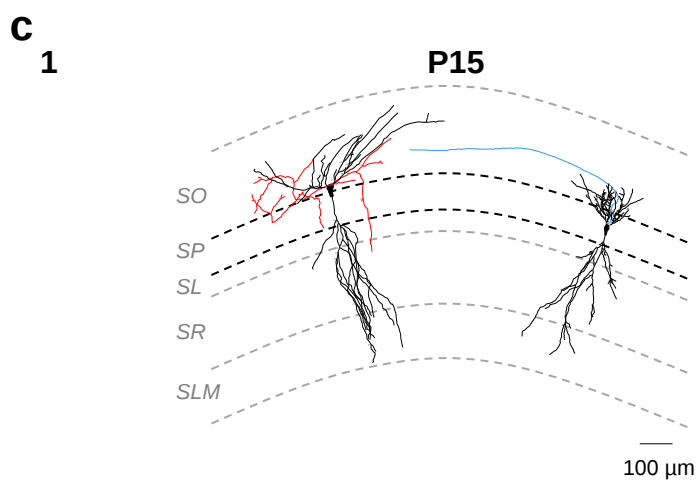
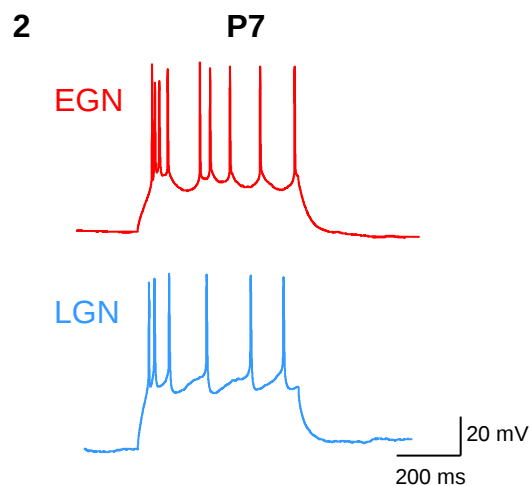
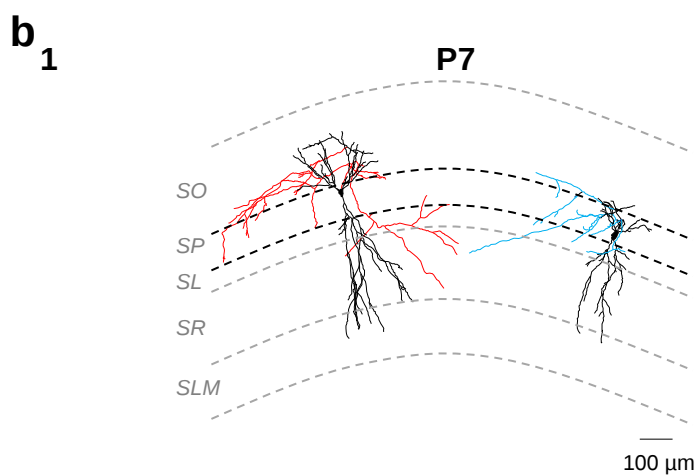
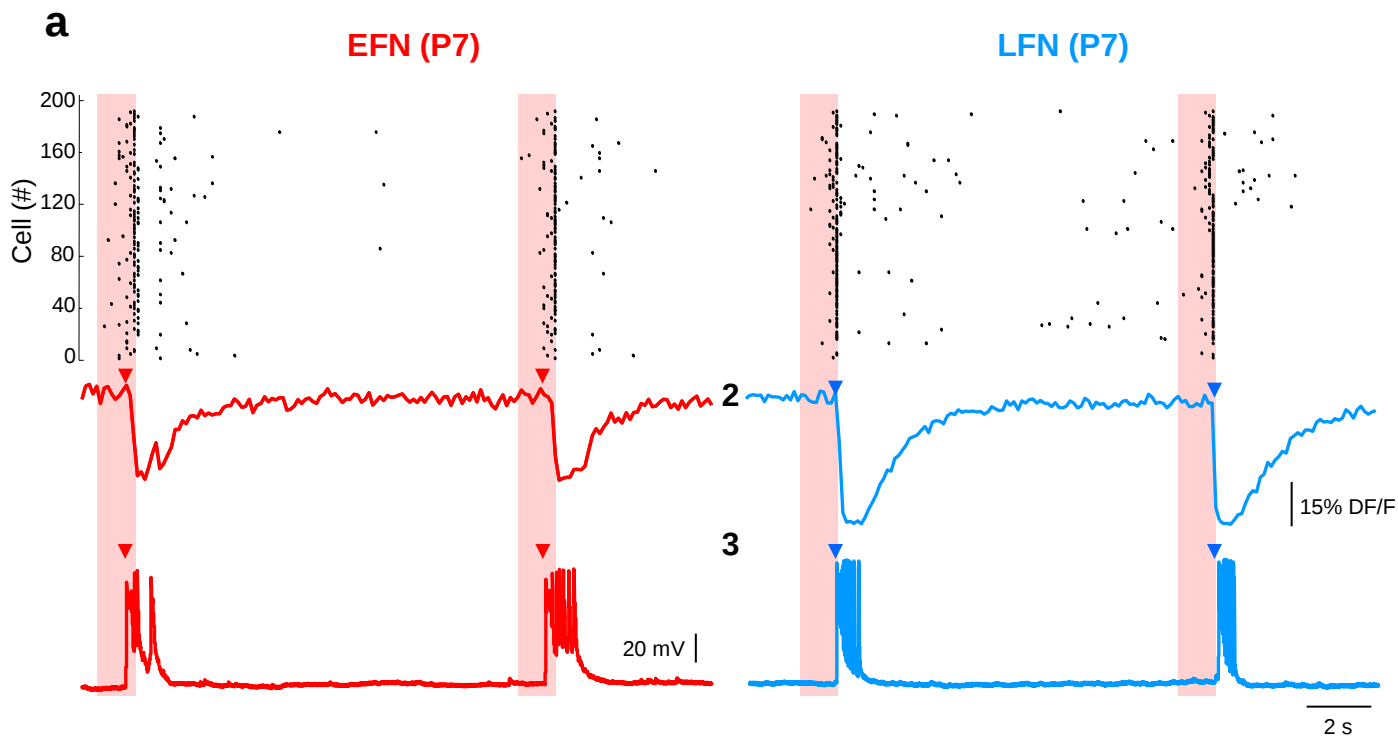
We thank Pr. David Anderson for providing the *Ngn2*^{CreERTM} mouse. We thank Corinne Bouchoud, Sherihane Bensemmane, Alexandre Jaouen, Philippe Guigue and Thomas Tressard for help with the experiments and analysis. Research in the Cossart group was supported by grants from the European Research Council (ERC FP7 Young Investigators #242852), the Fondation pour la Recherche Medicale (F.R.M.), the Fondation Bettencourt Schueller, I.N.S.E.R.M., the Ville de Marseille and Region P.A.C.A. and the F.R.C. Drs. R. Cossart and A. Baude are funded by the C.N.R.S. T. Marissal was funded by a fellowship from the Ministère de l'Education Nationale et de la Recherche and the F.R.M. Research in the Fishell laboratory is supported by the National Institutes of Health (NIH RO1 grants R01MH071679 and R01NS039007).



a**b****c****d**



a**b****c**



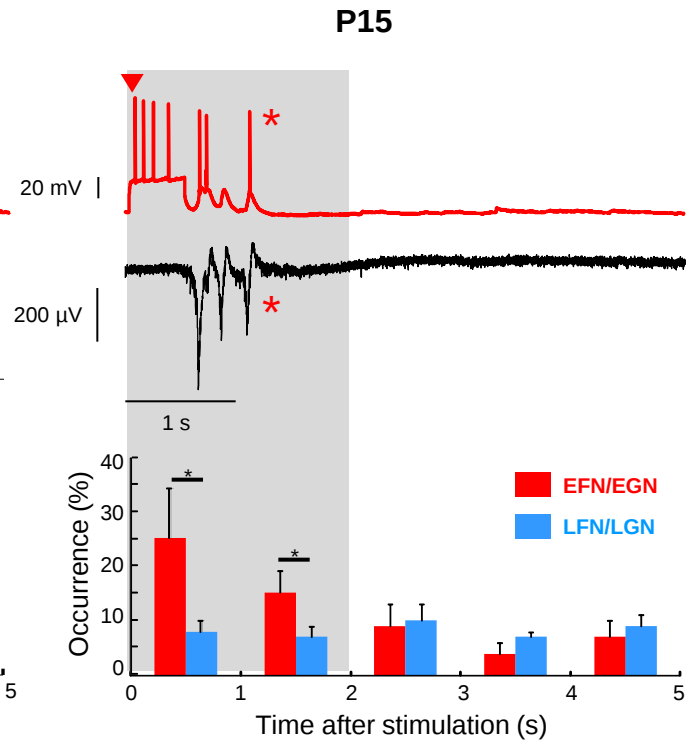
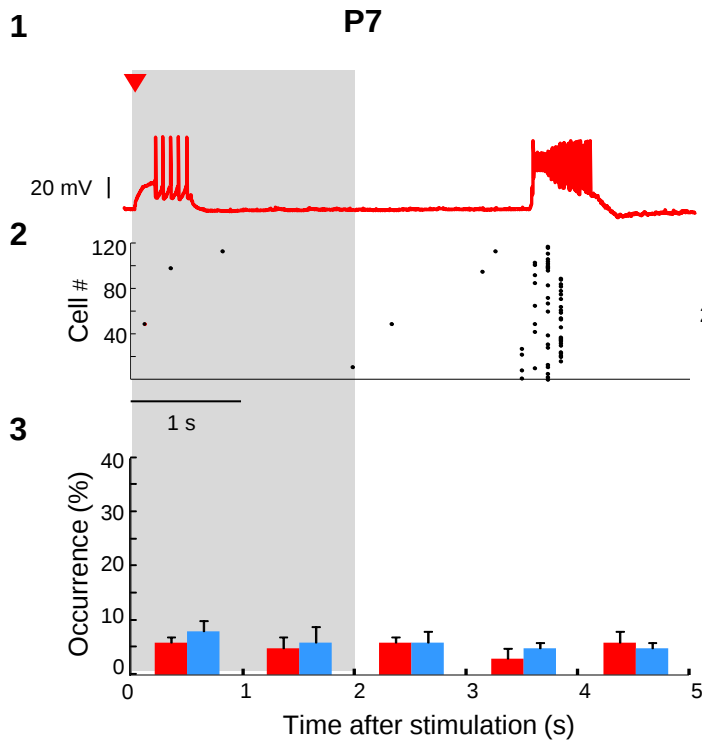
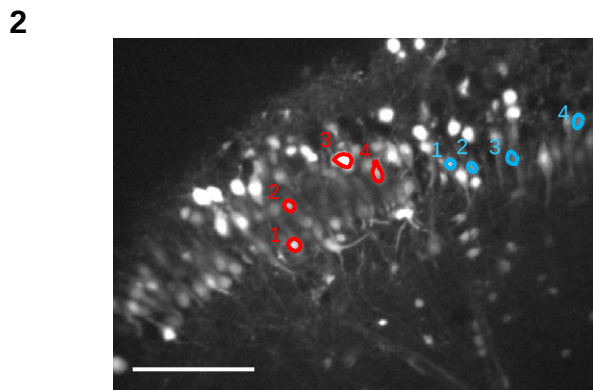
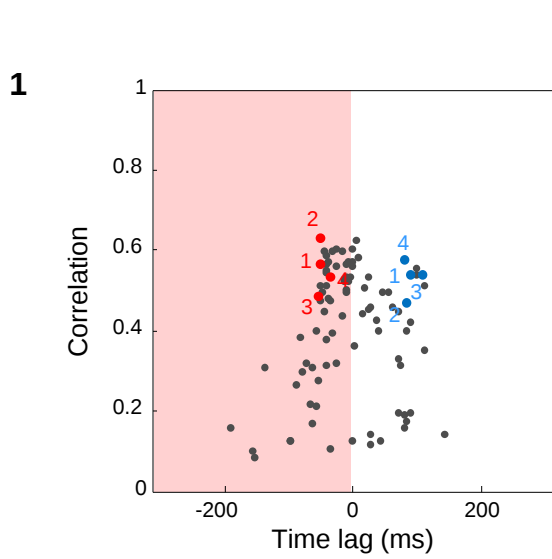
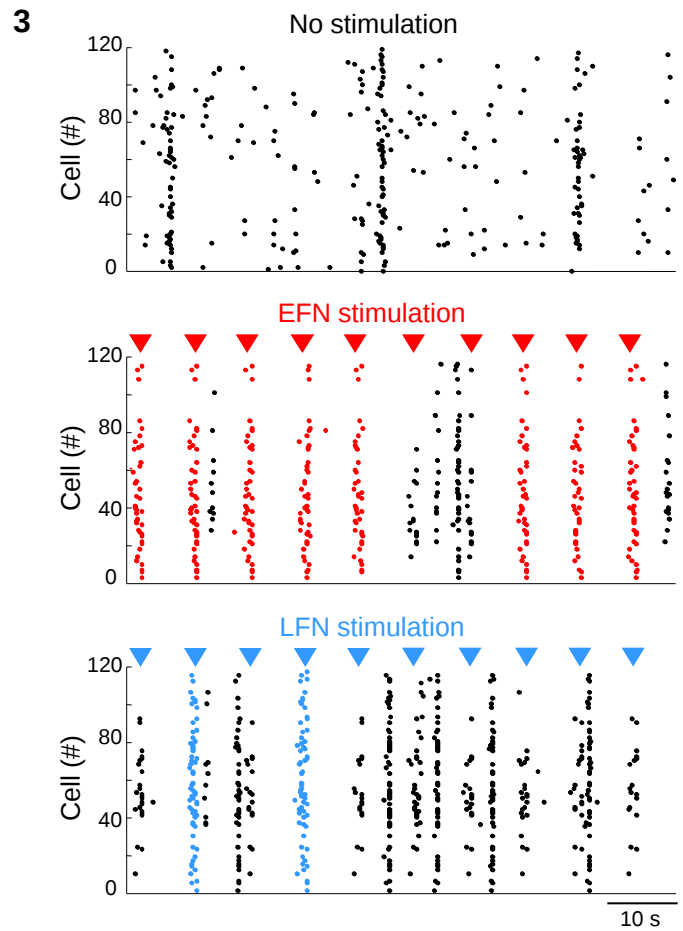
a**b****P7**

Figure legends

Figure 1. Spatio-temporal network dynamics in the absence of fast GABAergic transmission in the developing CA3 region. **a. 1.** Rasterplot of the calcium event onsets as a function of time for every neuron imaged in the presence of bicuculline (10 μ M) in a P7 mouse hippocampal slice loaded with Fura-2AM and recorded with two-photon multibeam excitation at $\times 10$ magnification. Bottom traces show two representative calcium fluorescence traces from two cells in the network. Scale bar: X axis: 30 s, Y axis: 10% DF/F. **2.** Rasterplot showing the temporal recruitment of the neurons involved in a representative network burst (marked by an arrow in (1)). Orange area indicates the time of activation of Early Firing Neurons (EFN) while white area indicates that of Late Firing Neurons (LFN). Arrow indicates the peak of maximum cell coactivation. Two examples of calcium fluorescence changes occurring in an EFN (red) and a LFN (blue) during that event are illustrated below. Scale bar: X axis: 1 s, Y axis: 10% DF/F. **b. 1.** Time lag-correlation graph plotting for each imaged neuron (729 neurons) the average correlation and average time of activation relative to all other cells for all network bursts within a recording session (12 events). The peak of maximum cell coactivation (arrow in a2) was used as the zero time reference. **2.** Two-photon calcium fluorescence image of the recorded network. Scale bar: 100 μ m. **3.** Contour plot of the cells imaged in (2). Red filled contours indicate EFNs. **4.** Same as (3) with LFNs filled in blue.

Figure 2. Spatio-temporal network dynamics in the absence of fast GABAergic transmission in the juvenile CA3 region. **a.** Photomicrograph from a P15 mouse hippocampal slice recorded with a microelectrode array (MEA). Dashed rectangle indicates region of interest. **b.** Simultaneous extracellular recordings of multiunit activity from electrodes localized at the border of CA3a/CA1 regions (top), in CA3a/b (middle) and in the CA3c region (bottom). **c.** Color coded spatial representation of the regions activated at the two successive time windows indicated by grey rectangles in b. Red indicates the most active regions while areas in blue are inactive. **d.** Simultaneous triple field potential recordings of a single network burst recorded at three different locations (CA1 (light blue), CA3a/b (red) and in CA3c (dark blue)). In the absence of GABA_A-R-mediated transmission, network bursts are first generated in the CA3a/b region.

Figure 3. Distribution of early (EGN) and late generated (LGN) glutamatergic neurons in the hippocampus of adult mice. Fate-mapped neurons are visible in the hippocampus and

neocortex after GFP and calbindin (CB) immunofluorescence detections (green and red, respectively) in *Ngn2CreERTM;RCE:LoxP* mouse slices. EGNs are relatively sparse in the hippocampus (**a** and **c**, tamoxifen gavage at E12) in comparison to LGNs (**d**, tamoxifen gavage at E15) throughout the CA1 and CA3 areas of the hippocampus. Early generated pyramidal cells are preferentially localized in the deeper part of the *stratum pyramidale* (sp) of CA3a (**b**), but also in CA3b/c (**e**) while LGNs are distributed throughout the radial width of the *stratum pyramidale* (**f**). Note that EGNs populate the deeper layers of the neocortex (Cx) while LGNs are present in superficial layers. so: *stratum oriens*, sr: *stratum radiatum*, sl: *stratum lucidum*, slm: *stratum lacunosum moleculare*. Scale bars: 1000 μ m in **a**, **c** and **d**; 100 μ m in **c**, **e** and **f**.

Figure 4. Glutamatergic neurons are differentially recruited in the synchronization build up in the absence of fast GABAergic transmission according to their age. a. 1. Time-lag correlation graph plotting for each imaged neuron (gray points) the average correlation and average time of activation relative to all other cells for every network burst occurring in the CA3 region of a P7 *Ngn2CreERTM;RCE:LoxP* mouse hippocampal slice (tamoxifen treated at E12). Dark green circles indicate GFP-positive Early Generated Neurons (EGN). Note that they are both located in the EFN region (orange). **2.** Photomicrograph of the region analyzed in (1). Arrows indicate the two GFP-positive EGNs. Scale bar: 100 μ m. **3.** Contour map plotting the spatial distribution of imaged neurons. Early Firing Neurons (EFNs) are red filled contours. GFP-positive EGNs are outlined in dark green. **4.** Same as (3) for blue-filled Late Firing Neurons (LFNs). **b.** Same as (a) but in a P7 *Ngn2CreERTM;RCE:LoxP* mouse hippocampal slice (tamoxifen treated at E16). Light green circles indicate GFP-positive Late Generated Neurons (LGN). **c.** Pooled time correlation graph for all experiments (n=12 movies). Dark green circles indicate EGNs while LGNs are marked in light green.

Figure 5. Early and late-firing pyramidal neurons displays distinct morpho-physiological properties at P7. a. Simultaneous calcium imaging and patch-clamp recording of Early Firing Neurons (EFN, red) and Late Firing neurons (LFN, blue) in the CA3 region of a P7 mouse slice. Top rasterplots indicate the fraction of active cells as a function of time. In both cases, two network bursts are recorded. Arrows indicate the activation onsets of the EFN (red) and LFN (blue). Middle traces illustrate the calcium fluorescence changes in EFNs and LFNs and bottom traces show the simultaneous membrane potential changes recorded in current clamp mode at resting membrane potential ($I \sim 0$ pA) in the EFN (red) and LFN (blue).

b. 1. Neurobiotin-filled EFN (red) and LFN (blue), recorded in the CA3 region of P7 mice, and reconstructed with Neurolucida software. Neurons are placed on a schematic representation of the CA3 region. Axons are in color, dendrites and soma in black. Note that the EFN displays a more developed dendritic and axonal arborization, and is located closer to the stratum oriens than the LFN. Scale bar: 100 μ m, SO: *Stratum Oriens*, SP: *Stratum Pyramidale*, SL: *Stratum Lucidum*, SR: *Stratum Radiatum*, SLM: *Stratum Lacunosum Moleculare*. **2.** EFN (red) and LFN (blue) firing responses at P7 to a positive current injection. Note that both cells display a bursting firing pattern. **c.** Same as above, but at P15. Neurons are recorded based on GFP-labelling in tamoxifen treated *Ngn2CreERTM;RCE:LoxP* mice at E12 for EGNs and E16 for LGNs. EGN and EFN morphologies remain different. In addition, EGNs still display a bursting firing pattern at P15 whereas LGNs do not (c2).

Figure 6. Early Generated glutamatergic Neurons, operating as small assemblies at P7 and single-handedly at P15, act as “pacemakers” for the generation of synchrony.

a. Simultaneous network and single cell recordings of EFNs at P7 (left) and EGNs at P15 (right). **1.** Cells were recorded in current clamp at resting membrane potential and stimulated with suprathreshold current injections (arrow indicates stimulation). **2.** Network activity was simultaneously recorded using calcium imaging at P7 (left rasterplot of cell activation as a function of time), or extracellular electrodes at P15 (right). At P15 single cell stimulation triggers network bursts (marked by *). **3.** Pooled data histograms plotting the averaged distribution of network bursts within a 5 seconds time window following stimulation of a single EFN/EGN (red) or LFN/LGN (blue) (n=19 EFN/9EGN, n =22 LFN/12LGN). **b. 1.** Time correlation graph obtained from the analysis of a movie taken in the absence of fast GABAergic transmission in the CA3 region of a P7 mouse slice. Colored points in the graph indicate the four stimulated EFNs (red) and LFNs (blue). **2.** Calcium fluorescence image of the recorded region. Outlined contours indicate the location of the four stimulated EFNs (red) and LFNs (blue). Scale: 100 μ m. **3.** Rasterplots of cell activation as a function of time in the presence of bicuculline (10 μ M) and MNI-glutamate (200 μ M), before stimulation (top), during stimulation of the four EFNs (middle), and during stimulation of the four LFNs (bottom). The top arrows indicate the times of light stimulation (10 stimulations in each case). Network bursts that were time-locked to light stimulations are highlighted in color.

Table. Comparison of the morpho-physiological properties of EFNs and LFNs at P7, and EGNs and LGNs at P15. ΔV : difference between resting membrane potential and

action potential threshold. EPSP: Excitatory PostSynaptic Potential, Cell body position: percentage of cells within the deepest half of the *stratum pyramidale* close to the *stratum oriens*. Asterisks indicate significant differences between EFNs and LFNs or EGNs and LGNs. $p < 0.05$ was considered significant. p value is given by Fisher, Student or Mann-Whitney tests.

Table.

	P7		P15	
	EFN	LFN	EGN	LGN
Electrophysiological properties				
Capacitance (pF)	166,3 ± 22,7 (n=22)*	101,2 ± 10,3 (n=17)	171,4 ± 15,2 (n=30)	164,6 ± 13,7 (n=32)
ΔV (mV)	-25,4 ± 4,0 (n=22)	-27,9 ± 3,3 (n=17)	-14,4 ± 2,7 (n=30)*	-24,4 ± 3,2 (n=32)
Input resistance (MΩ)	698 ± 40 (n=22)	774 ± 90 (n=17)	289 ± 24 (n=30)	315 ± 36 (n=32)
EPSP Amplitude (mV)	2,13 ± 0,26 (n=6)	2,03 ± 0,29 (n=5)	2,17 ± 0,23 (n=11)	1,89 ± 0,22 (n=17)
EPSP Frequency (Hz)	1,37 ± 0,49 (n=6)	1,18 ± 0,36 (n=5)	3,9 ± 0,6 (n=11)	4,6 ± 0,5 (n=17)
% of Bursting Cells	71 % (n=22)	69 % (n=17)	52 % (n=30)*	20 % (n=32)
Morphological properties				
Axons				
Length (μm)	2825 ± 389 (n=9)*	1877 ± 264 (n=9)	N/A	
Number of nodes	16,2 ± 2,95 (n=9)*	8,3 ± 1,86 (n=9)	N/A	
Dendrites				
Number	5,6 ± 0,57 (n=9)	5,7 ± 0,79 (n=9)	6,4 ± 0,73 (n=12)	5,3 ± 0,6 (n=11)
Total Length (μm)	3661 ± 486 (n=9)*	2337 ± 542 (n=9)	4835 ± 920 (n=12)	4813 ± 736 (n=11)
Primary Dendrite Length (μm)	49,4 ± 12,2 (n=9)*	16,7 ± 4,2 (n=9)	34,9 ± 3,6 (n=12)*	22,6 ± 1,7 (n=11)
Number of nodes	27,9 ± 4,1 (n=9)	30,4 ± 7,8 (n=9)	27,3 ± 5,1 (n=12)*	46,6 ± 5 (n=11)
Cell body				
Position	63 % (n=9)*	11 % (n=9)	63 % (n=12)*	38 % (n=11)
Area (μm ²)	273,1 ± 48,6 (n=9)	250,9 ± 37,9 (n=9)	345,2 ± 69 (n=12)	297,3 ± 72 (n=11)

Methods

Mice for inducible genetic fate mapping

All animal use protocols were performed under the guidelines of the French National Ethic Comity for Sciences and Health report on “Ethic Principles for Animal Experimentations” in agreement with the European Community Directive 86/609/EEC.

Double-homozygous *Ngn2*^{CreER/CreER}/*RCE:LoxP*^{+/+} ^{13, 50} male mice were crossed with 7- to 8-week-old wild-type Swiss females (C.E Janvier, France) for offspring production. To induce CreER activity, we administered a tamoxifen solution (Sigma, St. Louis, MO) by gavaging (force-feeding) pregnant mice with a silicon-protected needle (Fine Science Tools, Foster City, CA). We used 2mg of tamoxifen solution per 30g of body weight prepared at 10 mg/ml in corn oil (Sigma). Pregnant females crossed with *Ngn2*^{CreER/CreER}/*RCE:LoxP*^{+/+} males were force-fed at embryonic days 11-12 to 15-16 days post vaginal plug (corresponding to the embryonic ages E11-E16) in order to label *Ngn2*-expressing precursors with GFP in the embryos. For simplification purposes GFP expressing mice pups originating from these gavaged females are named tamoxifen-treated *Ngn2*^{CreERTM}/*RCE:LoxP*.

Slice preparation and calcium imaging

Horizontal hippocampal slices (400 μ m thick) were prepared from 6 to 8-days-old (P6-8) or 14-20-days-old (P14-20) wild-type or tamoxifen-treated *Ngn2*^{CreERTM}/*RCE:LoxP* (n=146 slices) mouse pups with a Leica VT1200 S vibratome using the Vibrocheck module in ice-cold oxygenated modified artificial cerebrospinal fluid (0.5 mM CaCl₂ and 7 mM MgSO₄; NaCl replaced by an equimolar concentration of choline). Slices were then transferred for rest (1 hr) in oxygenated normal ACSF containing (in mM): 126 NaCl, 3.5 KCl, 1.2 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 1.3 MgCl₂, 2.0 CaCl₂, and 10 D-glucose, pH 7.4. 62 slices were used for electrophysiological recordings only, 40 for imaging only, and 44 for simultaneous imaging and electrophysiological recordings.

For Fura2-AM-loading, slices were incubated in a small vial containing 2.5 ml of oxygenated ACSF with 25 μ l of a 1 mM Fura2-AM solution (diluted in 95% DMSO and 5% pluronic acid mix) for 20–30 min. Slices were incubated in the dark, and the incubation solution was maintained at 35-37°C. Slices were perfused with continuously aerated (3 ml/min; O₂/CO₂-95/5%) normal ACSF at 35-37°C. Imaging was performed with a multibeam multiphoton pulsed IR LASER (Coherent) scanning system (LaVision Biotech) coupled to a microscope as previously described ⁵¹. Images were acquired through a CCD camera, which typically resulted in a time resolution of 50 to 150 ms per frame. Slices were imaged using a 20X, NA-

0.95 objective (Olympus) or 10X NA-0.30 (Olympus). Imaging depth was on average 80 μm below the surface (range: 50-100 μm).

Electrophysiology

Patch-clamp recordings: A total of 107 cells were patch clamped for electrophysiological and/or morphological analysis. 65 patch-clamped cells were considered for the analysis of cell-network interactions. These cells offered stable, and durable electrophysiological recordings and were associated with good quality network recordings (either with calcium imaging (n=44) or field potential recordings (n=21)).

Neurons were held in current-clamp using a patch-clamp amplifier (HEKA, EPC10) in the whole-cell configuration. Intracellular solution composition was (in mM): 130 K-methylSO₄, 5 KCl, 5 NaCl, 10 HEPES, 2.5 Mg-ATP, 0.3 GTP and 0.5 % Neurobiotin. No correction for liquid junction potential was applied. The osmolarity was 265–275 mOsm, pH 7.3. Microelectrodes resistance was 4-9 MOhms. Uncompensated access resistance was monitored throughout the recordings. Values below 20 MOhms were considered acceptable and the results were discarded if it changed by more than 20%. Whole cell measurements were filtered at 3 kHz using a patch-clamp amplifier. Recordings were digitized online (10 kHz) with an interface card to a personal computer and acquired using Axoscope 7.0 software. Spontaneous EPSPs were detected and analyzed using the MiniAnalysis software (Synaptosoft, Decatur, CA). For most stimulation experiments, the movie acquisition time was separated evenly between (1) a ~ 3 min resting period during which the cell potential was held close to V_{rest} (i.e. zero current injection); (2) a ~3 min stimulation period during which phasic stimulation protocols were applied; (3) a ~3 min recovery period where the cell potential was brought back to resting membrane potential. Stimulation protocol: suprathreshold current pulses (amplitude: 15-200 pA, duration: 500 ms) repeated at 0.1-0.2 Hz. V_{rest} was measured as the membrane potential baseline value obtained in current-clamp mode in the absence of current injection. The action potential threshold (V_{threshold}) and amplitude, membrane capacitance (C_m) and input resistance (R_{in}) were measured offline using Clampfit. V_{rest} and V_{threshold} were corrected for errors due to high input resistance values in developing neurons.

Field potential recordings: Extracellular field potentials were recorded using glass electrodes placed in the stratum pyramidale filled with extracellular solution (ACSF, see above, resistance 0.2 Mohm) and a low-noise multichannel DAM-8A amplifier (WPI, GB; low filter: 0.1 Hz; high filter: 1 KHz x1000). Signals were digitized using an analogue-to-

digital converter (Digidata 1440A, Axon Instruments, USA). Sampling interval was 100 microseconds (10 kHz).

MEA recordings: Extracellular field potentials and multiple unit activity (MUA) were recorded using MEAs (Multi Channel Systems, Germany). MEAs comprised 60 electrodes of 30- μ m diameter, in an “8 by 8” arrangement with 200 μ m spacing between electrodes. Signals were amplified ($\times 1200$) and digitized at 10kHz. Raw data was filtered (High Pass 1Hz, Band Stop 50Hz) and bursts of activity were detected as events above a threshold fixed at 15 μ V. The rate of network bursts was then computed using the MC_Rack built-in analyser (Multi Channel Systems, Germany). Matlab, Clampfit 10.1 (Axon Instruments, USA) and MiniAnalysis 6.03 (Synaptosoft, Decatur, CA) programs were used for the acquisition and analysis of the extracellular activities.

Morphology

Neurobiotin-filled cell recovering: Slices were fixed overnight at 4 °C in Antigenfix, rinsed in PBS containing 0.3% Triton X-100 (PBST) and incubated overnight at room temperature in cy3-streptavidin (1/1000 in PBST). Post-hoc analysis was performed using a confocal microscope (Zeiss LSM 510, using a 63X, NA-1.2 water-immersed objective). Stacks of optical sections were collected for computer-assisted neuron reconstructions.

Immunocytochemistry: Animals (P15 and P60) were deeply anesthetized with a ketamine (50 mg /ml) and xylazine (7.5 mg /ml) solution at a dose of 2 ml / kg (i.p.) and perfused transcardially with 4% paraformaldehyde in PB (1ml/g) at a constant flow (2 ml/min). Brains were post-fixed overnight in fixative and washed. Horizontal brain sections (100 μ m) were routinely processed for multiple immunofluorescence. Briefly, after pre-incubation in 5% normal donkey serum, sections were sequentially incubated in a mixture containing a rabbit antibody directed to GFP (1/5000; Invitrogen, A6455) and a guinea-pig to calbindin (1/500; Synaptic System, 214004), then incubated in appropriate secondary antibodies conjugated with either DL488 or DL549 (1/500, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.). No staining similar to specific labelling was observed when primary antisera were omitted. Images were obtained with a Zeiss AxioImager Z2 microscope coupled to a camera (Zeiss AxioCam MR3). Immunofluorescence images were acquired using a halogene HBO lamp associated with 470/40 or 545/25 filter cubes for detection of Al488 and DL549, respectively. Counts were performed manually.

Morphometric analysis: 54 neurons were reconstructed with a computer assisted system attached to a microscope (Neurolucida, MicroBrightfield). Out of those, 41 were included in

the morphometric analysis. Morphological variables included: dendritic and axonal lengths, dendritic and axonal surfaces, number of dendritic and axonal terminals, soma size and length of the first segment of the primary apical dendrite.

Analysis of network dynamics

Signal detection: We used custom designed Matlab software ^{2, 51} which allowed: 1) automatic identification of loaded cells; 2) measuring the average fluorescence transients from each cell as a function of time; 3) detecting the onsets and offsets of calcium signals; 4) reconstructing the functional connectivity of the imaged network.

Analysis of network synchronizations: Network synchronizations were detected as synchronous onsets peaks including more neurons than expected by chance, as previously described ².

Cell-network interaction: To establish whether the stimulation of a single neuron was able to influence the occurrence of network events we used the same procedure as previously described ^{2, 51}.

Photostimulation

Photostimulation experiments were performed using 200 μ M of light-sensitive MNI-caged-L-glutamate (Tocris). Glutamate is uncaged at multiple spots in a given image (4 maximum) of around 1 μ m diameter by single-photon laser photolysis (exposure time: 10 ms, power: 4-6 mW by spot), using a 405nm laser (LaVision Biotech). The photostimulation pathway shares the same galvanometer scanner with the pulsed femtosecond IR LASER described above, allowing for simultaneous calcium imaging and photostimulation. We did not observe any significant cross-talk between the excitation lights used for glutamate uncaging (405 nm) and calcium imaging (800nm). Indeed, there was no significant uncaging of glutamate during calcium imaging sessions.

Reference List

1. Ben Ari, Y., Cherubini, E., Corradetti, R., & Gaiarsa, J.L. Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. *J. Physiol* **416**, 303-325 (1989).
2. Bonifazi, P. *et al.* GABAergic hub neurons orchestrate synchrony in developing hippocampal networks. *Science* **326**, 1419-1424 (2009).
3. Miles, R. & Wong, R. Single neurons can initiate synchronized population discharge in the hippocampus. *Nature* **306**, 371-373 (1983).
4. de la Prida, L.M., Huberfeld, G., Cohen, I., & Miles, R. Threshold behavior in the initiation of hippocampal population bursts. *Neuron* **49**, 131-142 (2006).
5. Wittner, L. & Miles, R. Factors defining a pacemaker region for synchrony in the hippocampus. *J. Physiol* **584**, 867-883 (2007).
6. Picardo, M.A. *et al.* Pioneer GABA Cells Comprise a Subpopulation of Hub Neurons in the Developing Hippocampus. *Neuron* **71**, 695-709 (2011).
7. Namiki, S., Sasaki, T., Matsuki, N., & Ikegaya, Y. Regional difference in stainability with calcium-sensitive acetoxymethyl-ester probes in mouse brain slices. *Int. J. Neurosci.* **119**, 214-226 (2009).
8. Heinrich, C. *et al.* Directing astroglia from the cerebral cortex into subtype specific functional neurons. *PLoS. Biol.* **8**, e1000373 (2010).
9. Schuurmans, C. *et al.* Sequential phases of cortical specification involve Neurogenin-dependent and -independent pathways. *EMBO J.* **23**, 2892-2902 (2004).
10. Hand, R. *et al.* Phosphorylation of Neurogenin2 specifies the migration properties and the dendritic morphology of pyramidal neurons in the neocortex. *Neuron* **48**, 45-62 (2005).
11. Heng, J.I. *et al.* Neurogenin 2 controls cortical neuron migration through regulation of Rnd2. *Nature* **455**, 114-118 (2008).
12. Hand, R. & Polleux, F. Neurogenin2 regulates the initial axon guidance of cortical pyramidal neurons projecting medially to the corpus callosum. *Neural Dev.* **6**, 30 (2011).
13. Zirlinger, M., Lo, L., McMahon, J., McMahon, A.P., & Anderson, D.J. Transient expression of the bHLH factor neurogenin-2 marks a subpopulation of neural crest cells biased for a sensory but not a neuronal fate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 8084-8089 (2002).
14. Sousa, V.H., Miyoshi, G., Hjerling-Leffler, J., Karayannis, T., & Fishell, G. Characterization of Nkx6-2-derived neocortical interneuron lineages. *Cereb. Cortex* **19 Suppl 1**, i1-10 (2009).

15. Ozen,I. *et al.* Proliferating neuronal progenitors in the postnatal hippocampus transiently express the proneural gene Ngn2. *Eur. J. Neurosci.* **25**, 2591-2603 (2007).
16. Galichet,C., Guillemot,F., & Parras,C.M. Neurogenin 2 has an essential role in development of the dentate gyrus. *Development* **135**, 2031-2041 (2008).
17. Britz,O. *et al.* A role for proneural genes in the maturation of cortical progenitor cells. *Cereb. Cortex* **16 Suppl 1**, i138-i151 (2006).
18. Ellender,T.J., Nissen,W., Colgin,L.L., Mann,E.O., & Paulsen,O. Priming of hippocampal population bursts by individual perisomatic-targeting interneurons. *J. Neurosci.* **30**, 5979-5991 (2010).
19. Mizuseki,K., Diba,K., Pastalkova,E., & Buzsaki,G. Hippocampal CA1 pyramidal cells form functionally distinct sublayers. *Nat. Neurosci.* **14**, 1174-1181 (2011).
20. Butt,S.J. *et al.* The temporal and spatial origins of cortical interneurons predict their physiological subtype. *Neuron* **48**, 591-604 (2005).
21. Morante-Oria,J. *et al.* Subpallial origin of a population of projecting pioneer neurons during corticogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 12468-12473 (2003).
22. Thompson,C.L. *et al.* Genomic anatomy of the hippocampus. *Neuron* **60**, 1010-1021 (2008).
23. Celio,M.R. Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience* **35**, 375-475 (1990).
24. Slomianka,L. & Geneser,F.A. Postnatal development of zinc-containing cells and neuropil in the hippocampal region of the mouse. *Hippocampus* **7**, 321-340 (1997).
25. Turner,D.A., Li,X.G., Pyapali,G.K., Ylinen,A., & Buzsaki,G. Morphometric and electrical properties of reconstructed hippocampal CA3 neurons recorded in vivo. *J. Comp Neurol.* **356**, 580-594 (1995).
26. Hemond,P., Migliore,M., Ascoli,G.A., & Jaffe,D.B. The membrane response of hippocampal CA3b pyramidal neurons near rest: Heterogeneity of passive properties and the contribution of hyperpolarization-activated currents. *Neuroscience* **160**, 359-370 (2009).
27. Tronson,N.C. *et al.* Segregated populations of hippocampal principal CA1 neurons mediating conditioning and extinction of contextual fear. *J. Neurosci.* **29**, 3387-3394 (2009).
28. Senior,T.J., Huxter,J.R., Allen,K., O'Neill,J., & Csicsvari,J. Gamma oscillatory firing reveals distinct populations of pyramidal cells in the CA1 region of the hippocampus. *J. Neurosci.* **28**, 2274-2286 (2008).

29. Bland,B.H., Konopacki,J., & Dyck,R. Heterogeneity among hippocampal pyramidal neurons revealed by their relation to theta-band oscillation and synchrony. *Exp. Neurol.* **195**, 458-474 (2005).
30. Epsztein,J., Brecht,M., & Lee,A.K. Intracellular determinants of hippocampal CA1 place and silent cell activity in a novel environment. *Neuron* **70**, 109-120 (2011).
31. Slomianka,L., Amrein,I., Knuesel,I., Sorensen,J.C., & Wolfer,D.P. Hippocampal pyramidal cells: the reemergence of cortical lamination. *Brain Struct. Funct.*(2011).
32. Bilkey,D.K. & Schwartzkroin,P.A. Variation in electrophysiology and morphology of hippocampal CA3 pyramidal cells. *Brain Res.* **514**, 77-83 (1990).
33. Lisman,J.E. Bursts as a unit of neural information: making unreliable synapses reliable. *Trends Neurosci.* **20**, 38-43 (1997).
34. Sanabria,E.R., Su,H., & Yaari,Y. Initiation of network bursts by Ca²⁺-dependent intrinsic bursting in the rat pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J. Physiol* **532**, 205-216 (2001).
35. Sipila,S.T., Huttu,K., Soltesz,I., Voipio,J., & Kaila,K. Depolarizing GABA acts on intrinsically bursting pyramidal neurons to drive giant depolarizing potentials in the immature hippocampus. *J. Neurosci.* **25**, 5280-5289 (2005).
36. Deguchi,Y., Donato,F., Galimberti,I., Cabuy,E., & Caroni,P. Temporally matched subpopulations of selectively interconnected principal neurons in the hippocampus. *Nat. Neurosci.* **14**, 495-504 (2011).
37. Petrovic,M. & Hummel,T. Temporal identity in axonal target layer recognition. *Nature* **456**, 800-803 (2008).
38. Seibt,J. *et al.* Neurogenin2 specifies the connectivity of thalamic neurons by controlling axon responsiveness to intermediate target cues. *Neuron* **39**, 439-452 (2003).
39. Bahner,F. *et al.* Cellular correlate of assembly formation in oscillating hippocampal networks in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **108**, E607-E616 (2011).
40. Csicsvari,J., Jamieson,B., Wise,K.D., & Buzsaki,G. Mechanisms of gamma oscillations in the hippocampus of the behaving rat. *Neuron* **37**, 311-322 (2003).
41. Buzsaki,G. Hippocampal sharp waves: their origin and significance. *Brain Res.* **398**, 242-252 (1986).
42. Csicsvari,J., Hirase,H., Mamiya,A., & Buzsaki,G. Ensemble patterns of hippocampal CA3-CA1 neurons during sharp wave-associated population events. *Neuron* **28**, 585-594 (2000).
43. Dzhala,V.I. & Staley,K.J. Excitatory actions of endogenously released GABA contribute to initiation of ictal epileptiform activity in the developing hippocampus. *J. Neurosci.* **23**, 1840-1846 (2003).

44. Wong, R.K., Traub, R.D., & Miles, R. Cellular basis of neuronal synchrony in epilepsy. *Adv. Neurol.* **44**, 583-592 (1986).
45. Ben-Ari, Y. Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* **14**, 375-403 (1985).
46. Cossart, R., Bernard, C., & Ben-Ari, Y. Multiple facets of GABAergic neurons and synapses: multiple fates of GABA signalling in epilepsies. *Trends Neurosci.* **28**, 108-115 (2005).
47. Khalilov, I., Holmes, G.L., & Ben Ari, Y. In vitro formation of a secondary epileptogenic mirror focus by interhippocampal propagation of seizures. *Nat. Neurosci.* **6**, 1079-1085 (2003).
48. Towfighi, J., Housman, C., Brucklacher, R., & Vannucci, R.C. Neuropathology of seizures in the immature rabbit. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **152**, 143-152 (2004).
49. Huberfeld, G. *et al.* Glutamatergic pre-ictal discharges emerge at the transition to seizure in human epilepsy. *Nat. Neurosci.* **14**, 627-634 (2011).
50. Miyoshi, G. & Fishell, G. GABAergic Interneuron Lineages Selectively Sort into Specific Cortical Layers during Early Postnatal Development. *Cereb. Cortex* **21**, 845-52 (2010).
51. Crepel, V. *et al.* A parturition-associated nonsynaptic coherent activity pattern in the developing hippocampus. *Neuron* **54**, 105-120 (2007).

Partie 3 : Discussion

Le résultat principal de cette thèse est la mise en évidence, dans la région CA3 de l'hippocampe de souris, de propriétés morpho-physiologiques et fonctionnelles distinctes chez des neurones pyramidaux générés à des stades différents de la neurogenèse. Ainsi, les neurones nés pendant les phases précoces de l'embryogenèse ont un impact significatif sur l'activité de réseau générée en condition de blocage de la transmission GABAergiques rapide.

Ces résultats font écho à la problématique de départ qui s'interrogeait sur une règle générale associant la précocité développementale des neurones à une fonction centrale au sein de leur réseau. Nous discuterons dans un premier paragraphe de la pertinence de ce lien entre date de naissance, développement et fonction en nous appuyant sur nos résultats et sur la littérature. Nous proposerons en outre quelques pistes qui expliqueraient comment une date de naissance singulière peut amener à une fonction distincte.

En outre, les résultats énoncés précédemment, observés au prisme de la littérature scientifique actuelle, soulèvent un certain nombre de questions subsidiaires. Tout d'abord, ces résultats ayant été obtenus dans des conditions expérimentales particulières, on peut s'interroger sur le poids des neurones pyramidaux que nous avons identifiés, cette fois sur un réseau générant des activités physiologiques significatives du point de vue cognitif ou comportemental. De même, on peut se demander si ces neurones pyramidaux jouent un rôle particulier dans le mécanisme de pathologies telles que les épilepsies. Nous débattons également de ces deux thèmes dans cette partie.

1. Existe-t-il un lien général entre fonction et date de genèse des neurones ?

Dans la région CA3 de l'hippocampe, deux types de neurones semblent occuper une place de choix dans la genèse d'activités de réseau. Les neurones GABAergiques « hubs » orchestrent les activités de réseaux immatures (Bonifazi et al., 2009), alors que les neurones pyramidaux « pacemakers », générés aux stades précoces de la neurogenèse, donnent l'impulsion aux activités épileptiformes générées en l'absence de transmission GABAergique rapide

opérationnelle ((Miles and Wong, 1983; Wittner et al., 2006), voir aussi partie résultats, p90).

Outre leur rôle fonctionnel central dans le réseau, la caractéristique commune la plus notable de ces deux catégories de neurones provient de leur genèse particulièrement précoce, qui leur confère un statut de « pionniers » dans la structure (Picardo et al., 2011), voir aussi partie résultats). Ainsi, il existerait dans la région CA3 un « droit d'aînesse » qui s'appliquerait aux neurones, indépendamment de leur identité GABAergique ou glutamatergique. La mise en évidence de tels neurones a peut-être été facilitée par l'organisation particulière du réseau de CA3, doté de propriétés fonctionnelles exceptionnelles (voir p29). Cela amène à s'interroger sur l'existence de neurones qui présenteraient ce double profil de neurones « pionniers » combiné à un rôle fonctionnel central dans le réseau dans d'autres structures cérébrales que CA3.

Quelques éléments de réponse pourraient être apportés dans le gyrus denté. Dans deux articles successifs (Larimer and Strowbridge, 2010; Williams et al., 2007), le groupe de Ben W. Strowbridge a récemment « dépoussiéré » une catégorie de neurones du gyrus denté, décrite à la fin du 19^{ème} siècle par Ramon y Cajal, mais étrangement négligée depuis. Ces neurones glutamatergiques rares, appelés *cellules semi-lunaires*, se distinguent des cellules granulaires majoritaires dans le gyrus, par leur localisation (dans la couche moléculaire interne, et non dans la couche granulaire), mais aussi leurs propriétés morphologiques (un corps cellulaire en forme de semi-lune, des dendrites plus larges, un axone qui projette dans la couche moléculaire et dans le hile) et électrophysiologiques (une capacité d'adaptation en fréquence des potentiels d'action moindre) (Williams et al., 2007). En outre, ces neurones jouent un rôle fonctionnel central dans le réseau interne du gyrus denté. En effet, même lorsque cette structure est isolée (après ablation de CA3 et du cortex entorhinal sur des tranches), les cellules semi-lunaires peuvent exercer un « tir de barrage » excitateur sur les cellules moussues glutamatergiques et sur les neurones GABAergiques du hile. Ces derniers imposent à leur tour une inhibition aux cellules granulaires, verrouillant leur capacité à décharger (Larimer and Strowbridge, 2010). Dans la discussion de leur deuxième article, les auteurs suggèrent que les cellules semi-lunaires constituent une « soupape » du gyrus denté (*dentate gate*) qui restreindrait la sortie des neurones granulaires (Lothman et al., 1992), un

système dont les composants cellulaires n'avaient pas été identifiés jusque-là. De plus, partant d'observations préalables selon lesquelles il existe un « gradient de maturité » des cellules granulaires, les plus proches de la couche moléculaire étant les plus matures (Green and Juraska, 1985; Shapiro and Ribak, 2005), les auteurs suggèrent que les cellules semi-lunaires pourraient faire partie d'une population de neurones plus âgés, sans toutefois pouvoir vérifier cette hypothèse.

Afin de répondre à cette question laissée en suspens, nous avons utilisé notre modèle de souris transgéniques permettant de marquer les neurones glutamatergiques en fonction de leur date de neurogenèse (voir Figure 13). Nous avons effectué nos marquages à des stades très précoces (E12-E15) de la neurogenèse des cellules granulaires. En accord avec l'hypothèse du groupe de Strowbridge, le marquage à des stades précoces met en évidence des neurones similaires aux cellules semi-lunaires d'une part par leur localisation dans la couche moléculaire interne, et d'autre part par leur morphologie axo-dendritique (Figure 14). Bien qu'elles doivent être complétées par une analyse électrophysiologique et fonctionnelle, ces observations suggèrent fortement l'existence de cellules qui cumulent un rôle central dans le réseau du gyrus denté et une naissance précoce.

L'exemple des cellules hubs, pacemakers, et semi-lunaires, semble appuyer l'existence d'une règle répandue -sinon générale- selon laquelle les neurones « premiers arrivés » sont les « mieux servis », et dévoués à des fonctions remarquables, non pas seulement dans CA3, mais dans tout l'hippocampe.

Pour renforcer cette idée, il serait peut-être intéressant de la vérifier de manière systématique dans d'autres réseaux cérébraux. Ainsi, il existerait dans plusieurs structures cérébrales, des neurones qui se rapprochent du profil recherché par leurs propriétés à la fois précoces et fonctionnellement remarquables (passés en revue dans (Chao et al., 2009)).

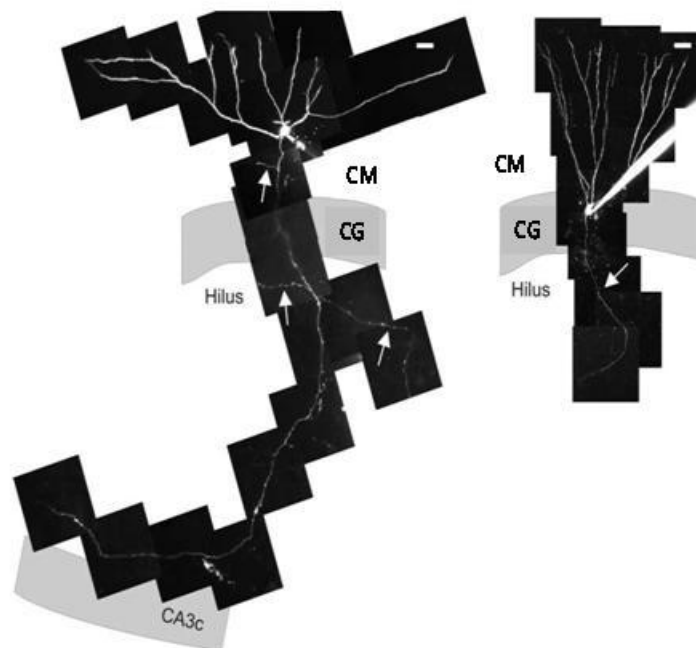
Ainsi, dans le néocortex, une population de neurones « pionniers » fait partie des premiers neurones qui colonisent le cortex en construction, formant des couches précoces transitoires, comme la zone marginale, et la sous-plaque (voir p68). Les neurones pionniers qui forment ces deux couches ne sont pas seulement précoces, ils ont des propriétés remarquables dans un tissu neural très jeune.

Figure 14 : Les cellules semi-lunaires du gyrus denté seraient des neurones fonctionnellement remarquables générés pendant les phases précoces de la neurogenèse.

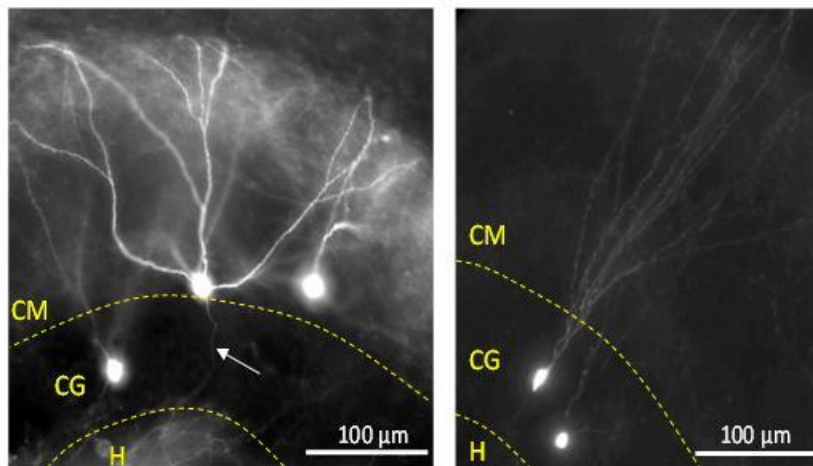
a. Reconstruction d'une cellule semi-lunaire dans la couche moléculaire (CM, à gauche) et d'une cellule granulaire dans la couche granulaire (CG, à droite) préalablement remplies par patch-clamp par le marqueur fluorescent Alexa594. L'arborisation dendritique de la cellule semi-lunaire s'étend sur une surface plus grande que celle de la cellule granulaire. L'axone des deux neurones projette en direction du hilus (flèches blanches, (Williams et al., 2007)). Barre d'échelle : 25µm.

b. Cellules présumées semi-lunaires (à gauche) et granulaires (à droite) générées à E15, marquées grâce au système d'induction au tamoxifène décrit Figure 13. La localisation et l'arborisation axo-dendritique des deux cellules sont similaires à celles des cellules en a. CM : Couche moléculaire, CG : couche granulaire, H : hilus.

a.



b.



Dans la zone marginale, les cellules de Cajal-Retzius ont été étudiées initialement pour leur rôle important dans la migration corticale des neurones pyramidaux générés dans la zone ventriculaire. Or il semble en outre que ces cellules forment des connexions avec les neurones environnants, de manière à constituer un réseau fonctionnel (Radnikow et al., 2002). Ce réseau primitif est capable de générer des activités coordonnées qui participent à la construction des circuits du cortex ((Aguiló et al., 1999), pour revues, voir (Marín-Padilla, 1998; Soriano and Del Río, 2005)).

De même, il existe dans la *sous-plaque* une population de neurones précoces qui possèdent des propriétés morpho-physiologiques relativement matures par rapport à leur environnement, qui leurs confèrent un rôle fonctionnel remarquable. Ils participent à la construction des circuits thalamo-corticaux, à la formation des colonnes corticales, et génèrent les premières activités synchrones du réseau néocortical. De plus, une partie de ces neurones ne dégénère pas et forme la couche 6b, l'une des plus profondes du néocortex, qui joue un rôle important dans les processus physiopathologiques du néocortex (pour revue, voir (Kanold and Luhmann, 2010)). Ces observations iraient encore une fois dans le sens d'un lien entre précocité et rôle fonctionnel central dans le réseau, qui se pourrait alors être généralisé à l'ensemble du cortex.

On peut se demander comment, chez des neurones de même potentialité, le facteur temps, traduit par des dates de naissance différentes, peut se manifester par des différences fonctionnelles marquées, et une place plus ou moins centrale au sein du réseau. On peut supposer que la présence précoce de ces neurones dans leur structure cérébrale leur permet d'une part une maturation anticipée, et d'autre part de constituer une pierre angulaire autour de laquelle s'organise le réseau en formation. Nous discuterons dans le paragraphe suivant de la manière dont le développement peut influencer la fonction centrale des neurones ; à cette occasion, nous reprendrons l'exemple des cellules pyramidales dont nous avons détaillé les propriétés et le développement en introduction.

II. Comment l'âge individuel peut-il déterminer l'avenir des neurones pyramidaux?

Pendant le développement, le facteur temps semble un paramètre important dans la spécification de l'avenir fonctionnel des neurones issus du même neuroépithélium. Nous l'avons vu, il existe de nombreux exemples de neurones dont l'impact fonctionnel dans le réseau est lié à une date de naissance relative à l'ensemble de la population. Ce facteur temps peut se concevoir selon des termes qualitatifs et quantitatifs. *Qualitatifs* car les neurones nés à un stade donné peuvent subir des processus développementaux distincts des neurones nés à des stades plus précoces ou plus tardifs. *Quantitatifs*, car les neurones peuvent subir des processus développementaux communs pendant une fenêtre temporelle différente selon leur date de naissance. Ce raisonnement s'applique-t-il aux neurones pyramidaux précoces ?

1. Le facteur temps affecte les processus développementaux en termes quantitatifs :

Nous avons vu que la transmission GABAergique subissait un changement de polarité (ou *GABA shift*, voir p76) de son action sur le potentiel membranaire, particulièrement marqué pendant la première semaine de vie postnatale chez le rongeur (Ben-Ari et al., 2007). Ce changement provient en partie de la maturation différée des transporteurs de chlore NKCC1 et KCC2.

Or l'hippocampe en développement est une mosaïque de neurones à des stades de maturation hétérogènes (Tyzio et al., 1999). Ainsi, si le changement de polarité de la transmission GABAergique atteint un pic aux alentours de la première semaine de vie du rongeur, certains neurones pourraient effectuer ce changement bien plus tôt (Bortone and Polleux, 2009). Nous avons voulu savoir si ce processus commun se produisait plus précocement chez les neurones pyramidaux nés tôt, de manière cellule-autonome. En collaboration avec Geneviève Chazal, nous avons effectué des marquages immunohistochimiques de KCC2 pendant la première semaine de vie sur des souris dans lesquelles les neurones pyramidaux étaient marqués en fonction de leur date de

neurogenèse précoce ou tardive (marqués à E12 ou E15). Nos données préliminaires montrent qu'à P2, les neurones nés à des stades précoces exprimaient KCC2 au niveau de la membrane, alors que les neurones générés à des stades tardifs l'expriment très peu (Figure 15).

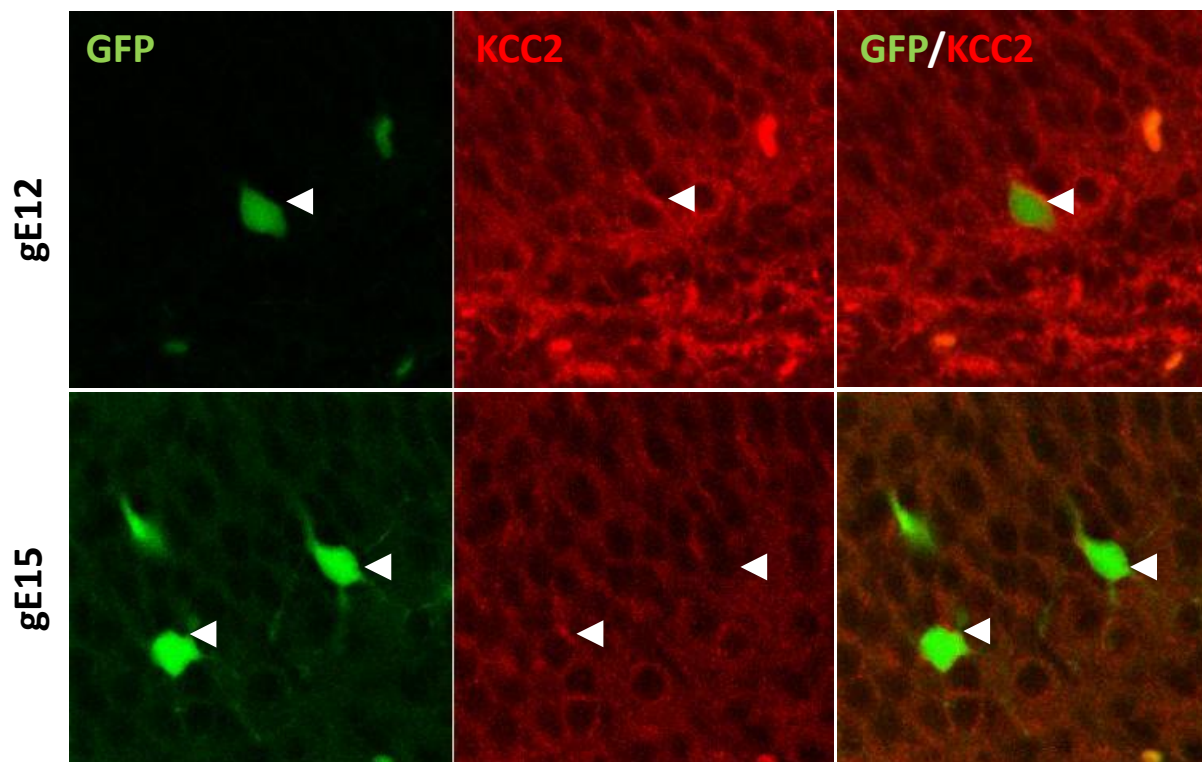


Figure 15 : Les neurones pyramidaux précoces semblent être les premiers à exprimer le transporteur KCC2.

Les neurones glutamatergiques de CA3 sont marqués en fonction de leur date de neurogenèse grâce au système d'induction de l'expression de la GFP par gavage au tamoxifène à E12 (noté gE12) ou E15 (gE15, voir Figure 13), puis subissent un immunomarquage GFP (colonne de gauche) et KCC2 (colonne centrale). La colonne de droite représente la superposition des deux images. Les pointes de flèches blanches indiquent la position du corps cellulaires des cellules marquées. La cellule générée à E12 (ligne supérieure) exprime plus fortement KCC2 que les cellules générées à E15 (ligne inférieure). Image : Geneviève Chazal.

Cela suggère que chez les neurones nés tôt le changement de polarité de la transmission GABAergique se produirait plus tôt que chez les neurones nés plus tard. Ces résultats doivent être confirmés par des enregistrements électrophysiologiques des canaux GABAergiques unitaires afin de mesurer le potentiel d'inversion du GABA (Tyzio et al., 2006). Les observations précédentes vont dans le sens d'une importance quantitative du facteur temps sur les neurones pyramidaux précoces, dans la mesure où ceux-ci semblent être

affectés plus tôt par des processus développementaux communs. Ces différences ne sont pas qualitatives, car les neurones nés plus tard rattrapent leur retard de maturation avec le temps. Cela rejoint nos observations (voir partie résultats, p90) qui montrent qu'il existe des différences morphologiques significatives entre neurones pyramidaux précoces et tardifs pendant la première semaine de vie, mais qui s'estompent une semaine plus tard (voir article p90, mais aussi (Tyzio et al., 1999)).

Les différences quantitatives des propriétés des neurones pyramidaux pendant leur développement pourraient se traduire au niveau de leur intégration fonctionnelle au réseau, et leur implication dans les activités corrélées de l'hippocampe immature.

Ainsi, des activités non synaptiques, les SPAs, ont été enregistrées dans l'hippocampe pendant la période périnatale, suivies par des activités synaptiques immatures, les GDPs pendant la première semaine de vie (Crepel, 2007, Allène et al., en soumission, voir p33). Au sein de l'équipe, Camille Allène et collaborateurs (en cours de soumission) ont émis l'hypothèse que les neurones subiraient une transition SPAs vers GDPs à différents âges en fonction de leur date de naissance. En effectuant des études sur des tranches organotypiques, les auteurs ont d'abord remarqué que les neurones de CA3 qui génèrent des GDPs à un stade donné génèrent des SPAs pendant les stades précédents (**Figure 16**). Cela appuie leur hypothèse de séquence SPA vers GDP au sein d'un neurone individuel. De plus, ils ont observé que les neurones GABAergiques nés aux stades les plus tardifs génèrent des SPAs à un stade où le réseau CA3 génère majoritairement des GDPs. Suite à ces résultats, les auteurs suggèrent que les neurones GABAergiques s'intègrent fonctionnellement dans le réseau de manière autonome et dépendante de leur date de neurogenèse.

Bien que les auteurs aient principalement étudié les neurones GABAergiques, leurs expériences sur des tranches organotypiques ont montré que la transition SPA vers GDP concernait également des neurones pyramidaux. Il serait intéressant d'appliquer un protocole expérimental similaire aux neurones glutamatergiques afin de déterminer si les neurones pyramidaux générés tôt effectuent également une transition SPAs vers GDPs plus précoce. Si c'est le cas, cela signifierait que l'acquisition de propriétés matures et l'intégration fonctionnelle au réseau se ferait très tôt pour les neurones nés pendant les

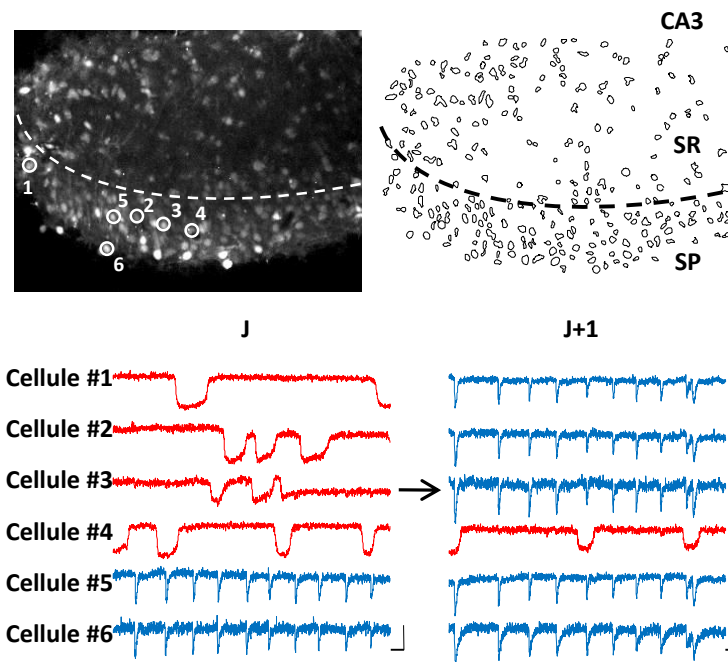


Figure 16 : Les neurones pyramidaux de CA3 génèrent séquentiellement des SPAs puis des GDPs au cours de leur développement.

En haut : Imagerie de fluorescence du calcium (à gauche) et carte des contours cellulaires (à droite) d'une tranche organotypique de la région CA3 de l'hippocampe, préparée à partir d'une souris P4.

En bas : variation de la fluorescence de six cellules (Cellules 1-6) après deux jours de cultures (noté J) et le lendemain (noté J+1). Echelle : 10 secondes en abscisse, 20% de variation de fluorescence (DF/F) en ordonnée. Parmi les neurones du *stratum pyramidale* de CA3 (présupposés pyramidaux) qui génèrent des SPAs (traces rouges) à J, trois sur quatre génèrent des GDPs à J+1 (traces bleues).

phases les plus précoces. Dans la mesure où les activités immatures pourraient jouer un rôle dans la maturation des neurones (Mohajerani et al., 2007), l'intégration fonctionnelle précoce des neurones pyramidaux générés tôt pourrait être en partie à l'origine de leur rôle fonctionnel central.

2. Le facteur temps affecte les processus développementaux en termes qualitatifs :

Il est également possible qu'en fonction de leur date de naissance, les neurones pyramidaux subissent des phases de développement qualitativement différentes de neurones générés à des stades différents.

Nos résultats, ainsi que d'autres (Manent et al., 2005) montrent que la région la plus profonde selon l'axe radial du *stratum pyramidale* CA3 est composée d'un grand nombre de neurones générés aux stades les plus précoces de la neurogenèse glutamatergique. Or la littérature fait état d'une ségrégation radiale claire des neurones pyramidaux au niveau de leur contenu en zinc. C'est en effet dans cette partie profonde de CA3 que l'on retrouve la plus grande population de neurones contenant l'ion zinc (Slomianka and Geneser, 1997; Slomianka et al., 2011). Ce chevauchement pourrait refléter un processus développemental distinct qui affecte préférentiellement les neurones nés pendant les phases précoces et qui conduit à la localisation de cet ion dans ces cellules. Il serait particulièrement intéressant d'étudier la localisation du zinc dans notre modèle de souris où les neurones sont marqués selon leur âge. Dans le cas où nous retrouverions une colocalisation, cela confirmerait l'hypothèse selon laquelle la date de naissance particulière d'un neurone lui permettrait d'emprunter des voies de développement distinctes, lesquelles aboutissent à des propriétés distinctes du point de vue biochimique, mais aussi électrophysiologique et morphologiques. En effet le zinc est un modulateur de la transmission synaptique GABAergique et glutamatergique (Chorin et al., 2011; Frederickson et al., 2005; Paoletti et al., 2009) et sa présence dans une population particulière pourrait être associée à un rôle fonctionnel particulier. De plus, sa présence intracellulaire dans une population de neurones particulière est corrélée à un schéma de connectivité distinct (Sørensen et al., 1993). Il est donc possible

que les neurones qui contiennent sélectivement le zinc suivent également des processus distincts de formation des connexions afférentes et efférentes pendant le développement.

C'est pourquoi il serait intéressant de déterminer si le facteur temps peut déterminer un développement qualitativement différent des connexions afférentes et efférentes des neurones. En introduction, nous avons notamment décrit les travaux du groupe de Pico Caroni qui montrent que les neurones glutamatergiques générés tôt de l'hippocampe se connectent préférentiellement (Deguchi et al., 2011) grâce à des fenêtres de synaptogenèse coïncidentes déterminées par des dates de neurogenèse similaires (voir p79). Ces résultats vont dans le sens d'un lien entre le facteur temps et un développement distinct des connexions.

De plus, nous avons effectué des observations préliminaires avec notre modèle de souris qui pourraient aller dans le même sens. Lorsque l'induction du marquage est effectuée pendant les périodes précoces de la neurogenèse glutamatergique (E12), nous avons observé un marquage en « îlots » (ou *patches*) dans le *stratum lacunosum-moleculare* (SLM) de CA3. Ces îlots proviennent de fibres de neurones glutamatergiques nés à E12. Étant donné la localisation dans les couches les plus superficielles de CA3, il est probable que les îlots soient constitués des axones des neurones pyramidaux du cortex entorhinal, qui projettent spécifiquement dans cette zone (voir Figure 7). Curieusement, ces îlots sont très souvent colocalisés avec l'arborisation dendritique de neurones pyramidaux de CA3 marqués à cet âge (Figure 17). À l'inverse, les îlots sont souvent absents dans les zones dépourvues de dendrites marquées.

Ces observations suggèrent que les axones des neurones pyramidaux du cortex entorhinal les plus précoces pourraient contacter préférentiellement les dendrites apicales des neurones pyramidaux de CA3 nés pendant la même fenêtre de temps. Cela se calquerait sur les règles de chevauchement temporel récemment mises en évidence dans l'hippocampe (Deguchi et al., 2011). Cette hypothèse nécessite pour être confirmée, par des analyses anatomiques (analyse de la présence de boutons synaptiques par microscopie de fluorescence, de la formation de synapses asymétriques en microscopie électronique) et fonctionnelles (photostimulation) afin de déterminer avec certitude la présence de connexions entre les neurones du cortex entorhinal et de l'hippocampe du même âge.

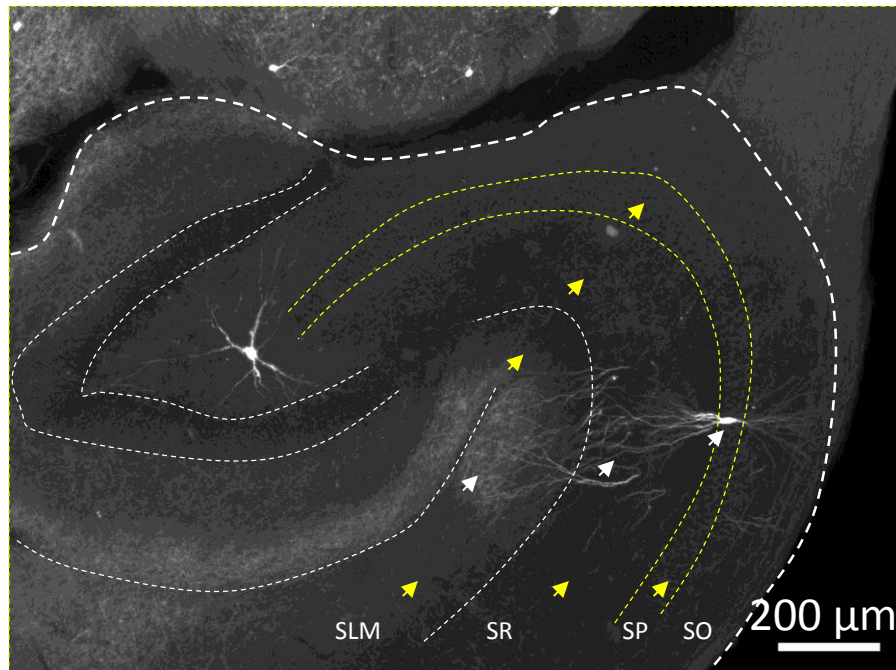


Figure 17 : Le marquage des neurones générés pendant les stades précoces de la neurogenèse révèle la présence d'îlots de fibres dans le Stratum Lacunosum-moleculare de CA3.

Couche horizontale de l'hippocampe de souris après induction du marquage des neurones générés à E12 (voir Figure 13). Ce marquage révèle la présence d'un îlot de fibres marquées dans la SLM de CA3 (flèche blanche dans le SLM). L'îlot est colocalisé avec les dendrites apicales distales de neurones pyramidaux de CA3 générés tôt (flèches blanches dans le SR et le SP). Les portions de SLM dépourvues d'îlots de fibres marquées à E12 sont dépourvues de dendrites de neurones pyramidaux marqués à E12 (flèches jaunes). SO : *Stratum oriens*, SP : *Stratum Pyramidale*, SL : *Stratum lucidum*, SR : *Stratum Radiatum* SLM : *Stratum Lacunosum-moleculare*.

D'une manière générale, il serait intéressant de déterminer s'il existe une sélectivité des connexions afférentes et efférentes qui impliquent les neurones pyramidaux précoces, et qui serait associée à une fonction distincte. Cette sélectivité proviendrait d'un développement qualitativement différent des neurones pyramidaux en fonction de leur âge, qui pourrait être à l'origine d'une ségrégation fonctionnelle des neurones pyramidaux.

Ainsi, il faudrait étudier les connexions locales, telles les *réurrences* axonales grâce auxquelles les neurones pyramidaux forment des contacts avec des neurones GABAergiques, mais avec d'autres neurones pyramidaux. Ces connexions pyramide-pyramide sont d'ailleurs

souvent associées à la genèse des activités physiologiques ou épileptiformes de la région CA3 (Csicsvari et al., 2000; Ishizuka et al., 1990; Li et al., 1994. De plus, les connexions récurrentes sont plus nombreuses dans la région CA3a, où se situent la majorité des neurones précoces (voir partie résultats p90; Miles and Wong, 1986; Wittner and Miles, 2007)). En outre, nos observations suggèrent que les neurones pyramidaux précoces de CA3 semblent conserver plus de récurrences que les neurones tardifs après la deuxième semaine de vie (voir résultats).

Or Solange Brown et Shaul Hestrin ont montré que les connexions locales entre pyramides de la couche V du néocortex obéissaient à des règles de sélectivité basées sur l'identité des neurones pré et postsynaptiques. En effet, ils ont observé que les neurones à projection collosale avaient une probabilité quatre fois plus élevée de former des connexions avec le deuxième type de neurone pyramidal de la couche, les neurones à projection subcorticale, qu'avec un autre neurone à projection callosale (Brown and Hestrin, 2009; Brown and Hestrin, 2009). Au regard de ces observations, il serait intéressant de déterminer si les récurrences des neurones pyramidaux ciblent selon leur date de neurogenèse une population particulière de neurones pyramidaux de CA3.

De même, il faudrait déterminer si les neurones pyramidaux précoces sont sélectivement innervés par une population de neurones GABAergiques particulière. Cela permettrait de mettre en évidence l'imbrication des neurones pyramidaux dans des circuits locaux impliquant des neurones GABAergiques que nous avons négligés dans nos conditions expérimentales de blocage de transmission GABAergique rapide. Un schéma de connexion préférentielle entre deux sous-populations de neurones GABAergiques et pyramidaux existe dans la couche II du cortex entorhinal, où Csaba Varga et Ivan Soltesz ont mis en évidence une population de neurones GABAergiques qui innerve sélectivement les neurones pyramidaux qui projettent hors de l'hippocampe, plutôt que ceux qui innervent le gyrus denté (Sloviter et al., 1991).

Enfin, il serait intéressant de déterminer si les neurones pyramidaux de CA3 développent des connexions extra-hippocampiques distinctes en fonction de leur date de naissance. Nous avons vu que les neurones pyramidaux de CA3 développaient des connexions efférentes hippocampo-septales distinctes en fonction de leur localisation radiale dans le *stratum*

pyramidale (voir p55; Varga et al., 2010)). Dans la mesure où les neurones se répartissent également de manière radiale en fonction de leur date de naissance (voir résultats, (Manent et al., 2005)), cela suggère un lien entre la date de neurogenèse et les projections extra-hippocampiques. Cette relation entre naissance et projection à distance semble être une règle répandue dans le néocortex, à l'exception notable des neurones de la couche V du néocortex, où coexistent des neurones nés pendant les mêmes phases de la neurogenèse, mais qui développent des connexions lointaines distinctes (Koester and O'Leary, 1993).

Il semblerait que le profil de connexion des neurones pyramidaux soit déterminé pendant le développement par des facteurs de transcription particuliers (Leone et al., 2008). L'implication générale de ces facteurs de transcription dans la spécification de l'avenir fonctionnel des neurones pyramidaux sera discutée dans le paragraphe suivant.

3. Le facteur temps et l'avenir des neurones pyramidaux : une implication des facteurs de transcription ?

Nous avons discuté dans les deux paragraphes précédents de l'importance que pouvait avoir le facteur temps dans la spécification de l'avenir fonctionnel des neurones pyramidaux de CA3, en régulant de manière quantitative et qualitative les processus développementaux.

Nous débattons ici des mécanismes par lesquels le facteur temps influencerait le développement et l'identité fonctionnelle des neurones pyramidaux de CA3.

Il apparaît depuis une dizaine d'année que l'identité fonctionnelle des neurones soit le fruit d'un « code combinatoire » de facteurs de transcription qui spécifie les propriétés individuelles d'un neurone (Hevner et al., 2006; Shirasaki and Pfaff, 2002). Ce code est constitué de l'interaction entre facteurs environnementaux, facteurs intrinsèques aux neurones, de facteurs dont l'expression est restreinte temporellement, et de facteurs dont l'expression est restreinte localement (Leone et al., 2008). Ces facteurs constituent pour chaque neurone une « niche » moléculaire particulière qui influence fortement son identité future (Molyneaux et al., 2007).

Certains facteurs confèrent au neurone son identité générale, en l'occurrence celle de neurone pyramidal du cortex cérébral, et veillent au bon déroulement des processus développementaux communs. C'est le cas des facteurs de la cascade moléculaire architecte que nous avons évoquée plus tôt (voir p83). Exprimés par les précurseurs neuronaux à chaque phase de leur développement, et dans les différents compartiments que le précurseur neuronal traverse au cours de sa migration, ils affectent quantitativement le développement.

D'autres facteurs affectent de manière plus précise l'identité des neurones, et leur confèrent les propriétés fonctionnelles qualitativement distinctes d'une sous-classe de neurones, et notamment leur connectivité afférente et efférente. Dans le système visuel de la mouche, l'expression séquentielle et temporellement restreinte du facteur *sequoia* par les neurones photorécepteurs nés à des phases successives régule leur innervation du lobe optique (Petrovic and Hummel, 2008). Dans le néocortex du rongeur, l'expression de facteurs tels que Sox5, Fezf2 ou Ctip2 par les progéniteurs précoces spécifie leur avenir de neurones à projection subcorticale (Leone et al., 2008). A l'inverse l'expression par les progéniteurs plus tardifs de facteurs tels que Satb2 (Leone et al., 2008) ou Ngn2 (Hand and Polleux, 2011) implique un avenir de neurone à projection interhémisphérique (ou *callosale*). Par ailleurs, Ngn2 jouerait un rôle dans la formation des afférences thalamocorticales qui forment des contacts avec des neurones glutamatergiques néocorticaux (Seibt et al., 2003).

Dans l'hippocampe, la finesse de la couche pyramidale rend plus compliquée l'identification de niches moléculaires impliquées dans un développement qualitativement différent. Cela dit, des facteurs préalablement identifiés dans l'identité fonctionnelle des neurones pyramidaux du néocortex comme Satb2 et Sox5, sont exprimés dans des compartiments radiaux distincts dans la couche pyramidale des Cornes d'Ammon (Nielsen et al., 2010). Par ailleurs, Satb2 est co-exprimé avec le facteur Zbtb20 (Nielsen et al., 2010), qui participe à l'élaboration des projections afférentes (en provenance du Gyrus) et efférentes (vers CA1) des neurones pyramidaux de CA3 ((Xie et al., 2010), voir aussi (Slomianka et al., 2011)).

Même si rien n'a été observé dans ce sens, la ségrégation radiale de facteurs de transcription nécessaires à la spécification de la connectivité dans l'hippocampe suggère très fortement qu'une combinaison de facteurs de transcription, restreints temporellement ou

localement, serait à l'origine des différents types fonctionnels identifiés de neurones pyramidaux dans CA3.

Dans les trois paragraphes précédents, nous suggérons qu'un développement qualitativement et quantitativement différent des neurones pyramidaux précoces pourrait expliquer leur fonction centrale dans la genèse des activités épileptiformes générées en conditions de blocage de la transmission GABAergique. Nous proposons que ces neurones seraient imbriqués dans des circuits distincts, qui se traduiraient par un rôle différent dans des conditions physiologiques.

III. Un rôle fonctionnel des neurones pyramidaux précoces dans des conditions physiologiques ?

La mise en évidence d'une population de neurones pyramidaux particuliers, jouant un rôle fonctionnel remarquable lorsque la transmission GABAergique rapide est bloquée, amène naturellement à s'interroger sur leur fonction dans des conditions physiologiques, pendant lesquelles la transmission GABAergique est opérationnelle.

Nous l'avons dit dans la partie consacrée aux résultats, nous n'avons pas observé d'effet notable des neurones pyramidaux sur les activités de réseau lors de la première semaine de vie, quelle que soit leur date de naissance, en absence de transmission GABAergique rapide. Lorsque la transmission GABAergique est intacte, Bonifazi et collaborateurs ont identifié à cet âge les neurones GABAergiques « hubs » capable d'ordonner l'activité du réseau, et de moduler l'occurrence des premiers patrons d'activité corrélée du réseau, les GDPs. Ils ont également mis en évidence une population de neurones glutamatergiques fortement connectés au réseau, à l'image des hubs GABAergiques. Toutefois, à l'inverse de ces derniers, ceux-ci n'ont pas d'incidence significative à l'échelle du réseau. Ces résultats sont en accord avec nos observations, dans la mesure où aucun neurone pyramidal n'affecte significativement les activités épileptiformes pendant la première semaine de vie.

Cependant, il est difficile à ce stade d'exclure totalement l'implication des neurones pyramidaux dans la genèse des activités du réseau dans des conditions physiologiques. Il est

tendant d'imaginer un système « moteur-arbre de transmission » dans lequel les neurones pyramidaux précoces donneraient une impulsion excitatrice grâce à leurs propriétés relativement matures, impulsion qui serait par la suite transmise à travers le réseau grâce aux hubs et leurs propriétés de connectivité exceptionnelles. Selon ce modèle, les neurones GABAergiques hubs et les neurones pyramidaux précoces se connecteraient préférentiellement. Un tel profil de préférence entre neurones précoces ressemblerait à celui qui a été mis en évidence entre neurones glutamatergiques au même stade de maturation (Deguchi et al., 2011), mais aussi entre neurones de types différents en fonction de l'identité du neurone post-synaptique (Varga et al., 2010).

Afin de répondre à cette question, il faudrait effectuer plusieurs expériences ; la plus simple consiste à tester l'effet sur l'activité du réseau des neurones pyramidaux, non pas sur la base de leur connectivité fonctionnelle, comme dans (Bonifazi et al., 2009), mais sur la base de leur date de naissance. Ensuite, il faudrait étudier s'il y existe une connexion préférentielle entre neurones pyramidaux précoces et les neurones hubs.

Les périodes de neurogenèse des neurones GABAergiques et glutamatergiques sont partiellement chevauchantes (Danglot et al., 2006). Afin de distinguer sur le même tissu des neurones GABAergiques et glutamatergiques nés à des stades différents de l'embryogenèse, il faudrait d'abord concevoir un modèle de souris transgénique possédant deux systèmes d'induction de marqueurs fluorescents (RFP, GFP), permettant de marquer sélectivement les deux types de neurones en fonction de leur date de neurogenèse.

Grâce à un tel système, nous mesurerions la connectivité effective grâce à des enregistrements électrophysiologiques classiques en « paires » de neurones GABAergiques hubs et de pyramidaux précoces, ou de neurones contrôles. Nous pourrions également effectuer un enregistrement en patch-clamp simple couplé à une stimulation optogénique (par la technique du *glutamate uncaging*, voir résultats) en ciblant de la même façon des neurones hubs, pyramidaux précoces, ou contrôles.

Nous avons également vu dans la partie résultats qu'après la deuxième semaine de vie, les neurones nés pendant les phases les plus précoces du développement glutamatergique étaient capables d'affecter les dynamiques du réseau en l'absence de transmission GABAergique rapide. A cet âge, lorsque la transmission GABAergique est intacte, le réseau hippocampique est impliqué dans des activités de réseau qui participent à des processus

cognitifs majeurs, tels que les activités rythmiques gamma et thêta, ou encore les activités de type sharp waves ripples. Or de nombreuses publications suggèrent que les neurones pyramidaux hippocampiques se comportent de manière hétérogène pendant ces activités (Bland et al., 2005; Mizuseki et al., 2011; Senior et al., 2008). De plus, certains de ces travaux ont montré que cette diversité fonctionnelle se calque sur une répartition radiale (Mizuseki et al., 2011) qui ressemble fortement à celle que suivent les neurones en fonction de leur date de naissance ((Altman and Bayer, 1990; Manent et al., 2005), voir aussi partie résultats).

Il serait intéressant de déterminer si les neurones pyramidaux précoces jouent un rôle fonctionnel distinct dans la rythmicité de l'hippocampe. On peut imaginer que ces neurones seraient capables de réinitialiser les rythmes en fonction du contexte et des informations afférentes extra-hippocampiques. Des travaux suggèrent en effet qu'une fraction de cellules pyramidales de CA3 est capable de dicter individuellement le rythme du réseau de CA1 (Mikkonen et al., 2006). Pour répondre à cette question, il faudrait utiliser un modèle *in vitro* qui permettrait à la fois d'enregistrer des rythmes (Fisahn et al., 1998; Fishell and Hanashima, 2008) et de visualiser les neurones pyramidaux marqués en fonction de leur âge. Nous pourrions alors étudier le comportement passif (phase, préférence de décharge) des neurones pyramidaux nés à différents stades. Enfin, nous pourrions déterminer leurs propriétés fonctionnelles actives en observant l'effet de leur manipulation (par des protocoles de stimulation similaire à (Bonifazi et al., 2009)) sur l'activité oscillatoire de l'hippocampe. Ce projet ouvre également une perspective *in vivo*, qui permettrait d'identifier des neurones et des circuits centraux dans l'émergence de rythmes et de leurs fonctions associées, qui surviennent au cours des différents états de veille cérébraux.

En ce qui concerne les activités en bouffées telles que les sharp waves ripples (SPW-R), les travaux d'Ellender et collaborateurs montrent qu'une population de neurones GABAergiques à cibles périsomatiques pouvait déterminer la fenêtre temporelle de leur occurrence (Ellender et al., 2010). En revanche, ils suggèrent que les neurones pyramidaux ne peuvent effectuer cette fonction, quelles que soient leurs propriétés physiologiques intrinsèques (une décharge régulière ou en bouffée de potentiels d'action) ou fonctionnelles (leur capacité à initier des décharges épileptiformes en absence de transmission GABAergique rapide, d'après (Miles and Wong, 1983). Toutefois, il serait intéressant de revisiter leurs

observations avec un plus grand échantillon de neurones, et cette fois en prenant en compte le paramètre de l'âge individuel des neurones. Il s'agirait encore une fois d'utiliser un modèle *in vitro* de SPW-R et de soumettre les neurones générés à différents stades de développement à un protocole de stimulation afin de mesurer leur impact sur l'activité du réseau.

Enfin, il est possible que les neurones pyramidaux jouent un rôle fonctionnel distinct dans les mécanismes de représentation spatiale en fonction de leur date de neurogenèse. Récemment, une étude effectuée *in vivo* dans l'hippocampe a montré que le recrutement de neurones pyramidaux en tant que cellules de lieu dans un nouvel environnement était favorisé par des propriétés intrinsèques telles qu'un mode de décharge en bouffées (Epsztein et al., 2011). De plus, d'autres études ont montré que la proportion de cellules de lieu et de cellules déchargeant des potentiels d'action en bouffée était plus importante dans la partie la plus profonde du stratum pyramidale (Misuzeki 2011). Or nos résultats montrent que les neurones pyramidaux nés pendant les stades les plus précoces de la neurogenèse sont situés dans la partie la plus profonde de CA3 et génèrent souvent des bouffées de potentiels d'action. Il faudrait tester s'il existe une relation entre l'âge de naissance des neurones pyramidaux et leur probabilité de recrutement comme cellule de lieu pendant l'exploration et la mémorisation d'un environnement, en utilisant par exemple des techniques d'imagerie *in vivo* chez l'animal éveillé (Dombeck et al., 2010).

IV. Un rôle fonctionnel des neurones pyramidaux précoces dans des conditions pathologiques ?

Le cortex en général et la région CA3 en particulier sont impliqués dans un certain nombre de pathologies, telles que les épilepsies, qui se manifestent par des activités excessives et souvent hypersynchrones des neurones. Or les traitements actuels des épilepsies ne présentent pas une spécificité cellulaire particulière ; les médications les plus couramment utilisées affectent souvent les neurones GABAergiques, et plus rarement glutamatergiques, en modulant leur transmission synaptique. En revanche, ils ne ciblent pas une sous-population neuronale, ni même une structure cérébrale particulière. Pourtant, des études

effectuées chez des patients montrent que les neurones du néocortex ont un comportement de décharge très hétérogène pendant les crises d'épilepsies, indépendamment de leur identité GABA ou glutamatergique (Truccolo et al., 2011). Cela suggère que certaines populations de neurones particulières pourraient jouer un rôle fonctionnel distinct dans le contexte épileptique. Cela ouvrirait des perspectives intéressantes dans la mesure où une stratégie thérapeutique ciblant un type cellulaire particulier pourrait être efficace tout en limitant les effets délétères sur les fonctions normales du cerveau.

Dans ce contexte, la mise en évidence de neurones fonctionnellement remarquables au niveau du réseau, tels les neurones GABAergiques « hubs » (Bonifazi et al., 2009; Picardo et al., 2011), les neurones pyramidaux « pacemakers » (Wittner et al., 2006), ou encore les neurones pyramidaux nés tôt (voir partie résultats), pourrait constituer un bon sujet d'exploration scientifique dans une perspective thérapeutique sur le long terme. En effet, on peut imaginer que le réseau épileptique s'appuie sur leurs caractéristiques exceptionnelles pour générer des activités pathologiques.

Les neurones hubs n'ont pas été caractérisés dans un contexte pathologique. A l'inverse, les neurones pyramidaux pacemakers et les neurones précoces ont été mis en évidence dans un modèle de crises générées par blocage de la transmission GABAergique rapide dans l'hippocampe de rongeur. Quelle est la pertinence d'un tel modèle par rapport au domaine de la clinique ? Tout d'abord, les crises générées dans ce modèle présentent des similarités avec les activités enregistrées dans un contexte épileptique humain (Khalilov et al., 1997; Khalilov et al., 1999). De plus, certains travaux récents suggèrent que même lorsque la transmission GABAergique n'est pas bloquée pharmacologiquement, celle-ci peut être réduite ou absente dans certaines conditions. Andy Trevelyan a montré dans la couche V du néocortex que les neurones subissent un « barrage » inhibiteur GABAergique qui restreint spatialement les activités épileptiformes déclenchées par une faible concentration en magnésium. Après la répétition d'un certain nombre de crises, ces barrages subissent une rupture progressive qui laisse passer le flot excitateur (Trevelyan et al., 2006). Plus récemment, l'équipe de Richard Miles a travaillé sur des tissus extraits du subiculum de patients souffrant d'épilepsie. Ce faisant, ils ont remarqué que la transition d'un stade d'activité épileptiforme récurrent et rapide (de type *interictal*) vers une activité épileptiforme prolongée (de type *ictale*, associé aux *crises d'épilepsies* proprement dites)

nécessitait un troisième type d'activité de transition, appelée *pré-ictale*. Or ces activités pré-ictales de « transition » sont générées par la transmission glutamatergique, et non par la transmission GABAergique, contrairement aux activités interictales et ictales (Huberfeld et al., 2011). Ces observations qui suggèrent que les neurones glutamatergiques peuvent partiellement ou transitoirement « se passer » de la transmission GABAergique pour générer des activités épileptiformes souligne l'intérêt de travailler sur un tel modèle pour comprendre certains mécanismes de genèse des activités pathologiques.

Cependant, le modèle de blocage de la transmission GABAergique ne représente pas complètement la réalité clinique dans la mesure où la transmission GABAergique est non seulement rarement « muette », mais elle est au contraire quelque fois amplifiée dans des modèles chroniques d'épilepsie (Cossart et al., 2005). De plus, il s'agit d'un modèle *aigu* de crises d'épilepsie, c'est-à-dire que l'addition d'un agent (en l'occurrence des bloquants de la transmission GABAergique rapide) provoque d'activités épileptiformes, de manière réversible. Or en clinique, un certain nombre d'épilepsies sont dues à des modifications chroniques et irréversibles des propriétés des structures, qui persistent à générer spontanément des crises même en l'absence de facteur déclencheur apparent.

C'est pourquoi nous pourrions étudier l'implication de neurones pyramidaux nés à différents stades du développement, cette fois dans des modèles *in vitro* chroniques qui reproduisent plus finement le contexte épileptique clinique.

Nous pourrions utiliser le modèle de *foyers en miroir*, qui reproduit les mécanismes d'épileptogenèse secondaire chez des rongeurs nouveaux-nés (Khalilov et al., 2003). Ce modèle est basé une préparation d'hippocampes interconnectés et perfusés indépendamment. L'addition d'un agoniste glutamatergique (le *kainate*) dans l'un des hippocampes (appelé *ipsilatéral*) provoque l'apparition de crises, lesquelles se propagent via les commissures vers l'hippocampe opposé (ou *controlatéral*). La répétition du protocole entraîne une modification durable des propriétés de l'hippocampe controlatéral, qui génère à son tour des crises indépendamment. Ce modèle permet d'étudier *in vitro* le rôle fonctionnel des neurones pyramidaux de la région CA3 dans des conditions où celle-ci génère des activités épileptiformes en l'absence de modulateur pharmacologique de la transmission synaptique.

Une des principales limites au modèle des foyers en miroir est qu'il est conçu pour des hippocampes de souris âgées d'une semaine. Or les neurones pyramidaux ne semblent pas avoir à cet âge d'effet notable ni sur les activités physiologiques (Bonifazi et al., 2009) ni sur les crises aiguës (voir résultat) de l'hippocampe immature. Il serait alors intéressant d'étudier l'impact fonctionnel des neurones pyramidaux précoces dans un modèle chronique de crises sur des souris plus matures. Un des modèles qui pourrait convenir est le modèle de rongeurs traités par un agoniste cholinergique de type muscarinique, la *pilocarpine*. Ce protocole reproduit *in vivo* certains symptômes de l'épilepsie du lobe temporal tels que l'apparition spontanée d'activités épileptiformes générées dans l'hippocampe, qui vont de pair avec des modifications structurelles importantes dans cette région cérébrale (Cavalheiro et al., 1996; Curia et al., 2008; Turski et al., 1983; Turski et al., 1983). Il est possible d'étudier *in vitro* des tranches issues des souris traitées. Ainsi, des études ont montré que les activités épileptiformes sont générées dans la même région (CA3 a/b) où démarrent également les activités épileptiformes générées en l'absence de transmission GABAergique rapide (McCloskey and Scharfman, 2011; Wittner et al., 2006). Cela suggère que les mécanismes d'initiation des activités épileptiformes seraient communs dans les deux conditions, et que les neurones pyramidaux précoces pourraient jouer un rôle central dans la pathologie de l'hippocampe.

V. Un réseau organisé autour de ses éléments les plus précoces ?

Nous avons identifié, en l'absence de transmission GABAergique rapide, une population de neurones pyramidaux capables de générer des activités de réseau individuellement à des stades juvéniles, et en groupes de neurones du même âge à des stades précoces du développement. Cette capacité provient de propriétés morpho-physiologiques particulières, et surtout d'une date de neurogenèse précoce chez cette catégorie de neurones pyramidaux.

La mise en évidence de cette population de neurones, peu après la mise en évidence d'une population de neurones GABAergiques « hubs » au profil similaire dans l'hippocampe (Picardo et al., 2011) appuie l'hypothèse d'une règle répandue selon laquelle une date de naissance précoce favorise un poids fonctionnel considérable dans le réseau.

Comme nous l'avons évoqué en préambule, il est possible que le rôle central de ces neurones dans leur réseau provienne de leur connectivité. Paolo Bonifazi et ses collaborateurs ont montré qu'il existait dans la région CA3 une fraction de neurones GABAergiques hubs très densément connectés (Bonifazi et al., 2009) qui sont des neurones GABAergiques précoces (Picardo et al., 2011). Ils ont également identifié des neurones pyramidaux fortement connectés, qui pourraient être les neurones pyramidaux précoces que nous avons décrits.

Le lien entre qui pourrait exister entre le développement précoce, la forte connectivité et le rôle central d'un neurone a été prédit théoriquement par Albert-Lazlo Barabási et Réka Albert. Ces derniers ont suggéré que les réseaux étaient générées avec des règles de « liaisons préférentielles » (*preferentially attachment*, voir [Sporns, 2011 *](#)). Selon ces règles, lorsque la taille du réseau croît par ajout progressif de nouveaux *nœuds*, ces derniers se connectent préférentiellement aux nœuds préexistants possédant un *degré* élevé (un nœud représente un élément du réseau, le degré le nombre de connexions, voir (Feldt et al., 2011)). Rapporté aux neurosciences, ce modèle prédit que les neurones néo-générés se fixeraient préférentiellement sur les neurones plus précoces, qui sont à un stade de maturation plus avancé, et seraient déjà connectés à leur environnement. Or une telle

convergence des afférences vers les neurones les plus matures a été observée expérimentalement (Hennou et al., 2002; Tyzio et al., 1999). Cela expliquerait comment les processus développementaux favoriseraient l'émergence d'un rôle fonctionnel central des neurones les plus précoces.

De plus, d'après ce concept, les règles de liaison préférentielles favoriseraient l'élaboration d'une architecture du réseau organisée autour de nœuds centraux. Or une telle architecture organisée a été effectivement identifiée dans la région CA3 et le gyrus denté de l'hippocampe (Bonifazi et al., 2009; Morgan and Soltesz, 2008).

Pour faire écho au préambule, nous sommes confrontés au fossé entre les propriétés microscopiques (celles d'un neurone individuel) et les propriétés macroscopiques (celles du réseau), car l'émergence du réseau ne provient pas de la somme arithmétique des propriétés des éléments individuels. Nous proposons que le lien entre les propriétés microscopiques et macroscopiques est prédit à l'échelle d'un neurone individuel par le facteur temps, via la date de neurogenèse.

Annexes :



Onset of pup locomotion coincides with loss of NR2C/D-mediated cortico-striatal EPSCs and dampening of striatal network immature activity

Nathalie Dehorter^{1,2,3}, François J. Michel^{1,2,3}, Thomas Marissal^{1,2,3}, Yann Rotrou^{4,5}, Boris Matrot^{4,5}, Catherine Lopez^{1,2,3}, Mark D. Humphries⁶ and Constance Hammond^{1,2,3}*

¹ INSERM Unité 901, Marseille, France

² UMR S901 Aix-Marseille 2, Université de la Méditerranée, Marseille, France

³ INMD, Marseille, France

⁴ INSERM Unité 676, Hôpital Robert Debré, Paris, France

⁵ Université Paris Diderot, Paris, France

⁶ Laboratoire de Neurosciences Cognitives, INSERM Unité 960, Ecole Normale Supérieure, Paris, France

Edited by:

Enrico Cherubini, International School for Advanced Studies, Italy

Reviewed by:

Enrico Bracci, University of

Manchester, UK

Paolo Calabresi, Santa Maria Della

Misericordia Hospital, Italy

*Correspondence:

Constance Hammond, Institut de Neurobiologie de la Méditerranée, INSERM UMR 901, 163 route de Luminy, BP13, 13273 Marseille Cédex 9, France.
e-mail: hammond@inmed.univ-mrs.fr

Adult motor coordination requires strong coincident cortical excitatory input to hyperpolarized medium spiny neurons (MSNs), the dominant neuronal population of the striatum. However, cortical and subcortical neurons generate during development large ongoing patterns required for activity-dependent construction of networks. This raises the question of whether immature MSNs have adult features from early stages or whether they generate immature patterns that are timely silenced to enable locomotion. Using a wide range of techniques including dynamic two-photon imaging, whole cell or single-channel patch clamp recording in slices from Nkx2.1-GFP mice, we now report a silencing of MSNs that timely coincides with locomotion. At embryonic stage (as early as E16) and during early postnatal days, genetically identified MSNs have a depolarized resting membrane potential, a high input resistance and lack both inward rectifying (I_{KIR}) and early slowly inactivating (I_D) potassium currents. They generate intrinsic voltage-gated clustered calcium activity without synaptic components. From postnatal days 5–7, the striatal network transiently generates synapse-driven giant depolarizing potentials when activation of cortical inputs evokes long lasting EPSCs in MSNs. Both are mediated by NR2C/D-receptors. These immature features are abruptly replaced by adult ones before P10: MSNs express I_{KIR} and I_D and generate short lasting, time-locked cortico-striatal AMPA/NMDA EPSCs with no NR2C/D component. This shift parallels the onset of quadruped motion by the pup. Therefore, MSNs generate immature patterns that are timely shut off to enable the coordination of motor programs.

Keywords: development, basal ganglia, striatum, immature activity, locomotion, patch clamp, two-photon imaging, mouse pup

INTRODUCTION

Adult medium spiny neurons (MSNs), the GABAergic principal neurons of the striatum, have unique features required for the appropriate selection of motor programs (Grillner et al., 2005). They are highly hyperpolarized at rest and require strong coincident excitatory glutamatergic inputs for the execution of appropriate movements (Wilson and Kawaguchi, 1996). These unique features are due to strong inward rectifying (I_{KIR}) and slow inactivating (I_D) potassium currents and feedforward and feedback afferent inhibition that confer a low input resistance, hyperpolarized resting potential, and a long delay to initial spiking (Tepper et al., 2004). In a large range of animal species and brain structures, immature neurons are highly excitable and developing networks generate network-driven patterns that are instrumental in neuronal growth, synapse formation, and the formation of functional circuits (for review Ben-Ari, 2002; Spitzer, 2006; Huberman et al., 2008; Blankenship and Feller, 2010). These observations raise the

question whether MSNs differ from other neuronal types and are silent from early developmental stages and if not when and how are the early patterns switched off to enable correct motor coordination and quadruped motion.

Medium spiny neurons originate in the lateral ganglionic eminence (Deacon et al., 1994; Olsson et al., 1998) and migrate radially into the developing striatum compartments (Van Der Kooy and Fishell, 1987). To understand MSN functional maturation, we targeted embryonic and early postnatal MSNs with the use of Nk2 homeobox 1 (Nkx2.1)-GFP Mice. Nkx2.1, also known as thyroid transcription factor-1 (TTF-1), is a protein that regulates transcription of genes and is specifically expressed by interneurons but not by MSNs in the striatum (Nobrega-Pereira et al., 2008). We determined MSNs' cellular properties using whole cell and single-channel recordings. In parallel we performed two-photon dynamic imaging that enables to determine the activity of large neuronal samples in slice preparation (Crepel et al., 2007). We

then used behavioral analysis to describe posture and onset of locomotion in newborn pups. We report an abrupt switch of cellular and synaptic properties in MSNs in parallel with the initiation of locomotion.

MATERIALS AND METHODS

EMBRYONIC AND POSTNATAL SLICE PREPARATIONS

We performed experiments in embryonic (E14, E16, E18) or postnatal (P0–P45) wild type C57BL/6 mice (Janvier, France) or Nkx2.1-GFP mice of either sex obtained by crossing Nkx2.1-CRE C57BL/6 mice (Jackson lab) and the RCE:LoxP reporter strain (Sousa et al., 2009). We anesthetized pregnant mice with xylazine (Rompun 2%; used at 0.05%) and ketamine (Imalgene 1000; used at 50 g/l; Volume injected: 0.2 ml/g) and postnatal mice with isoflurane. We kept brains in ice-cold oxygenated solution containing (in mM): 110 choline, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 7 MgCl₂, 0.5 CaCl₂, 25 NaHCO₃, 7 glucose, and performed coronal, parasagittal, or horizontal slices (400 μ m thick) using a vibratome (VT1200 Leica Microsystems Germany). During the recovery period, slices were placed at room temperature (RT) with standard artificial cerebrospinal fluid (ACSF) saturated with 95% O₂/5% CO₂ and containing (in mM): 126 NaCl, 3.5 KCl, 1.2 NaH₂PO₄, 1.3 MgCl₂, 2 CaCl₂, 25 NaHCO₃, 11 glucose.

CALCIUM IMAGING

Slices were incubated for 30 min in 2.5 ml of oxygenated ACSF (35–37°C) with 25 μ M fura 2AM (1 mM, in DMSO + 0.8% pluronic acid; Molecular Probes). Imaging was performed with a multi-beam two-photon laser scanning system (Triscope-LaVision Biotec) coupled to an Olympus microscope with a high numerical aperture objective (20 $\times$, NA 0.95, Olympus). Images of the scan field (444 μ m $\times$ 336 μ m) were acquired via a CCD camera (4 $\times$ 4 binning; La Vision Imager 3QE) with a time resolution of 115–147 ms (non-ratiometric 1000–3000 images, laser at 780 nm) as previously described (Crepel et al., 2007). In slices from Nkx2.1-GFP mice, we first took images of the GFP-expressing neurons (laser at 910 nm) before acquiring spontaneous fura 2 fluorescence changes (laser at 780 nm). To patch clamp record particular neurons Fura pentapotassium salt (30 μ M; Invitrogen) was added to the pipette solution to keep cells fluorescent.

PATCH CLAMP RECORDINGS

Cells were visualized with infrared-differential interference optics (Axioskop2; Zeiss). We performed recordings at 35–37°C. For current clamp recordings, the pipette contained (in mM): 15 KCl, 5 NaCl, 125 KMeSO₄, 10 HEPES, 2.5 Mg-ATP, 0.3 Na-GTP. For whole cell voltage-clamp recordings of postsynaptic GABA_A (sIPSCs) and glutamatergic (sEPSCs) currents, the pipette (6–10 M Ω) contained (in mM): 120 Cs-gluconate, 13 CsCl, 1 CaCl₂, 10 HEPES, 10 EGTA, pH 7.2–7.4 (275–285 mOsm). We recorded sIPSCs at the reversal potential of sEPSCs (+10 mV). To record sEPSCs we continuously applied a GABA_A receptor antagonist (bicuculline 20 μ M or Gabazine 5 μ M), and maintained the membrane potential at –80 or +40 mV to separately detect AMPA/kainate (KA) and NMDA sEPSCs, respectively (Groc et al., 2002). We recorded AMPA/KA sEPSCs in the continuous presence of APV (40 μ M), the selective NMDA receptor antagonist,

and separated AMPA from KA sEPSCs by applying NBQX at a dose (1 μ M) that preferentially blocks AMPA receptors. We identified NMDA sEPSCs at +40 mV by their kinetics (the NMDA decay time is longer than the AMPA one) or insensitivity to the AMPA/KA receptor antagonist, NBQX (10 μ M).

To record unitary GABA_A currents the pipette (4–5 M Ω) contained (in mM): 120 NaCl, 20 TEA-Cl (tetraethylammonium chloride), 5 KCl, 5 4-aminopyridine, 0.1 CaCl₂, 10 MgCl₂, 10 glucose, 5 GABA, 5 isoguvacine, 3 CsCl, 10 HEPES-NaOH buffered to pH 7.2–7.3; osmolality of 300–320 mOsm. When Gabazine 10 μ M was added to the above pipette solution no unitary currents were recorded. To record unitary NMDA currents, the pipette (4–5 M Ω) contained (in mM): 140 NaCl, 3.5 KCl, 1.8 CaCl₂, 10 HEPES, 10 NMDA, 10 glycine, 1 strychnine, buffered to pH 7.43; osmolality of 300–320 mOsm. When APV (40 μ M) was added to the pipette solution, no unitary currents were recorded. To identify the morphology of neurons recorded in cell-attached configuration, we re-patched them with a conventional whole cell electrode containing neurobiotin (Abcys).

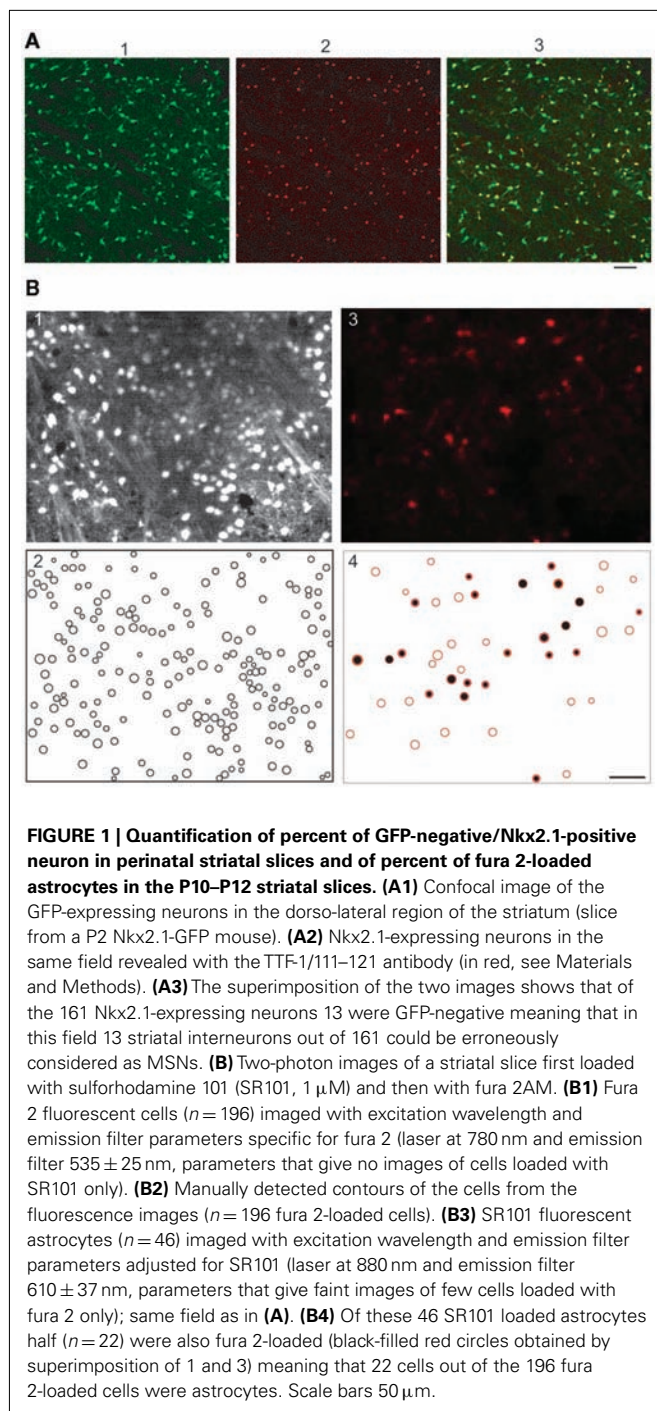
IDENTIFICATION OF IMMATURE MSNs VS. INTERNEURONS OR VS. ASTROCYTES

Since embryonic and early postnatal MSNs lack their characteristic adult K⁺ currents, they could not be identified from their electrophysiological properties. We therefore identified them as GFP-negative neurons (Sousa et al., 2009) in striatal slices from Nkx2.1-GFP mice. To quantify the proportion of Nkx2.1-positive striatal interneurons that faintly expressed GFP and were therefore considered as MSNs, we performed immunocytochemistry of Nkx2.1 (see below; **Figure 1A**). From a total of 2767 Nkx2.1-expressing striatal neurons labeled with TTF-1 (red), 75% were also GFP positive (yellow, $n = 2077$), showing that in perinatal slices from Nkx2.1-GFP mice, 25% of the Nkx2.1-positive neurons, though GFP-negative, were not MSNs. In our two-photon recordings, GFP positive/fura 2-loaded neurons represented 10–20% of all fura 2-loaded cells. Therefore instead of 10–20% interneurons, we had around 13–27% interneurons in the field. We thus overestimated the proportion of MSNs by 3–7%.

To quantify the proportion of fura 2-loaded cells that were astrocytes and not neurons in slices from P10 to P12 mice, and could be erroneously considered as silent neurons, we performed double loading of slices with sulforhodamine 101 (SR101, 1 μ M), a specific marker of astroglia (Nimmerjahn et al., 2004) during 20 min at 35–37°C and then with fura 2AM (**Figure 1B**). At P12, astrocytes represented around 25% of all the imaged cells ($n = 201/815$ from five slices). Among these astrocytes, around 40% were also positive for fura 2 ($n = 86/201$). Therefore around 10% of fura 2-loaded cells were astrocytes ($n = 86/815$). All these fura 2-loaded astrocytes were silent and could be erroneously counted as silent neurons.

IMMUNOCYTOCHEMISTRY AND DiI EXPERIMENTS

To reveal the neurobiotin injected during whole cell recordings, the sections were left 12 h in paraformaldehyde (3%) at 4°C, rinsed in PBS, left 12 h in PB-sucrose 20%, and then at –80°C for at least 2 h. They were thawed at RT, rinsed in PB and incubated



30 min in 1% H_2O_2 in PB. Slices were washed with PB and KPBS and incubated for 12 h in ABC complex at a dilution of 1:100 in KPBS + 0.3% triton (Abcys). They were rinsed in KPBS and incubated for approximately 10 min in 3,3'-diaminobenzidine (DAB 0.7 mg/ml) with peroxide (0.2 mg/ml; Sigma Fast), rinsed, mounted in Crystal/Mount (Electron Microscopy Sciences), coverslipped, and examined. Dendritic and axonal fields were reconstructed using the Neurolucida system (MicroBrightField Inc., Colchester, VT, USA).

To reveal the Nkx2.1-positive neurons we used the antibody TTF-1/111–121. Slices were cryoprotected in PB with 20% sucrose, freeze-thawed in isopentane, and rinsed in PB. Slices were then incubated in PBS Triton 0.3% normal goat serum (NGS, 2%) for 1 h and then in Nkx2.1 antibody (1:2500; TTF-1/111–121; Biopat, Italy) for 4 days at RT. After thorough rinsing, slices were incubated for 90 min at RT in alexa-488 goat anti-mouse (1:300; Molecular Probes, Leiden, the Netherlands) in PBS and NGS 2% overnight. After thorough rinsing, slices were mounted in fluoromount, coverslipped, and examined with a confocal microscope (Zeiss LSM 510). For double immunocytochemistry Neurobiotin-Nkx2.1, slices were treated as above for the revelation of Nkx2.1. Then after thorough rinsing, slices were again incubated in PBS and Cy3 streptavidin (1:300; Jackson, USA) to label the neurobiotin-loaded neuron(s) and then rinsed. After thorough rinsing, slices were mounted in fluoromount, coverslipped, and examined with a confocal microscope (Zeiss LSM 510).

To visualize cortico-striatal axons, we injected small amounts of DiI crystals diluted in ethanol in the neocortex of 400 μ m thick slices from E16 to P2 brains postfixed by immersion for 2–4 weeks in 4% paraformaldehyde. Slices were then incubated in the fixative solution at 32°C for 2–3 weeks, coverslipped, and examined with a confocal microscope (Zeiss LSM 510).

ANALYSIS OF IMAGING DATA

We performed analysis of the calcium activity with custom-made software written in Matlab (MathWorks; Bonifazi et al., 2009). The contour of each loaded cell was semi-automatically detected and its fluorescence measured as a function of time. Active cells are neurons exhibiting any Ca^{2+} event of at least 5% DF/F deflection within the period of recording. Ca^{2+} spikes or Ca^{2+} plateaus were neurons exhibiting at least one Ca^{2+} spike or one Ca^{2+} plateau within the period of recording. Ca^{2+} plateaus were intrinsic correlated Ca^{2+} events of long duration (see Results). Giant depolarizing potentials (GDP) cells were cells generating synchronized synapse-driven Ca^{2+} spikes (GDPs). To compute the activity correlation of two cells, the onset of each event was represented by a Gaussian ($s = 1$ frame, to allow some jitter). The inner product of the resulting values was then calculated. The significance of each correlation value was estimated by direct comparison with a distribution computed from surrogate data sets, in which the events were randomly reshuffled in time.

To compare both network-wide and single-neuron activity between putative intrinsically driven activity at P2 (P2–P3 recordings) and synaptically driven activity at P6 (P5–P7 recordings), we used standard k -means clustering to determine how well event durations and frequencies distinguished P2 and P6 time-points. The k -means algorithm used minimization of city-block distance, with 30 replications from random starting positions, from which we retained the replicate with the minimum mean distance. We also sought evidence for differences in spontaneous neural ensembles in network-wide activity. Each recording's matrix of pair-wise correlations, computed by Gaussian convolution as above was partitioned into groups using a modified community detection algorithm, detailed in Humphries (2011), which finds the number and size of groups within the matrix that maximize benefit function $Q_{data} = (\text{similarity within groups}) - (\text{expected similarity within})$.

groups). The resulting partition thus corresponded to groups of neurons that were more similar in activity patterns than was expected given the total similarity of each neuron's activity to the whole data-set. We then ran a further stringent control for potentially spurious groupings, by first shuffling the inter-event intervals of each neuron in a recording, correlating the shuffled event onsets, and then running the algorithm on the shuffled data-set. This was repeated 100 times to get a distribution of Q for control data. The 95th percentile of these values was taken as the 95% confidence interval Q_{ctrl} . Any network with $Q_{\text{data}} > Q_{\text{ctrl}}$ thus contained significant ensemble structure, compared to that expected from just the firing statistics of the network.

ANALYSIS OF ELECTROPHYSIOLOGICAL DATA

We determined series resistance (R_s), membrane capacitance (C_m), and input resistance (R_{input}) by on-line fitting analysis of the transient currents in response to a 5-mV pulse at -70 mV. Criteria for considering a recording included $R_{\text{input}} > 100$ M Ω , $R_s < 25$ M Ω , with $R_s < 30\%$ change. We analyzed spontaneous postsynaptic currents (sPSCs) in 180 s recordings at a given membrane potential with the Mini-Analysis program (version 5.1.4; Synaptosoft, Decatur, GA, USA). Events were characterized by the following parameters: rise time (10–90%), amplitude, and decay time (τ). We discriminated mixed AMPA/K_A events in the absence of specific receptor antagonists from the SD given by the fit of each event to determine whether one or two exponentials best fitted the decays (Epszstein et al., 2005). E16–P5 MSNs generating sEPSCs (61 out of 131) or sIPSCs (33 out of 79) with a frequency lower than 0.05 Hz were not included.

We filtered the single-channel currents at 1 kHz (GABA_A channels) or 3 kHz (NMDA channels) and digitized them at 10 kHz. We discarded multilevel and short (2 ms) openings during the analysis. To obtain unitary current–voltage (I – V) relationships, we measured the amplitude of unitary GABA and NMDA currents evoked by steps from -120 to $+40$ mV. Histograms of cursor-measured amplitudes allowed determination of the mean unitary current amplitude at each voltage tested.

Measurements of V_{rest} and $E_{\text{GABA(A)}}$: to determine the action of GABA in a given neuron (depolarizing or hyperpolarizing), one must measure the reversal potential of the GABA_A-mediated current [$E_{\text{GABA(A)}}$] and the resting membrane potential (V_{rest}). However, conventional whole cell recordings introduce a number of errors in these measures in particular in developing neurons. We therefore estimated the value of V_{rest} from cell-attached recordings of the single-channel NMDA current ($i\text{NMDA}$), which is known to reverse at a membrane potential (V_m) close to 0 mV. We plotted the relationship between $i\text{NMDA}$ and the extracellular potential applied to the patch of membrane (V_p) from experimental data (see Figure 9B). This curve [$i\text{NMDA} = f(V_p)$] gives the value of V_p when $i\text{NMDA} = 0$ pA. At this value of V_p , single-channel NMDA current is null because $V_m = V_p - V_{\text{rest}} = 0$ mV. This allows estimation of V_{rest} ($V_{\text{rest}} = V_p$). To estimate [$E_{\text{GABA(A)}}$], we plotted the relationship between the single-channel GABA_A current ($i\text{GABA}_A$) and V_p . This curve [$i\text{GABA}_A = f(V_p)$] gives the value of V_p when $i\text{GABA}_A = 0$ pA (see Figure 9A), because by definition when $i\text{GABA}_A$ is null, $V_m = E_{\text{GABA(A)}}$. Therefore, when $i\text{GABA}_A = 0$ pA, $V_m = V_p - V_{\text{rest}} = E_{\text{GABA(A)}}$

(i.e., $E_{\text{GABA(A)}} - V_{\text{rest}} = -V_p$). By definition, $E_{\text{GABA(A)}} - V_{\text{rest}} = \text{DF}_{\text{GABA}}$, the driving force (DF) of chloride ions through the GABA_A channel (Tyzio et al., 2003). Therefore, when $i\text{GABA}_A = 0$ pA, $\text{DF}_{\text{GABA}} = -V_p$. Knowing V_{rest} and DF_{GABA} , it is easy to calculate $E_{\text{GABA(A)}} = \text{DF}_{\text{GABA}} + V_{\text{rest}}$.

To obtain whole cell current–voltage (I – V) relationships, we measured voltages at the end of each hyperpolarizing current step (950 ms). The inward rectification was detected when the I – V relationship was not linear between -90 and -120 mV. To compare immature and adult MSNs delay of firing in response to depolarizing steps, we measured the first interspike interval (ISI) of the response. We then pooled the slope values of the linear regression lines and compared their distribution as a function of time (Belleau and Warren, 2000). We estimated the threshold potential for Na⁺ spikes in whole cell current clamp recordings at V_{rest} (-70 mV for E16–P7 slices and -80 mV for the adult slices) by applying successive intracellular depolarizing steps (duration 950 ms) or in response to cortical stimulation.

DRUGS

Drugs were prepared as concentrated stock solutions and diluted in ACSF for bath application: bicuculline 20 μM , Gabazine 5 μM , GABA_A receptor antagonists; (2*R*)-amino-5-phosphonovaleric acid (APV) 40 μM , a NMDA receptor antagonist and (2*S**, 3*R**)-1-(Phenanthren-2-carbonyl)piperazine-2,3-dicarboxylic acid (PPDA) 100 nM, a NR2C/D subunits antagonist; 6-cyano-7-nitroquinoxaline 2,3-dione (CNQX) 10 μM , and (2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo[f]quinoxaline-2,3-dione)(NBQX) 1–10 μM , AMPA/kainate receptor antagonists. Nifedipine, an L-type Ca²⁺ channel antagonist; Ω -Conotoxin GVIA, an N-type Ca²⁺ channel antagonist; Ω -Agatoxin IVA a P/Q type Ca²⁺ channel antagonist; Isoguvacine 100 μM , a GABA_A receptor agonist, was locally pressure-applied. All drugs were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA) except PPDA from Tocris and N or P/Q type antagonists from Alomone Labs.

MOTOR BEHAVIOR

Motion development was assessed in Swiss newborn mice ($n = 16$) from two different litters (Janvier SAS, Le Genest Saint Isle, France) between postnatal day 2 (P2, day of birth: P0) and P12. C57BL/6 pups could not be tested because of their low weight. We used an open field test to assess overall activity. We tested each pup twice a day, with a 20-min delay between the two tests. We placed the pup on a translucent acrylic plate (24 cm $\times$ 16 cm) covered with a silicone gel. Two cameras were placed below the plate. One acquired the pup's contact points with the floor which appeared as highly contrasted areas, based on the frustrated total internal reflection (FTIR) principle (Han, 2005). We identified the mouse abdominal contact points using custom-made software. The second camera acquired the trajectory of the pup. We calculated from this trajectory the total distance traveled, and the total distance traveled along straight line segments.

STATISTICS

Average values are presented as means $\pm$ SEM and we performed statistical comparisons with Student's t -test (SigmaStat 3.1, Origin 5.0), Mann–Whitney rank sum test (SigmaStat 3.1) or one way

ANOVA (Tukey's Test as *post hoc* test; SigmaStat 3.1, Origin 5.0). The appropriate descriptive statistic was chosen on this basis, as denoted in the text. We set the level of significance as $p \leq 0.05$. We grouped sets of data without statistical differences as follow: P2 (P0–P2), P6 (P3–P6), P8 (P7–P8), P10 (P9–P10), and P12 (P11–P12) except for **Figures 2, 6, and 8** where the ages indicated correspond to the exact age ($-5 = E14$; $-3 = E16$; $-1 = E18$; $0 = P0$; $2-30 = P2-P30$).

RESULTS

Fura 2-loaded striatal neurons were already active at E14, the youngest age tested. The percent of active cells was $16.8 \pm 1.5\%$ between E14 and P0, and did not change significantly over the first postnatal week (P0–P2: $17.5 \pm 1.0\%$ of imaged cells, P3–P6: $14.4 \pm 1.1\%$; $p = 0.07$). There were significantly fewer active cells at P7–P8 ($8.3 \pm 1.2\%$) and P9–P10 ($4.2 \pm 0.8\%$; $p = 0.0004$ between the two groups P3–P6 and P7–P8, one way ANOVA, $n =$ a total of 177 movies covering 47062 neurons). We then focused specifically on the activity of striatal MSNs. They generated three distinct patterns of activity: Intrinsic voltage-gated Ca^{2+} spikes (E14–P10), correlated Ca^{2+} Plateaus (E14–P10) and correlated Ca^{2+} spikes associated with (GDPs, P5–P7; Crepel et al., 2007; Allene et al., 2008). Of these three, only the latter was sensitive to blockers of glutamate and GABA synaptic transmission.

EMBRYONIC AND EARLY POSTNATAL MSNS SPONTANEOUSLY GENERATE INTRINSICALLY DRIVEN Ca^{2+} EVENTS IN THE ABSENCE OF SUBTHRESHOLD K^{+} CURRENTS

Intrinsic voltage-gated Ca^{2+} spikes predominated between E14 ($11.5 \pm 4.3\%$ of imaged cells, $n = 2268$ neurons in four fields, referred to as 2268/4), and P6 ($10.2 \pm 2.1\%$, 3143/12), and were significantly decreased at P10 ($3.1 \pm 0.9\%$, 2357/15; $p = 0.0008$, one way ANOVA; **Figure 2A** left, **Figure 2C**). Ca^{2+} spikes were not necessarily associated with Na^{+} spikes (**Figure 2B** left), had a low frequency (0.028 ± 0.004 Hz, 777/18), and a longer time to peak at E14–E18 (1.31 ± 0.08 s, 777/18) than at P0–P5 (0.053 ± 0.006 Hz; 0.92 ± 0.07 s, 207/7; $p = 0.004$ and $p = 0.001$ respectively, Student's *t*-test) suggesting different Ca^{2+} channels and/or Ca^{2+} clearance properties. There were no cell pairs showing correlated Ca^{2+} spikes at any age (0.2% at E14, 0.6% at P6, and 0% at P10).

Synchronized Ca^{2+} Plateaus were rare at E14 ($1.5 \pm 0.4\%$ of imaged cells, 2268/4), peaked at P4 ($6.7 \pm 1.5\%$, 1166/5), and absent at P11–P12 (0%, 1350/11; **Figure 2A** right, C). Ca^{2+} Plateaus were long lasting Ca^{2+} events (6.45 ± 0.01 s, 234/22, at E14–E18) that significantly differed from Ca^{2+} spikes (1.31 ± 0.08 s, 777/19, at E14–E18) in terms of duration ($p = 2.2 \times 10^{-7}$, Student's *t*-test). The percentage of cell pairs with correlated Ca^{2+} plateaus was around 5% (6% at E14, 5% at P4). Ca^{2+} plateaus had a similar mean frequency at E18 and P4 (0.014 ± 0.003 vs. 0.017 ± 0.002 Hz; $p = 0.8$, Student's *t*-test) and a similar mean duration (14.4 ± 1.9 vs. 14.5 ± 0.8 s; $p = 0.1$, Student's *t*-test; 107/10 and 89/5). Patch clamp recordings revealed underlying recurrent depolarizations (22 ± 2 mV, 2.3 ± 0.6 s, at a frequency around 0.4 Hz, $n = 9$) or a single long lasting depolarization (23 ± 6 mV, 10.0 ± 3.7 s, $n = 4$) that generated Na^{+} spikes (**Figure 2B** right).

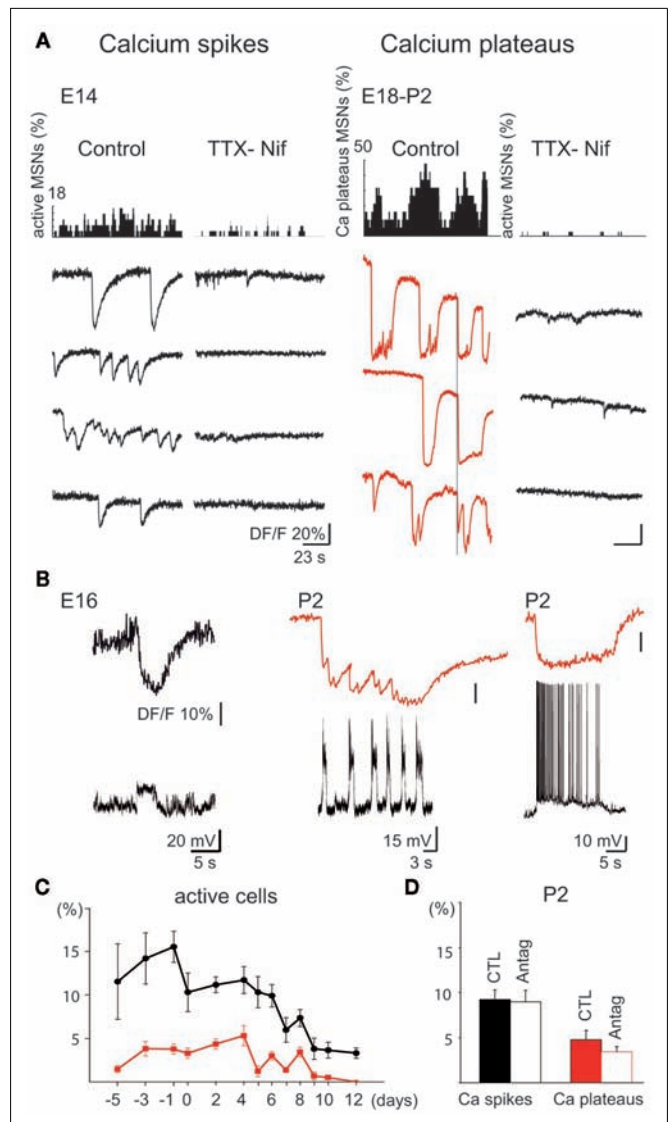


FIGURE 2 | Intrinsically driven Ca^{2+} events in immature MSNs

(E14–P2). **(A)** Representative histograms (top) indicating the fraction of MSNs evoking Ca^{2+} spikes (left) or Ca^{2+} plateaus (right) and corresponding representative calcium fluorescence traces from single MSNs (bottom; Ca^{2+} spikes in black, Ca^{2+} plateaus in red) in control ACSF or in the presence of blockers of voltage-gated channels [TTX ($1 \mu\text{M}$)-Nifedipine (Nif) ($10 \mu\text{M}$)]. In control ACSF, some Ca^{2+} plateaus were temporally correlated (vertical line). **(B)** Simultaneous optical (top) and current clamp (bottom) recordings of Ca^{2+} spikes ($V_m = -70$ mV, left) and Ca^{2+} plateaus ($V_m = -50$ mV, right). **(C)** Mean percentage ($\pm$ SEM) of fura 2-loaded cells evoking at least one Ca^{2+} spike (black) or one Ca^{2+} plateau (red) as a function of age. **(D)** Mean percentage ($\pm$ SEM) of active cells generating at least one Ca^{2+} spike (black) or one Ca^{2+} plateau (red) at P2 in control ACSF (CTL) and in the presence of antagonists of ionotropic glutamate and GABA_A receptors (APV $40 \mu\text{M}$ -CNQX $10 \mu\text{M}$ -bicuculline $10 \mu\text{M}$; Antag).

The blockers of Na^{+} and Ca^{2+} voltage-gated channels, TTX ($1 \mu\text{M}$)–nifedipine ($10 \mu\text{M}$) decreased threefold the percent of active cells (from 12.4 ± 2.9 to $4.6 \pm 2.2\%$ of imaged cells at P2 (**Figure 2A**). Nifedipine alone at a concentration specific for L-type Ca^{2+} channels ($3 \mu\text{M}$) decreased the percent of active cells

by 40% (from 13.9 ± 3.6 to $8.4 \pm 3.1\%$; $p = 0.04$, paired Student's t -test, 897/4) and ω -Conotoxin GVIA ($1 \mu\text{M}$), the N-type Ca^{2+} channel blocker, halved the percent of active cells (from $13.5 \pm 1.4\%$, 9682/33 to $6.4 \pm 0.8\%$, 1321/6; $p = 0.0001$, Student's t -test; not shown). In contrast, Ω -Agatoxin IVA (100 nM), the specific blocker of P/Q type channels had no significant effect. Ionotropic glutamate and GABA antagonists did not affect the percentage of Ca^{2+} spike cells (9.2 ± 1.1 vs. $9.0 \pm 1.3\%$ at P2, $p = 0.79$, paired Student's t -test) or Ca^{2+} plateaus cells (**Figure 2D**). These antagonists also did not significantly affect the coherence between calcium plateaus (4.5% pairs of plateaus cells correlated in the presence of antagonists vs. 5% pairs in control at P2).

The time coherence between some Ca^{2+} plateaus could be explained by the presence of gap junctions between immature neurons (Crepel et al., 2007). Single MSN recordings with neurobiotin-containing pipettes revealed clusters of 6 ± 1 neurobiotin-labeled neurons at E14–E18 ($n = 13/17$ patches), but of only two MSNs at P30–P40 ($n = 3/38$ patches). The majority of clusters were exclusively composed of MSNs (E14–P2, $n = 36/37$ clusters) and were abundant until P0–P2 (**Figure 3**). This suggested the presence of gap junctions permeable to neurobiotin at perinatal stages as described in juvenile rodent MSNs (Tepper et al., 1998; Venance et al., 2004) and required for the formation of synaptically connected networks (Todd et al., 2010). But carbenoxolone ($100 \mu\text{M}$), like mefloquine ($25 \mu\text{M}$) applied during 10–20 min, similarly reduced the probability of occurrence of all types of immature Ca^{2+} activities (data not shown, E14–P4, 5653/17). This non-specific effect precluded their use for demonstrating the role of gap junctions in Ca^{2+} plateaus' occurrence. These results suggested that Ca^{2+} spikes and Ca^{2+} plateaus are non-synaptic, intrinsic, voltage-gated events generated by Na^+ and L and N-types Ca^{2+} channels. To understand how MSNs spontaneously generate intrinsically driven calcium events, we next investigated the development of their intrinsic membrane properties.

The membrane potential trajectory attributable to the activation of the inwardly rectifying K^+ current (IK_{IR}) was not detected in any MSNs at E14, was present in 17% of MSNs at P7 ($n = 3/44$) and in all MSNs at P10 and P30 ($n = 8/8$ and $6/6$, respectively). It greatly increased from P10 to P30 (**Figures 4A,B**). Accordingly, bath application of cesium (3 mM), a blocker of IK_{IR} , increased the proportion of active cells by 240% at P6–P10 (from 4.3 ± 1.1 to $10.4 \pm 1.7\%$, 1349/6; $p = 0.04$ paired Student's t -test; data not shown). The mean input resistance (R_{in}) of MSNs was high until P6 and significantly decreased by approximately 75% between P6 and P10 (from $982 \pm 129 \text{ M}\Omega$ at P6, $n = 21$ to $263 \pm 19 \text{ M}\Omega$ at P10, $n = 11$; $p = 0.004$, one way ANOVA; **Figure 4C**). Spiking threshold ($V_{\text{threshold}}$) did not change from P2 to P30 (P2: $-32.2 \pm 1.7 \text{ mV}$, $n = 14$ and P30: $-30.8 \pm 0.8 \text{ mV}$, $n = 10$; $p = 0.51$ one way ANOVA) but the instantaneous firing frequency did. The first ISI of a firing train as a function of injected current was stable until P6 and was then significantly reduced between P6 and P10 ($1.44 \pm 0.14 \text{ Hz/pA}$, $n = 11$ at P6 vs. $0.91 \pm 0.08 \text{ Hz/pA}$, $n = 7$ at P10; $p = 0.03$, one way ANOVA) showing an increased delay to spiking at P10 (**Figures 4D,E**). The depolarization needed to generate spikes calculated as ($V_{\text{threshold}} - V_{\text{rest}}$) from whole cell recordings (**Figures 4F,G**) was significantly lower until P6

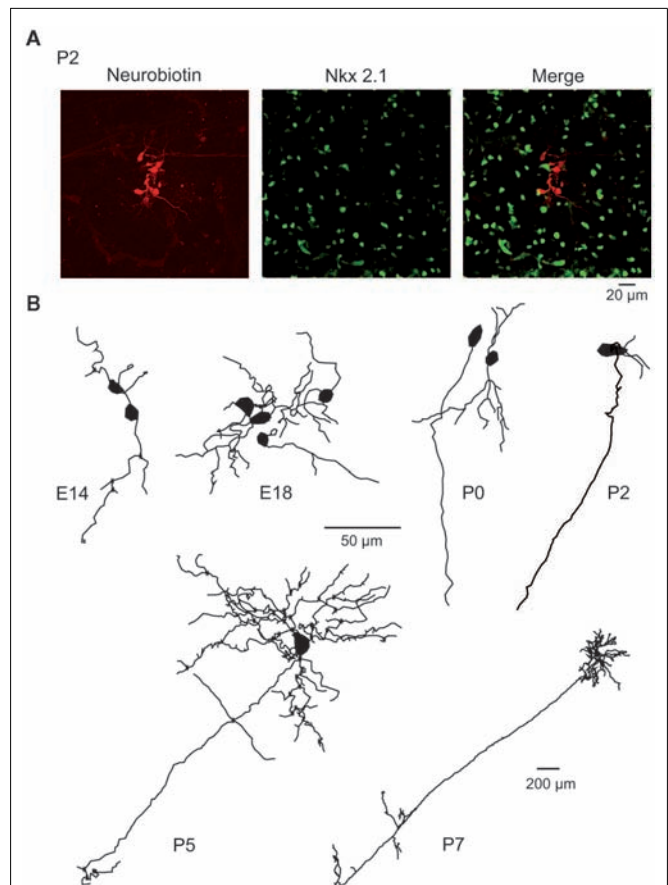


FIGURE 3 | Morphology of embryonic and early postnatal MSNs. (A)

Cluster of seven neurobiotin-filled (left) and Nkx2.1-negative (middle) MSNs (merge) revealed by double immunocytochemistry performed after whole cell recording of a single MSN in a P2 striatal slice. **(B)** NeuroLucida reconstruction of neurobiotin-filled Nkx2.1-negative neurons (MSNs) at the indicated ages. Dendrites and axons were MSNs had 2.8 ± 0.3 primary dendrites at E16–E18 ($n = 23$), 3.9 ± 0.4 at P0 ($n = 19$), 5.1 ± 1.1 at P2 ($n = 9$), and 5.8 ± 0.3 at P7 ($n = 11$). They gave rise to 6–25 dendritic ends (6 at E16–18, 13 at P0, 17 at P2, 18 at P5, and 25 at P7). The total dendritic length was multiplied by 5 between E16–18 and P7 ($339 \pm 64 \mu\text{m}$ at E16–18, $646 \pm 148 \mu\text{m}$ at P0, $574 \pm 123 \mu\text{m}$ at P2, $818 \pm 161 \mu\text{m}$ at P5, and $1751 \pm 219 \mu\text{m}$ at P7). Dendritic spines were virtually absent at all ages. Average cell capacitance progressively increased from E16 to P7 ($14.3 \pm 0.9 \text{ pF}$ at P2, $n = 47$, compared to $51.7 \pm 5.3 \text{ pF}$, $n = 74$ at P30; $p < 0.001$). Axons coursing down to the globus pallidus were identified in few E18 MSNs but were consistently observed for P5–P7 MSNs. Same scale bar ($50 \mu\text{m}$) from E14 to P5.

than after ($23 \pm 3 \text{ mV}$ at P6, $n = 15$ and $37 \pm 2 \text{ mV}$ at P10, $n = 6$; $p = 0.023$, one way ANOVA). V_{rest} measured from unitary NMDA currents was also significantly hyperpolarized between P2 and P10. Using single-channel recordings of NMDARs to provide an accurate measure of V_{rest} in young neurons (Tyzio et al., 2003; see Results of **Figure 9**), we found a significant decrease in V_{rest} between P2 and P10 ($-70.0 \pm 1.7 \text{ mV}$ at P2, $-77.0 \pm 1.3 \text{ mV}$ at P10; $n = 11$ and 11 , respectively; $p = 0.009$, one way ANOVA test; see Dehorter et al., 2009 for extensive discussion of the method; **Figure 4G**). These results suggest that until P6, MSNs lack K^+ currents like K_{IR} , K_{D} , and probably leak K^+ currents as well, including

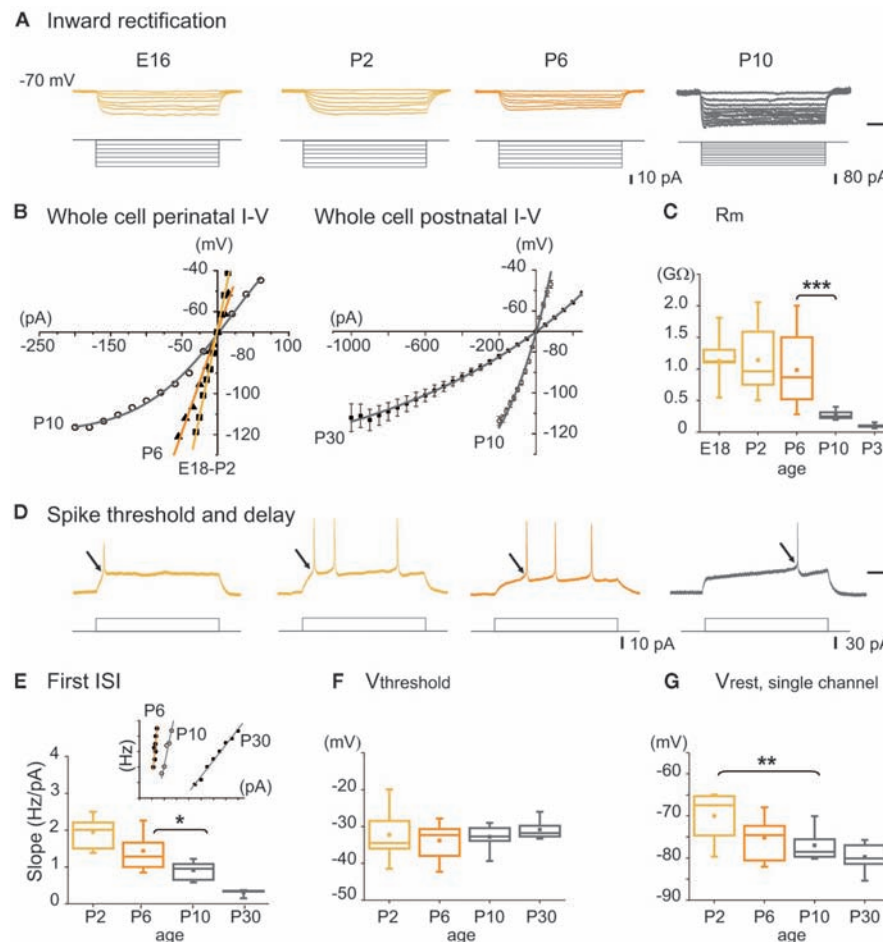


FIGURE 4 | Intrinsic membrane properties of MSNs as a function of age. (A) Representative whole cell current-clamp responses of embryonic and postnatal MSNs to intracellular hyperpolarizing steps ($V_m = -70$ mV). Note the absence of inward rectification before P10. Scale bars: 25 mV; 200 ms. (B) Whole cell I - V relationships at the indicated ages, obtained from experiments in (A). (C) Input membrane resistance (R_m) as a function of age obtained from experiments in A. (D) Representative whole cell current-clamp responses to intracellular depolarizing steps ($V_m = -70$ mV). At E16–E18 few MSNs generated suprathreshold Na^+ spikes (14%, $n = 1/8$),

50% at P0 ($n = 3/6$), 64% at P2 ($n = 16/25$), 87% at P5 ($n = 21/24$), and 100% at P7 ($n = 12/12$). Scale bars: 25 mV; 200 ms. (E) Instantaneous firing frequency to the first interspike interval (ISI) of a firing train as a function of injected current (insert, scale: 20 Hz; 100 pA). Slope values given by each linear regression lines fitted to frequency curves (correlation coefficient were all > 0.9) as a function of postnatal age. (F) Threshold potential ($V_{threshold}$) as a function of age calculated from experiments in D. (G) Resting membrane potential (V_{rest}) determined from the reversal potential of unitary NMDA currents in MSNs.

members of the KCNK class expressed in adult MSNs (Shen et al., 2007). Consequently, R_m is high (900 M Ω), V_{rest} is only 20 mV more hyperpolarized than $V_{threshold}$ and there is no spiking delay. Because of this, spontaneous Ca^{2+} channel openings may occur and give rise to spontaneous Ca^{2+} events.

EARLY POSTNATAL MSNs GENERATE CORRELATED Ca^{2+} SPIKES WHEN THEY EXPRESS THE NR2C/D NMDA SYNAPTIC CURRENT AND MEMBRANE PROPERTIES ARE STILL IMMATURE

The first synapse-driven pattern observed in postnatal MSNs was correlated Ca^{2+} spikes (GDPs), that appeared at P5–P7 (10% of the recordings, 969/5; mean frequency: 0.10 ± 0.05 Hz and mean duration: 0.70 ± 0.10 s, 102/5), and subsequently disappeared. The vast majority of active striatal neurons ($84.0 \pm 9.7\%$) were engaged in this activity with a large number of correlated cell pairs (24%),

attesting to the large neuronal ensemble that fired together during these events (Figure 5A left). Electrophysiological activity underlying each GDP consisted of bursts of 2–3 Na^+ spikes (Figure 5B). Ionotropic glutamate and GABA receptor antagonists abolished GDPs, but left other Ca^{2+} events (uncorrelated Ca^{2+} spikes or Ca^{2+} plateaus) intact ($p = 0.02$ and 0.52 respectively, paired Student's t -test; Figures 5A–D). Since GDPs were also suppressed by APV (40 μ M) alone, suggesting that NMDA receptors were heavily involved, we tested their sensitivity to PPDA (Feng et al., 2004), the preferential antagonist of NR2C/D NMDA receptors. At 100 nM PPDA removed most of the correlations between neurons (from 45 to 11%). Most of the GDP cells stopped their activity and the few who did not, evoked Ca^{2+} spikes at a much lower frequency (from 0.17 ± 0.01 to 0.07 ± 0.01 Hz; $p = 0.0003$, Mann–Whitney test; Figures 5C,D).

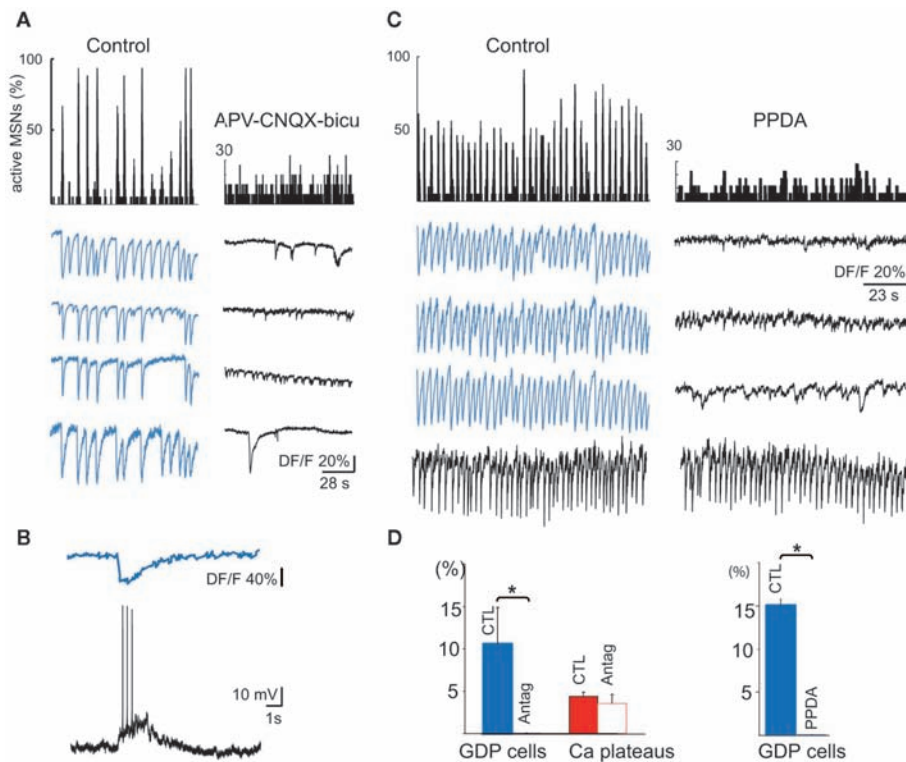


FIGURE 5 | Synapse-driven, correlated Ca^{2+} events in immature MSNs. (A) Representative histograms (top) indicating the fraction of active MSNs in the field and representative calcium fluorescence traces from MSNs (GDPs, in blue; bottom) in control ACSF (left) or in the presence of antagonists of ionotropic glutamate and GABA_A receptors. (B) Simultaneous optical (top) and current clamp (bottom) recordings of GDPs ($V_m = -60$ mV). (C) Same as in (A) but in the presence of PPDA 100 nM.

Note the specific disappearance of correlated GDPs (blue traces) during PPDA application, but not of Ca^{2+} spikes generated at a different frequency (black trace). (D) Left: mean percentage ($\pm$ SEM) of active cells generating GDPs (blue) or Ca^{2+} plateaus (red) in control ACSF (CTL) and in the presence of antagonists of ionotropic glutamate and GABA_A receptors (Antag). Right: mean percentage of cells participating in GDPs in control (CTL) or in the presence of PPDA.

To understand the time course of development of the spontaneous synaptic activities afferent to MSNs and that could play a role in the transiently expressed GDPs, we performed separate recordings of glutamatergic and GABAergic synaptic events. **Glutamatergic events:** the fraction of MSNs exhibiting AMPA- or KA-mediated sEPSCs steadily increased from E16 to E18 (38 and 50%) to a maximum at P5–P7 (100%). The mean frequency of AMPA or KA receptor-mediated EPSCs gradually increased from E16 to E18 (0.11 ± 0.04 and 0.3 ± 0.1 Hz; $n = 5$ and 5 MSNs) to P30 (1.3 ± 0.7 and 0.9 ± 0.2 Hz; $n = 5$ and 6 MSNs; $p = 0.03$ and $p = 0.004$ respectively, one way ANOVA) but their amplitude ($p = 0.3$ for AMPA, $p = 0.07$ for KA, one way ANOVA), rise times and decay times remained constant (Figures 6A–E left and middle). In contrast, the fraction of MSNs showing spontaneous NMDA receptor-mediated EPSCs shifted from 40% at P0 (5/12 cells) to more than 90% at P5–7 (16/18), and decreased thereafter to 30% at P30 (4/12; Figures 6A,B right). Their frequency stayed constant and low (around 0.1 Hz, $p = 0.9$; one way ANOVA) and also their amplitude ($p = 0.9$) and rise times but their decay time significantly decreased in the same period (Figures 6C–E right).

Since the cortex provides a major source of glutamatergic inputs to MSNs, we studied the development of these inputs. Dil labeling

of the neocortex ($n = 5$) revealed fiber staining in the striatum as early as E16 (Figure 7A). These inputs are functional, because cortical stimulation evoked glutamatergic EPSPs in 10% of MSNs at E16 ($n = 2/18$), 64% at P0–P2 ($n = 20/31$), 75% at P5–P7 ($n = 9/12$), 80% at P10 ($n = 9/11$), and 86% at P30 ($n = 12/14$). This was associated with a dramatic decrease in EPSP duration between P6 and P30 (–82%) and of the number of spikes generated. At P2, EPSPs (311 ± 32 ms; $n = 6$) generated 1 spike or spikelet, at P6 (420 ± 41 ms; $n = 8$) 2–5 spikes, while by P10 EPSPs had shortened to 276 ± 36 ms ($n = 7$; $p = 0.03$, between P6 and P10, one way ANOVA) and only gave rise to one spike as at P30 (74 ± 7 ms, $n = 7$; Figure 7B). At P6, the large EPSPs (and GDPs) were mostly blocked by the NMDA receptor antagonist APV, suggesting that NMDA receptors were heavily involved in early cortico-striatal activity. The long decay of P6 EPSPs suggested a preferential contribution of NR2C/D subunits of NMDA receptors with their long kinetics and reduced voltage-dependent magnesium block (Monyer et al., 1994). The NR2C/D subunit inhibitor PPDA (100 nM; Feng et al., 2004) significantly reduced evoked EPSPs at P6 (–54%; $p = 0.01$, $n = 6$; paired Student's t -test) but not at P2 (–13%; $p = 0.18$, $n = 5$; paired Student's t -test) or P10 (–9%; $p = 0.15$, $n = 5$; paired Student's t -test; Figure 7C),

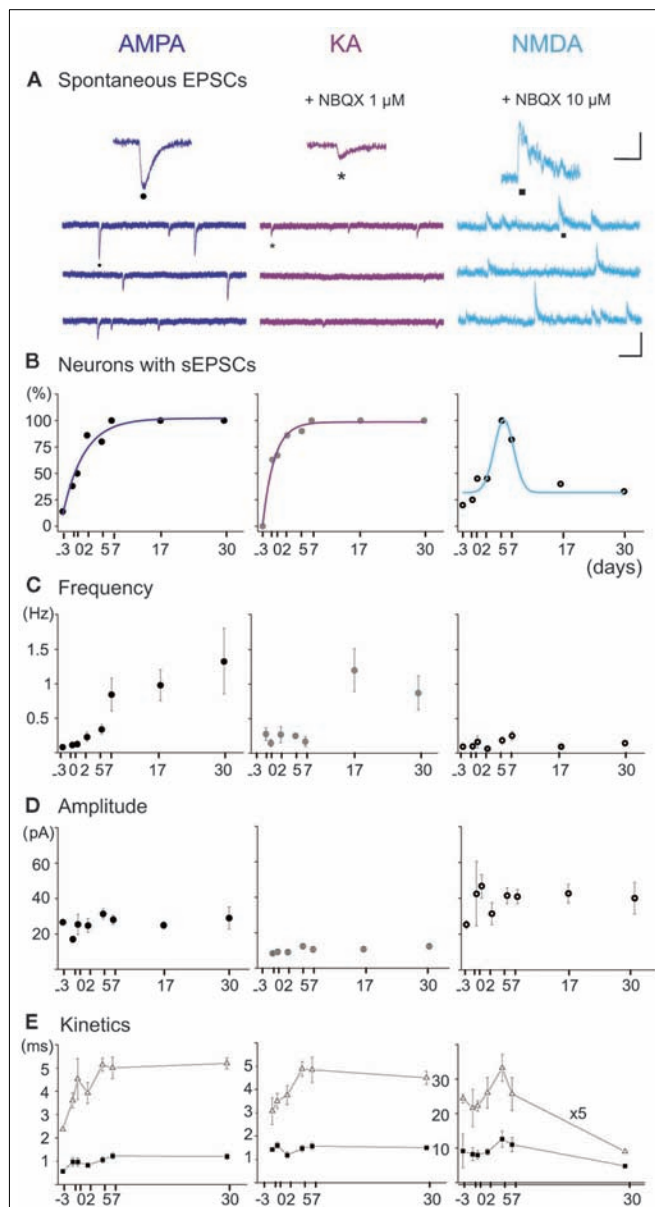
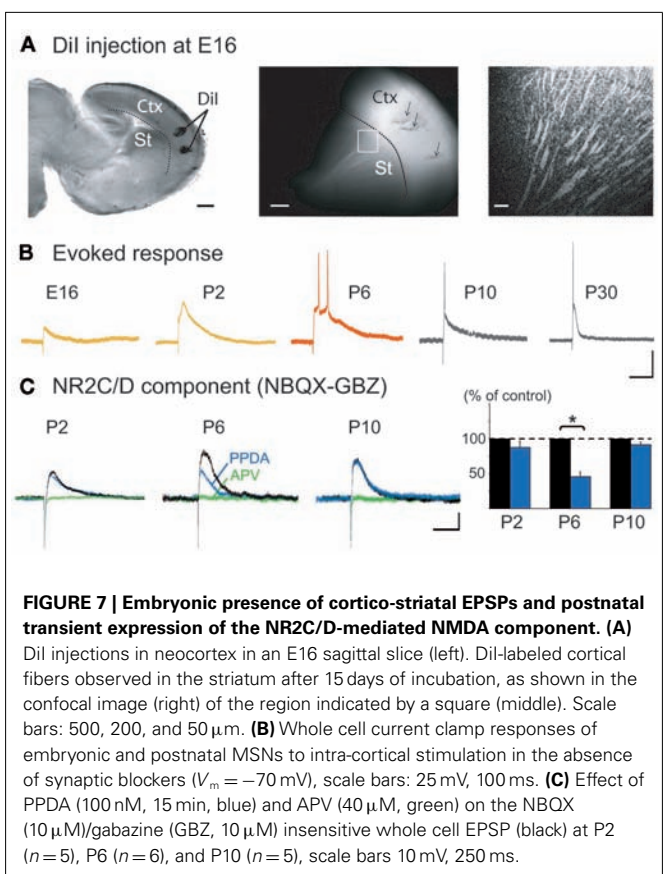


FIGURE 6 | Spontaneous AMPA, KA, and NMDA receptor-mediated postsynaptic currents (EPSCs) from E16 to P30 MSNs. (A)

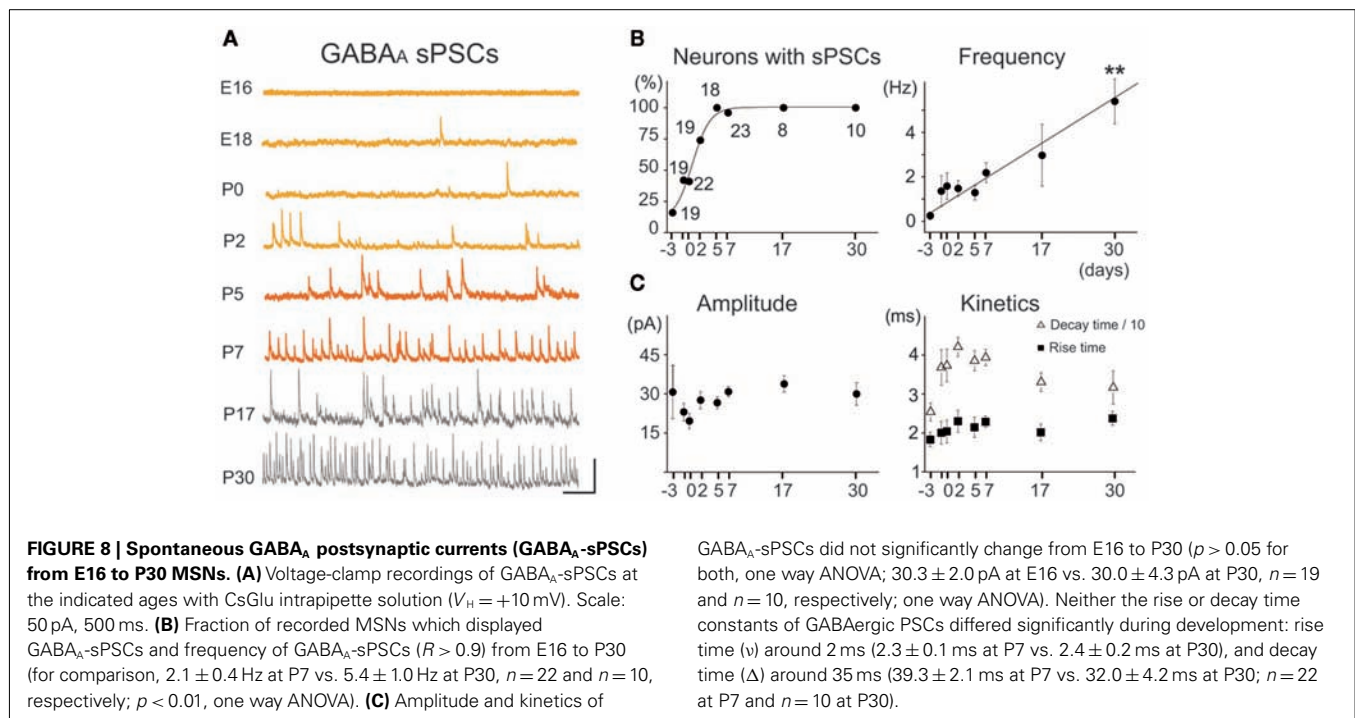
Representative voltage-clamp recordings of spontaneous AMPA ($V_H = -80$ mV), KA ($V_H = -80$ mV under NBQX $1 \mu\text{M}$), and NMDA ($V_H = +40$ mV under NBQX $10 \mu\text{M}$) receptor-mediated EPSCs (CsGlu intrapipette solution) at P6. Scale: 100 pA, 200 ms (AMPA and KA), and 2 s (NMDA). (Top) Close up of each spontaneous current (Insets: 50 pA, 125 ms). **(B)** Fraction of the recorded MSNs which displayed AMPA, KA, and NMDA sEPSCs, as a function of age ($n = 43, 54$, and 36 MSNs). **(C)** Frequency and **(D)** amplitude of AMPA, KA, and NMDA receptor-mediated sEPSCs as a function of age. **(E)** Kinetics of the three types of sEPSCs. The rise times remained stable from E18 to P30 for AMPA (0.7 ± 0.1 vs. 0.8 ± 0.2 ms; $p = 0.83$), KA (1.0 ± 0.3 vs. 1.1 ± 0.2 ms; $p = 0.84$), and NMDA (7.1 ± 0.8 vs. 5.2 ± 1.1 ms; $p = 0.33$) currents. The decay times (τ) stayed constant for AMPA (1.8 ± 0.3 ms at E18 vs. 2.9 ± 0.5 ms at P30, $p = 0.16$) and KA (2.1 ± 0.3 ms at E18 vs. 2.9 ± 0.3 at P30, $p = 0.08$) currents whereas it significantly decreased for NMDA currents (203 ± 16 ms at P7, $n = 9/11$ vs. 87 ± 9 ms at P30, $n = 4/12$; $p = 0.009$).



showing a restricted participation of NR2C/D before and after P6. The presence of a large NR2C/D-mediated NMDA component enables cortico-striatal synapses to generate large EPSCs associated with bursts of spikes at P5–P7, but not at P10.

GABAergic events

The fraction of MSNs exhibiting spontaneous GABA_AR-mediated currents steadily increased from E16 to a maximum at P5–P7 and the mean frequency of these currents (GABA_A PSCs) progressively increased from E16 up to P30 (519 MSNs; **Figures 8A–C**). The DF of GABA (DF_{GABA}), determined from single-channel recordings of GABA_ARs (see Materials and Methods; Tyzio et al., 2003), was similarly depolarizing by 15 mV at P2 ($+15.3 \pm 3.4$ mV; $n = 8$ MSNs, **Figures 9A,B**) and P30 (Dehorter et al., 2009; $+16.1 \pm 1.9$ mV, $n = 11$; $p = 0.8$, Student's t -test). To estimate (E_{GABA_A}), we plotted the relationship between the single-channel GABA_A current (i_{GABA_A}) and the pipette potential (V_p). This curve [$i_{GABA_A} = f(V_p)$] gives the value of V_p when $i_{GABA_A} = 0$ pA (**Figures 9A,B** right), because when i_{GABA_A} is null, $V_m = E_{GABA_A}$. Therefore, when $i_{GABA_A} = 0$ pA, $V_m = V_p - V_{rest} = E_{GABA_A}$ (i.e., $E_{GABA_A} - V_{rest} = -V_p$). By definition, $E_{GABA_A} - V_{rest} = DF_{GABA_A}$, the DF of chloride ions through the GABA_A channel (Tyzio et al., 2003). Therefore, when $I_{GABA_A} = 0$ pA, $DF_{GABA_A} = -V_p$. Knowing V_{rest} and DF_{GABA_A} , we can calculate the reversal potential for GABA_A, $E_{GABA_A} = DF_{GABA_A} + V_{rest}$. The reversal potential of GABA_A currents was



10 mV more depolarized at P2 than at P30 (Figure 9C). These values are based on the assumption that the NMDA current reverses at 0 mV in MSNs. Although an error of 5 mV may exist (Tyzio et al., 2003), the comparison of V_{rest} and E_{GABA} obtained with the same methods at P2 and P30 confirms the validity of our conclusions. Therefore, GABAergic synapses depolarize MSNs from V_{rest} to a value closer to the action potential threshold than in the adult (Misgeld et al., 1982; Koos and Tepper, 1999). However, GABA does not excite immature MSNs. Focal applications of the GABA_A receptor agonist isoguvacine failed to generate action potentials in cell-attached recordings from P2 ($n = 6$, Figure 9D) or P5 ($n = 7$, data not shown) MSNs. Similarly, stimulation of the striatal neuropil failed to evoke action potentials in cell-attached recordings of MSNs in the continuous presence of ionotropic glutamate receptors antagonists (data not shown).

The above data show that striatal neurons generate GDPs during a transient period when all MSNs are connected to glutamatergic and GABAergic neurons and still exhibit immature membrane properties (see Figure 4). There is a more efficient GABAergic depolarizing drive than at P30 that may participate in the GDPs of P5–P7 MSNs (together with glutamatergic EPSPs; Bracci and Panzeri, 2006) but these events are mainly driven by cortico-striatal synapses at a time where cortical neurons also generate GDPs (Allene et al., 2008).

INTRINSIC AND SYNAPSE-DRIVEN IMMATURE ACTIVITY DERIVE FROM DISTINCT NEURAL ENSEMBLES

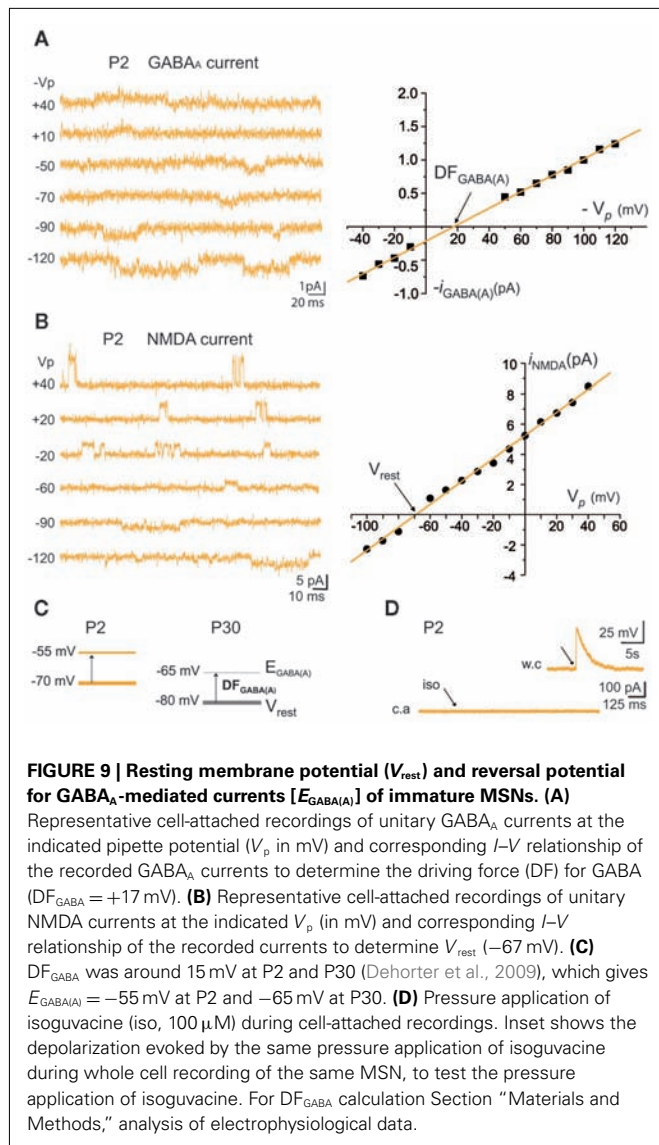
Because approximately 90% of the P5–P7 striatal networks did not generate GDPs at the time of recording, we wanted to understand whether synapse formation in some way altered the dynamics of the network. We compared network-wide activity at P2–P3 (when synapse density is low) to that at P5–P7 (when all MSNs are

innervated by glutamatergic and GABAergic inputs). We found that both frequency and duration of events changed from P2–P3 to P5–P7 (Figures 10A,B). The distributions of mean event frequency significantly differed between P2–P3 and P5–P7 (Mann–Whitney U -test; $n_{P2} = 18$, $n_{P6} = 33$; $U = 320$; $p = 0.02$). Similarly, the distributions of median event duration significantly differed between P2–P3 and P5–P7 ($U = 569.5$, $p = 0.0046$). To gauge the size of these differences between P2–P3 and P5–P7, we used k -means clustering to assign each recording to either P2–P3 or P5–P7 on the basis of its event statistics. We found that both duration (70% correct assignments) and frequency (64% correct) reliably indicated a recording's developmental stage. Thus, the switch from intrinsically to synaptically driven activity reliably decreased duration and increased the frequency of calcium events in the immature striatal network.

Both P2–P3 and P5–P7 networks were capable of showing spontaneous formation of neural ensembles (Figures 10C,D). We found markedly more P5–P7 (43%, 9/21) than P2–P3 (29%, 4/18) recordings with significant ensemble structure. Conversely, these P2–P3 recordings contained more ensembles (range 5–9) than the P5–P7 recordings (range 2–6). We also found that the P5–P7 recordings with GDP-driven, network-wide synchronization could be sub-divided into ensembles that indicated the delay in a neuron's participation of the network-wide synchronization (Figure 10E). These results suggest that the transition from intrinsic to synaptically driven activity promoted the appearance of putative cell assemblies.

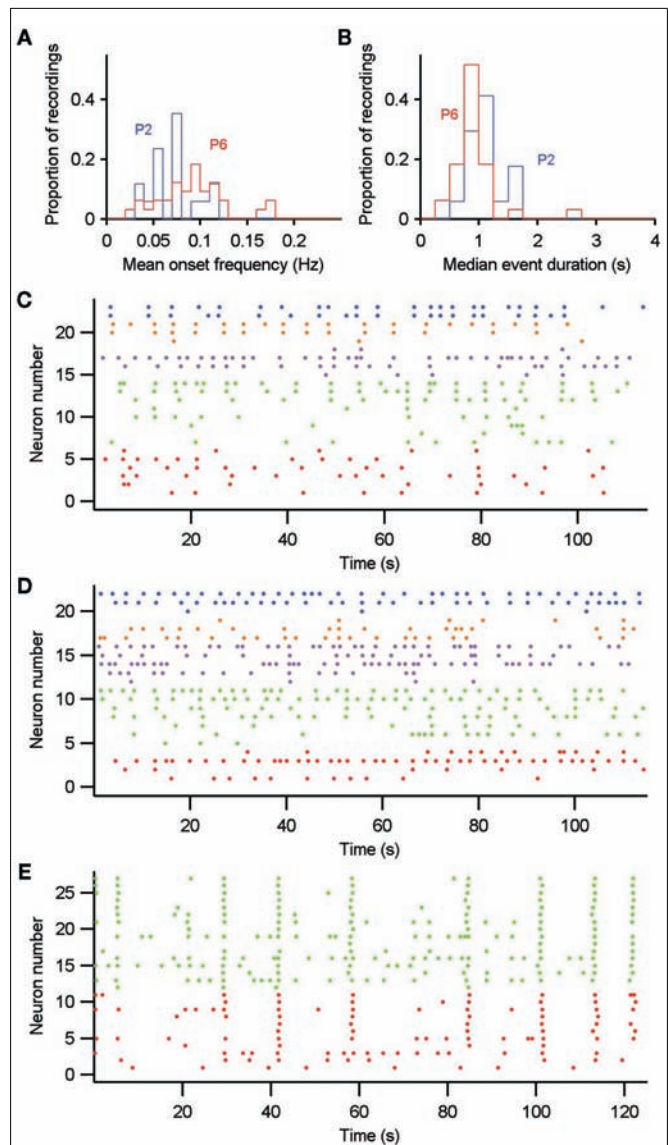
ABRUPT LOSS OF GDPs AND SWITCH TO ADULT-LIKE INTRINSIC PROPERTIES OCCURS BEFORE COORDINATED LOCOMOTION

As shown in Figures 11A–E, many MSN characteristics changed abruptly between P6 and P10. MSNs become mostly silent

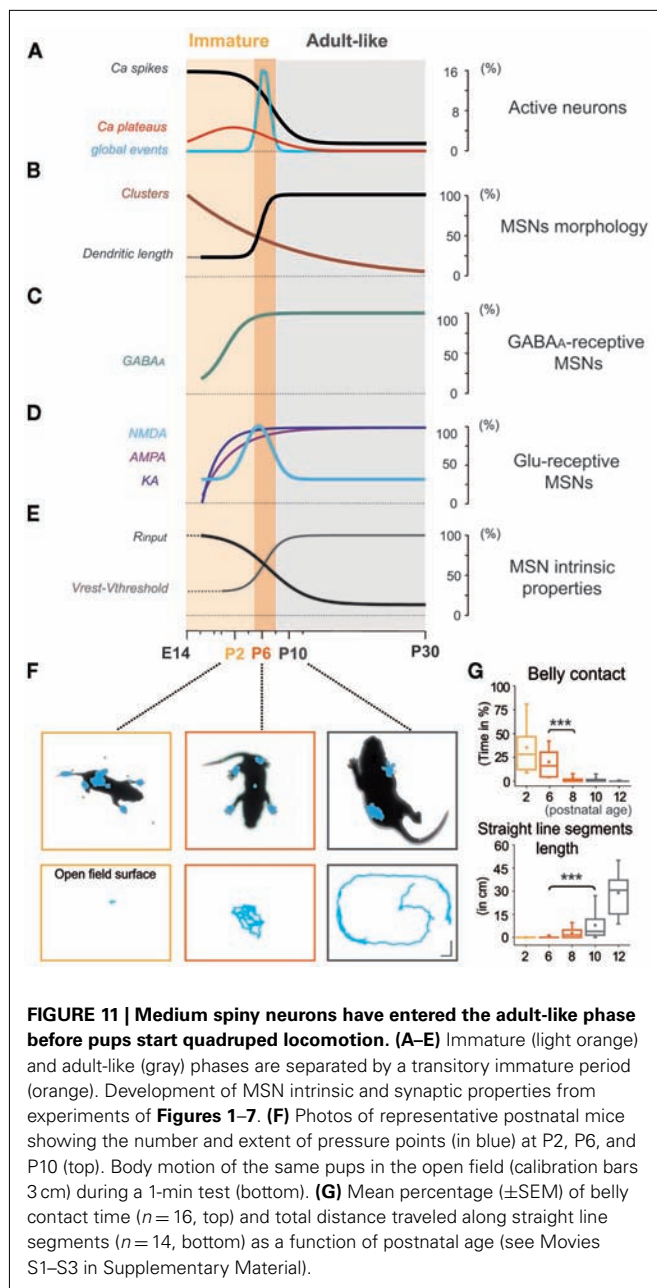


at P10, entering an adult-like phase. AMPA or KA receptor-mediated signals are probably not involved in the extinction of early spontaneous activity in MSNs because their frequency continuously increases with age. In contrast, the switch in other properties such as the abrupt loss of NR2C/D, expression of IK_{IR} , decrease in R_m , hyperpolarization of V_{rest} , and hyperpolarization of E_{GABA_A} all coincided with the silencing of MSNs.

In order to identify when the transition of MSNs from immature to adult-like state occurs in relation to a motor behavioral output, we quantified the maturation of pup body contacts and motion. At P2, prior to the onset of quadruped ambulation, the duration of abdominal contact with the cage surface was high ($35.3 \pm 4.9\%$ of total time), then progressively decreased at P3–P6 ($17.8 \pm 1.6\%$) and P7–P8 ($2.9 \pm 0.7\%$), disappearing by P9–P10 ($n = 16$; $p = 1 \times 10^{-8}$ between P3–P6 and P7–P8; one way ANOVA; **Figures 11E,G**, top). Body motion was practically absent at P2, with pivoting and crawling predominating in P3–P7



pups. The total distance pups traveled along straight line segments underwent a marked increase from P3 to P6 (0.2 ± 0.1 cm, $n = 56$) to P9–P10 (7.9 ± 1.6 cm, $n = 28$; $p = 0.0002$, one way ANOVA test). By P12 pups traversed relatively large distances (28.9 ± 3.5 cm, $n = 14$; $p = 1 \times 10^{-12}$ compared to P9–P10; one way ANOVA test; **Figures 11E,G**, bottom). Thus, spontaneous displacement with the ventral surface of the body held above the floor was first observed in P9–P10 mouse pups, in parallel with the chronology of MSN silencing.



DISCUSSION

Our results show that MSNs, the dominant neuronal population of the striatum, generate immature patterns of activity at embryonic and early postnatal stages that are reminiscent of the patterns observed in developing cortical structures (Garaschuk et al., 2000; Corlew et al., 2004; Allene et al., 2008). This confirms the similarity between developmental activities of networks independently of their neuronal structure and final function (Ben-Ari, 2001). In the middle of the second postnatal week, MSNs shift to an adult-like pattern characterized by little activity *in vitro* (Carrillo-Reid et al., 2008), just before pups lift their body and begin to walk. Underlying this transition is a change in the fundamental characteristics of MSNs (**Figure 11**). This suggests that the development

of MSNs and striatal network activity parallels the development of locomotor structures and pathways (Grillner et al., 2005).

Two features of immature MSNs emerge as central players in this progression. (i) Intrinsic voltage-gated Ca^{2+} currents: we propose that the reduced K^{+} currents and the consequent depolarized resting membrane potential allow spontaneous opening of N and L-type voltage-gated Ca^{2+} channels, then quieted near P10 by resting membrane potential hyperpolarization and/or developmental changes of Ca^{2+} channel properties; (ii) The transient NR2C/D-mediated cationic current: the expression of long lasting NMDA EPSCs mediated by the NR2C/D receptor subunit is a general feature of different developing brain structures (Monyer et al., 1994; Nansen et al., 2000; Logan et al., 2007; Dravid et al., 2008). NMDA receptor-mediated EPSCs are conspicuous in cortico-striatal neurons as early as P2 (see Hurst et al., 2001) for contradictory results). Using a dose of PPDA (100 nM) that preferentially antagonizes NR2C/D subunits ($K_D = 0.096$ and $0.130 \mu\text{M}$, respectively; Traynelis et al., 2010), we demonstrate that the window of operation of NR2C/D-mediated events is highly restricted to P5–P8 (Dunah et al., 1996). Therefore, as in other brain structures, immature neurons first generate long lasting synapse-driven patterns of activity that include large NMDA receptor driven currents. These currents, together with voltage-gated Ca^{2+} currents, trigger the large calcium fluxes needed for a wide range of essential developmental functions including neuronal growth, synapse formation, and the formation of neuronal ensembles (Spitzer, 2006). Indeed, we demonstrated that during this P5–P8 window, network-wide changes in calcium event statistics correlated with the reliable formation of neural ensembles.

Our observations also provide interesting insights concerning the generation of GDPs that have been observed in a wide range of brain networks but investigated primarily in cortical structures (Ben-Ari et al., 2007). GDPs are generated both by depolarizing GABAergic and glutamatergic notably NMDA receptors-mediated currents. The striatum is an interesting site to investigate the debated role of glutamate in GDPs generation because it has in contrast with other investigated structures no internal glutamatergic neurons. Clearly, the maturation of the glutamatergic cortico-striatal inputs is instrumental in the emergence of GDPs and particularly the long lasting NR2C/D component.

Adesnik et al. (2008) suggested that modest activity through NMDA receptors prevents the constitutive trafficking of AMPA receptors to the postsynaptic density via an LTD type mechanism. This ensures that synapses become functional only after strong or correlated activity, when enough calcium entry through these NMDA receptors overrides the inhibitory pathway and drives AMPA receptor insertion. This surge is provided by bursts of action potentials during GDPs and NMDA-mediated cortico-striatal EPSPs as shown here. From this perspective the elimination of the long lasting NR2C/D component in cortico-striatal EPSPs would constitute a gating device to induce the expression of AMPAergic currents in MSNs.

Therefore, our results suggest an intrinsic program that switches MSN activity from an immature low threshold activation state to a high threshold state in the adult with a low activity profile during resting conditions, coincident with the emergence of locomotion. In a more conceptual frame, in addition to ubiquitous

developmental patterns of activity, there would be a superimposed sequence, unique to each brain structure, which takes over at an appropriate time to enable the generation of patterns required for specific functions. The adult-like state described here is accompanied by several additional factors including the development of the dendritic arbor and spines of MSNs and the increased density of asymmetric glutamatergic synapses (Tepper et al., 1998; Belleau and Warren, 2000), a second wave of nigro-striatal dopaminergic innervation (Moon and Herkenham, 1984), the development of thalamo-cortical loops, and sensori-motor cortex (Gianino et al., 1999; Vinay et al., 2002; Allene et al., 2008; Evrard and Ropert, 2009). It is also accompanied functionally by a dopamine- and D2 receptor-dependent decrease in the efficacy of glutamatergic transmission that takes place *in vivo* during weeks 2–3 of postnatal development and is a consequence of a number of physiological changes in the maturing striatum (Choi and Lovinger, 1997; Tang et al., 2001). Also, comparison of the present data with that obtained in rodents lacking dopaminergic substantia nigra neurons (pitx3^{-/-} mice for example, Smidt et al., 2004), will allow understanding of the early role of endogenous dopamine on the development of the striatal network (Ohtani et al., 2003; Goffin et al., 2010).

Finally, present observations may be of clinical relevance because adult MSNs from the R6/2 rodent model of Huntington's

disease resemble immature MSNs described here in several respects, including an increased input resistance, depolarized resting membrane potential, low level of inwardly and outwardly rectifying K⁺ currents (Ariano et al., 2005), increased sensitivity to NMDA receptor activation (Cepeda et al., 2001) and decreased sensitivity of NMDA receptors to Mg²⁺ block (Starling et al., 2005).

ACKNOWLEDGMENTS

The RCE:LoxP reporter strain was a gift of the Fishell laboratory. We thank R. Cossart, D. Aronov, and P. Bonifazi who developed the analysis method of the imaging data, J. Gallego for the use of the motricity platform facility and Y. Ben Ari for helpful discussions. This work was supported by grants from Institut National de La Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Fédération pour la Recherche sur le Cerveau (FRC), Association Française contre les Myopathies (AFM), and Fondation Motrice. Nathalie Dehorter held a studentship from Région Provence Alpes Côte d'Azur, Neuroservice (Dir B. Buisson), and Association France Parkinson.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at http://www.frontiersin.org/cellular_neuroscience/10.3389/fncel.2011.00024/abstract

REFERENCES

- Adesnik, H., Li, G., During, M. J., Pleasure, S. J., and Nicoll, R. A. (2008). NMDA receptors inhibit synapse unsilencing during brain development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 5597–5602.
- Allene, C., Cattani, A., Ackman, J. B., Bonifazi, P., Aniksztejn, L., Ben-Ari, Y., and Cossart, R. (2008). Sequential generation of two distinct synapse-driven network patterns in developing neocortex. *J. Neurosci.* 28, 12851–12863.
- Ariano, M. A., Cepeda, C., Calvert, C. R., Flores-Hernandez, J., Hernandez-Echeagaray, E., Klapstein, G. J., Chandler, S. H., Aronin, N., DiFiglia, M., and Levine, M. S. (2005). Striatal potassium channel dysfunction in Huntington's disease transgenic mice. *J. Neurophysiol.* 93, 2565–2574.
- Belleau, M. L., and Warren, R. A. (2000). Postnatal development of electrophysiological properties of nucleus accumbens neurons. *J. Neurophysiol.* 84, 2204–2216.
- Ben-Ari, Y. (2001). Developing networks play a similar melody. *Trends Neurosci.* 24, 353–360.
- Ben-Ari, Y. (2002). Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 728–739.
- Ben-Ari, Y., Gaiarsa, J. L., Tyzio, R., and Khazipov, R. (2007). GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. *Physiol. Rev.* 87, 1215–1284.
- Blankenship, A. G., and Feller, M. B. (2010). Mechanisms underlying spontaneous patterned activity in developing neural circuits. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 18–29.
- Bonifazi, P., Goldin, M., Picardo, M. A., Jorquera, I., Cattani, A., Bianconi, G., Represa, A., Ben-Ari, Y., and Cossart, R. (2009). GABAergic hub neurons orchestrate synchrony in developing hippocampal networks. *Science* 326, 1419–1424.
- Bracci, E., and Panzeri, S. (2006). Excitatory GABAergic effects in striatal projection neurons. *J. Neurophysiol.* 95, 1285–1290.
- Carrillo-Reid, L., Tecuapetla, F., Tapia, D., Hernandez-Cruz, A., Galarraga, E., Drucker-Colin, R., and Vargas, J. (2008). Encoding network states by striatal cell assemblies. *J. Neurophysiol.* 99, 1435–1450.
- Cepeda, C., Ariano, M. A., Calvert, C. R., Flores-Hernandez, J., Chandler, S. H., Leavitt, B. R., Hayden, M. R., and Levine, M. S. (2001). NMDA receptor function in mouse models of Huntington disease. *J. Neurosci. Res.* 66, 525–539.
- Choi, S., and Lovinger, D. M. (1997). Decreased probability of neurotransmitter release underlies striatal long-term depression and postnatal development of corticostriatal synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 2665–2670.
- Corlew, R., Bosma, M. M., and Moody, W. J. (2004). Spontaneous, synchronous electrical activity in neonatal mouse cortical neurones. *J. Physiol.* 560, 377–390.
- Crepel, V., Aronov, D., Jorquera, I., Represa, A., Ben-Ari, Y., and Cossart, R. (2007). A parturition-associated nonsynaptic coherent activity pattern in the developing hippocampus. *Neuron* 54, 105–120.
- Deacon, T. W., Pakzaban, P., and Isaacson, O. (1994). The lateral ganglionic eminence is the origin of cells committed to striatal phenotypes: neural transplantation and developmental evidence. *Brain Res.* 668, 211–219.
- Dehorter, N., Guigoni, C., Lopez, C., Hirsch, J., Eusebio, A., Ben-Ari, Y., and Hammond, C. (2009). Dopamine-deprived striatal GABAergic interneurons burst and generate repetitive gigantic IPSCs in medium spiny neurons. *J. Neurosci.* 29, 7776–7787.
- Dravid, S. M., Prakash, A., and Traynelis, S. F. (2008). Activation of recombinant NR1/NR2C NMDA receptors. *J. Physiol.* 586, 4425–4439.
- Dunah, A. W., Yasuda, R. P., Wang, Y. H., Luo, J., vila-Garcia, M., Gbadegesin, M., Vicini, S., and Wolfe, B. B. (1996). Regional and ontogenic expression of the NMDA receptor subunit NR2D protein in rat brain using a subunit-specific antibody. *J. Neurochem.* 67, 2335–2345.
- Epszstein, J., Represa, A., Jorquera, I., Ben-Ari, Y., and Crepel, V. (2005). Recurrent mossy fibers establish aberrant kainate receptor-operated synapses on granule cells from epileptic rats. *J. Neurosci.* 25, 8229–8239.
- Evrard, A., and Ropert, N. (2009). Early development of the thalamic inhibitory feedback loop in the primary somatosensory system of the newborn mice. *J. Neurosci.* 29, 9930–9940.
- Feng, B., Tse, H. W., Skifter, D. A., Morley, R., Jane, D. E., and Monaghan, D. T. (2004). Structure-activity analysis of a novel NR2C/NR2D-preferring NMDA receptor antagonist: 1-(phenanthrene-2-carbonyl) piperazine-2,3-dicarboxylic acid. *Br. J. Pharmacol.* 141, 508–516.
- Garaschuk, O., Linn, J., Eilers, J., and Konnerth, A. (2000). Large-scale oscillatory calcium waves in the immature cortex. *Nat. Neurosci.* 3, 452–459.
- Gianino, S., Stein, S. A., Li, H., Lu, X., Biesiada, E., Ulas, J., and Xu, X. M. (1999). Postnatal growth of corticospinal axons in the spinal cord of developing mice. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 112, 189–204.

- Goffin, D., Ali, A. B., Rampersaud, N., Harkavyi, A., Fuchs, C., Whitton, P. S., Nairn, A. C., and Jovanovic, J. N. (2010). Dopamine-dependent tuning of striatal inhibitory synaptogenesis. *J. Neurosci.* 30, 2935–2950.
- Grillner, S., Hellgren, J., Menard, A., Saitoh, K., and Wikstrom, M. A. (2005). Mechanisms for selection of basic motor programs—roles for the striatum and pallidum. *Trends Neurosci.* 28, 364–370.
- Groc, L., Gustafsson, B., and Hanse, E. (2002). Spontaneous unitary synaptic activity in CA1 pyramidal neurons during early postnatal development: constant contribution of AMPA and NMDA receptors. *J. Neurosci.* 22, 5552–5562.
- Han, J. Y. (2005). “Low-cost multi-touch sensing through frustrated total internal reflection,” in *Proceedings of the 18th Annual ACM Symposium on User Interface Software and Technology – UIST* (New York, NY: ACM Press), 115–118.
- Huberman, A. D., Feller, M. B., and Chapman, B. (2008). Mechanisms underlying development of visual maps and receptive fields. *Annu. Rev. Neurosci.* 31, 479–509.
- Humphries, M. D. (2011). Spike-train communities: finding groups of similar spike trains. *J. Neurosci.* 31, 2321–2336.
- Hurst, R. S., Cepeda, C., Shumate, L. W., and Levine, M. S. (2001). Delayed postnatal development of NMDA receptor function in medium-sized neurons of the rat striatum. *Dev. Neurosci.* 23, 122–134.
- Koos, T., and Tepper, J. M. (1999). Inhibitory control of neostriatal projection neurons by GABAergic interneurons. *Nat. Neurosci.* 2, 467–472.
- Logan, S. M., Partridge, J. G., Matta, J. A., Buonanno, A., and Vicini, S. (2007). Long-lasting NMDA receptor-mediated EPSCs in mouse striatal medium spiny neurons. *J. Neurophysiol.* 98, 2693–2704.
- Misgeld, U., Wagner, A., and Ohno, T. (1982). Depolarizing IPSPs and Depolarization by GABA of rat neostriatum cells in vitro. *Exp. Brain Res.* 45, 108–114.
- Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D. J., Sakmann, B., and Seeburg, P. H. (1994). Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12, 529–540.
- Moon, E. S., and Herkenham, M. (1984). Comparative development of striatal opiate receptors and dopamine revealed by autoradiography and histofluorescence. *Brain Res.* 305, 27–42.
- Nansen, E. A., Jokel, E. S., Lobo, M. K., Micevych, P. E., Ariano, M. A., and Levine, M. S. (2000). Striatal ionotropic glutamate receptor ontogeny in the rat. *Dev. Neurosci.* 22, 329–340.
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., Kerr, J. N., and Helmchen, F. (2004). Sulforhodamine 101 as a specific marker of astroglia in the neocortex in vivo. *Nat. Methods* 1, 31–37.
- Nobrega-Pereira, S., Kessaris, N., Du, T., Kimura, S., Anderson, S. A., and Marin, O. (2008). Postmitotic Nkx2-1 controls the migration of telencephalic interneurons by direct repression of guidance receptors. *Neuron* 59, 733–745.
- Ohtani, N., Goto, T., Waerber, C., and Bhidé, P. G. (2003). Dopamine modulates cell cycle in the lateral ganglionic eminence. *J. Neurosci.* 23, 2840–2850.
- Olsson, M., Bjorklund, A., and Campbell, K. (1998). Early specification of striatal projection neurons and interneuronal subtypes in the lateral and medial ganglionic eminence. *Neuroscience* 84, 867–876.
- Shen, W., Tian, X., Day, M., Ulrich, S., Tkatch, T., Nathanson, N. M., and Surmeier, D. J. (2007). Cholinergic modulation of Kir2 channels selectively elevates dendritic excitability in striatopallidal neurons. *Nat. Neurosci.* 10, 1458–1466.
- Smidt, M. P., Smits, S. M., Bouwmeester, H., Hamers, F. P., van der Linden, A. J., Hellemons, A. J., Graw, J., and Burbach, J. P. (2004). Early developmental failure of substantia nigra dopamine neurons in mice lacking the homeodomain gene Pitx3. *Development* 131, 1145–1155.
- Sousa, V. H., Miyoshi, G., Hjerling-Lefler, J., Karayannis, T., and Fishell, G. (2009). Characterization of Nkx6-2-derived neocortical interneuron lineages. *Cereb. Cortex* 19(Suppl. 1), i1–i10.
- Spitzer, N. C. (2006). Electrical activity in early neuronal development. *Nature* 444, 707–712.
- Starling, A. J., Andre, V. M., Cepeda, C., de, L. M., Chandler, S. H., and Levine, M. S. (2005). Alterations in N-methyl-D-aspartate receptor sensitivity and magnesium blockade occur early in development in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *J. Neurosci. Res.* 82, 377–386.
- Tang, K., Low, M. J., Grandy, D. K., and Lovinger, D. M. (2001). Dopamine-dependent synaptic plasticity in striatum during in vivo development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 1255–1260.
- Tepper, J. M., Koos, T., and Wilson, C. J. (2004). GABAergic microcircuits in the neostriatum. *Trends Neurosci.* 27, 662–669.
- Tepper, J. M., Sharpe, N. A., Koos, T. Z., and Trent, F. (1998). Postnatal development of the rat neostriatum: electrophysiological, light- and electron-microscopic studies. *Dev. Neurosci.* 20, 125–145.
- Todd, K. L., Kristan, W. B. Jr., and French, K. A. (2010). Gap junction expression is required for normal chemical synapse formation. *J. Neurosci.* 30, 15277–15285.
- Traynelis, S. F., Wollmuth, L. P., McBain, C. J., Menniti, F. S., Vance, K. M., Ogden, K. K., Hansen, K. B., Yuan, H., Myers, S. J., Dingledine, R., and Sibley, D. (2010). Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol. Rev.* 62, 405–496.
- Tyzio, R., Ivanov, A., Bernard, C., Holmes, G. L., Ben-Ari, Y., and Khazipov, R. (2003). Membrane potential of CA3 hippocampal pyramidal cells during postnatal development. *J. Neurophysiol.* 90, 2964–2972.
- Van Der Kooy, D., and Fishell, G. (1987). Neuronal birthdate underlies the development of striatal compartments. *Brain Res.* 401, 155–161.
- Venance, L., Glowinski, J., and Gaiume, C. (2004). Electrical and chemical transmission between striatal GABAergic output neurones in rat brain slices. *J. Physiol.* 559, 215–230.
- Vinay, L., Brocard, F., Clarac, F., Norreel, J. C., Pearlstein, E., and Pflieger, J. F. (2002). Development of posture and locomotion: an interplay of endogenously generated activities and neurotrophic actions by descending pathways. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 40, 118–129.
- Wilson, C. J., and Kawaguchi, Y. (1996). The origins of two-state spontaneous membrane potential fluctuations of neostriatal spiny neurons. *J. Neurosci.* 16, 2397–2410.

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 14 September 2011; paper pending published: 06 October 2011; accepted: 21 October 2011; published online: 21 November 2011.

Citation: Dehorter N, Michel FJ, Marissal T, Rotrou Y, Matrot B, Lopez C, Humphries MD and Hammond C (2011) Onset of pup locomotion coincides with loss of NR2C/D-mediated cortico-striatal EPSCs and dampening of striatal network immature activity. *Front. Cell. Neurosci.* 5:24. doi: 10.3389/fncel.2011.00024

Copyright © 2011 Dehorter, Michel, Marissal, Rotrou, Matrot, Lopez, Humphries and Hammond. This is an open-access article subject to a non-exclusive license between the authors and Frontiers Media SA, which permits use, distribution and reproduction in other forums, provided the original authors and source are credited and other Frontiers conditions are complied with.

Spontaneous glutamatergic activity induces a BDNF-dependent potentiation of GABAergic synapses in the newborn rat hippocampus

Nicola Kuczewski^{1,2}, Anais Langlois^{1,2}, Hervé Fiorentino^{1,2}, Stéphanie Bonnet^{1,2}, Thomas Marissal^{1,2}, Diabe Diabira^{1,2}, Nadine Ferrand^{1,2}, Christophe Porcher^{1,2} and Jean-Luc Gaiarsa^{1,2}

¹INSERM U901 (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 901), INMED (Institut de Neurobiologie de la Méditerranée), Marseille 13009, France

²Aix Marseille Université, Faculté des Sciences, Marseille 13000, France

Spontaneous ongoing synaptic activity is thought to play an instructive role in the maturation of the neuronal circuits. However the type of synaptic activity involved and how this activity is translated into structural and functional changes is not fully understood. Here we show that ongoing glutamatergic synaptic activity triggers a long-lasting potentiation of γ -aminobutyric acid (GABA) mediated synaptic activity (LLP_{GABA-A}) in the developing rat hippocampus. LLP_{GABA-A} induction requires (i) the activation of AMPA receptors and L-type voltage-dependent calcium channels, (ii) the release of endogenous brain-derived neurotrophic factor (BDNF), and (iii) the activation of postsynaptic tropomyosin-related kinase receptors B (TrkB). We found that spontaneous glutamatergic activity is required to maintain a high level of native BDNF in the newborn rat hippocampus and that application of exogenous BDNF induced LLP_{GABA-A} in the absence of glutamatergic activity. These results suggest that ongoing glutamatergic synaptic activity plays a pivotal role in the functional maturation of hippocampal GABAergic synapses by means of a cascade involving BDNF release and downstream signalling through postsynaptic TrkB receptor activation.

(Received 20 June 2008; accepted after revision 2 September 2008; first published online 4 September 2008)

Corresponding author J.-L. Gaiarsa: INMED, Parc scientifique de Luminy, BP 13, 13273 Marseille Cedex 9, France.

Email: gaiarsa@inmed.univ-mrs.fr

Ongoing synaptic activity plays an important role in the construction and refinement of developing neuronal networks (Zhang & Poo, 2001). However the type of synaptic activity involved and how activity is translated into structural or functional changes are not fully understood. Neurotrophins, in particular brain-derived neurotrophic factor (BDNF), are attractive candidates. Neurotrophins are secreted proteins whose expression and release are up-regulated by neuronal activity (Lessmann *et al.* 2003). Moreover, impairing network activity produces structural and functional alterations that can be reverted by application of exogenous BDNF (McAllister *et al.* 1996; Rutherford *et al.* 1997; Marty *et al.* 2000; Seil & Drake-Baumann, 2000). These observations therefore suggest that activity-dependent secretion of BDNF can act as a regulatory mechanism of network development and plasticity. However, to date most of the studies investigating the effects of BDNF on synaptic development or efficacy have relied on non-physiological application of exogenous BDNF (Marty *et al.* 1996, 2000; MacLean Bolton *et al.* 2000; Jin *et al.* 2003) or on chronic alteration

of the BDNF signalling pathway (Aguado *et al.* 2003; Ohba *et al.* 2005; Carmona *et al.* 2006). Although these studies have been extremely informative for the understanding of the BDNF actions, crucial questions remain to be addressed in terms of the physiological pattern of synaptic activity that triggers the release of BDNF, as well as the impact this release may have on network activity and development.

Several studies have shown that neuronal activity contributes to the formation of GABAergic synapses in the developing brain (Benevento *et al.* 1995; Kilman *et al.* 2002; Chattopadhyaya *et al.* 2004). Accordingly, in a previous study we reported that silencing neonatal rat hippocampus *in vitro* delayed the functional maturation of GABAergic synapses onto hippocampal CA3 pyramidal neurons (Colin-Le Brun *et al.* 2004). In the present work, we investigated the effect of synaptic activity recovery on GABAergic synaptic transmission. We show that a transient recovery from activity deprivation leads to a long-lasting potentiation of GABA_A receptor-mediated synaptic transmission (LLP_{GABA-A}) in the developing

rat hippocampus. LLP_{GABA-A} induction requires (i) the activation of AMPA receptors and the voltage-dependent L-type calcium channel (VDCC), (ii) a postsynaptic rise in intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$), (iii) the release of endogenous brain derived neurotrophic factor (BDNF), and (iv) the activation postsynaptic tropomyosin-related kinase receptors B (TrkB).

Methods

Slices preparation

Experiments were performed on hippocampal slices obtained from Wistar rats, between postnatal days 1 and 6. All animal experiments have been carried out in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC). Brains were removed from anaesthetized (350 mg kg^{-1} chloral hydrate i.p.) animals and immersed into ice-cold ($2\text{--}4^\circ\text{C}$) artificial cerebrospinal fluid (ACSF) of the following composition (mM): NaCl, 126; KCl, 3.5; $CaCl_2$, 2; $MgCl_2$, 1.3; NaH_2PO_4 , 1.2; $NaHCO_3$, 25; and glucose, 11; pH 7.4, when equilibrated with 95% O_2 and 5% CO_2 . Hippocampal slices ($600 \mu\text{m}$ thick) were cut with a McIlwain tissue chopper and submerged in ACSF supplemented with 1,2,3,4-tetrahydro-6-nitro-2,3-dioxo-benzo[f]quinoxaline-7-sulfonamide (NBQX; $5 \mu\text{M}$) and D(-)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (D-AP5; $40 \mu\text{M}$) to reduce network-driven synaptic activity (Ben-Ari *et al.* 1989). Slices were then transferred to a submerged recording chamber and perfused with ACSF (3 ml min^{-1}) containing NBQX ($5 \mu\text{M}$) and D-AP5 ($40 \mu\text{M}$) at 34°C .

Electrophysiological recordings

Whole cell patch-clamp recordings of CA3 pyramidal neurons were performed with an Axopatch 200B amplifier (Axon Instruments, Union City, CA, USA). Micro-electrodes ($4\text{--}8 \text{ M}\Omega$) were filled with the following solution (in mM): CsCl, 110; potassium gluconate, 30; Hepes, 10; EGTA, 1.1; $CaCl_2$, 0.1; MgATP, 4; and NaGTP, 0.3. With this solution, GABA_A receptor-mediated responses reversed at 0 mV. In some experiments (Fig. 2), the intracellular solution contained (in mM): caesium gluconate, 120; CsCl, 14; Hepes, 10; EGTA, 1.1; $CaCl_2$, 0.1; Na_2GTP , 0.4; and MgATP, 4; pH 7.4. In these ionic conditions, GABA_A currents reversed around -55 mV , while ionotropic glutamatergic currents reversed around $+10 \text{ mV}$. Field potentials were recorded using a DAM80 Amplifier (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) using a $1\text{--}3 \text{ Hz}$ bandpass filter. Spontaneous synaptic activity was monitored and stored with Axoscope 8.1 (Axon Instruments). Series resistance (R_s), membrane capacitance (C_m) and input resistance

(R_i) were determined by an online fitting analysis of the transient currents in response to a 5 mV pulse with Acquis 4.0 software (Bio-logic, Orsay, France). Criteria for accepting a recording included a resting potential $< -55 \text{ mV}$, $R_i > 400 \text{ M}\Omega$ and $R_s < 25 \text{ M}\Omega$.

BDNF immunoassay

To measure the release of BDNF from hippocampal slices, 6 ml fractions of the medium were collected. The fractions were concentrated using the Amicon Ultra concentration devices (Millipore Corp., Ireland), with $200 \mu\text{l}$ final volume. The BDNF sandwich ELISA Kit (Chemicon International, Temecula, CA, USA) was used to quantify the amount of BDNF in the concentrated solutions following the manufacturer's protocol. Experiments and analysis were done blind.

Data acquisition and analysis

The spontaneous GABA_A receptor-mediated synaptic activity was stored on-line on a personal computer and analysed off-line with Mini Analysis 6.0 software (Synaptosoft, Leonia, NJ, USA). The fact that no false events would be identified was confirmed by visual inspection for each experiment. To calculate the amplitude of spontaneous GABA_A receptor-mediated postsynaptic currents (sGABA_A-PSCs), multiple overlapping events were discarded. For each recorded cell, the mean frequency of sGABA-PSCs within bins of 30 s was normalized to the mean frequency for the 10 min preceding activity recovery. The effective plasticity was quantified as the mean frequency or amplitude sGABA-PSCs between 20 and 30 min after activity recovery, normalized to the mean of the frequency and amplitude for the 10 min preceding activity recovery. When comparing cumulative distribution of sGABA_A-PSCs amplitude and frequency before and after activity recovery for a given cell, the Kolmogorov–Smirnov (K-S test) was used. For average data, statistical analysis was performed using Student's paired *t* test when comparing pre- and post-activity recovery values, and Student's unpaired *t* test when comparing post-giant depolarizing potential (GDP) values from control and treated slices.

Drugs

1,2,3,4-Tetrahydro-6-nitro-2,3-dioxo-benzo[f]quinoxaline-7-sulphonamide (NBQX) and D-2-amino-5-phosphoaleric acid (D-AP-5) were from Tocris Cookson (Bristol, UK); k-252a (Calbiochem, San Diego, CA, USA); Thapsigargin (MP Biological, Solon, OH, USA); Nifedipine (Sigma, St Louis, MO, USA); TrkB-IgG and TrkC-IgG (R&D system, Minneapolis, MN, USA).

Results

Transient recovery from activity-deprivation induces a calcium-dependent long-lasting enhancement of GABAergic synaptic activity

The aim of this study was to investigate the mechanisms underlying activity-dependent plasticity of GABAergic synapses. To this end, hippocampal slices were incubated for 5–8 h in medium containing NBQX (5 μ M) and D-AP5 (40 μ M). We have previously shown that incubation in the presence of the ionotropic glutamatergic receptors delayed the functional maturation of GABAergic synapses (Colin-Le Brun *et al.* 2004). Here, we investigate the effect of a transient recovery from activity deprivation.

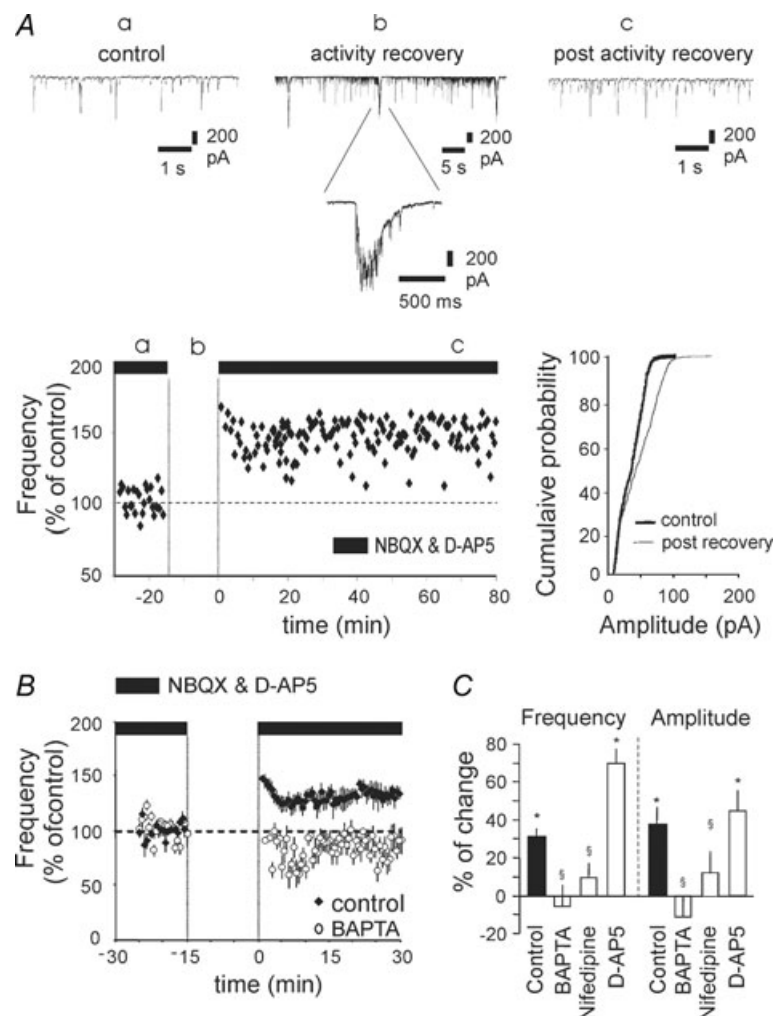
Spontaneous GABA_A receptor-mediated postsynaptic currents (sGABA_A-PSCs) were recorded at a holding potential of -70 mV in the presence of 5 μ M NBQX and 40 μ M D-AP5 (Fig. 1A). After 10 min of stable GABAergic transmission, NBQX and D-AP5 were washed out for 15 min to recover global network activity. Figure 1A illustrates a typical experiment in which activity recovery

resulted in a long-lasting potentiation of GABAergic synaptic transmission (LLP_{GABA-A}), consisting of a persistent increase in both frequency (from 0.56 ± 0.02 Hz to 1.02 ± 0.09 Hz, $P < 0.05$, K-S test, Fig. 1A) and amplitude (from 38 ± 0.7 pA to 57 ± 4.6 pA, $P < 0.05$, K-S test, Fig. 1A) of sGABA_A-PSCs. A summary of 33 similar experiments showed an average $31 \pm 4\%$ (from 5.7 ± 0.9 to 7.3 ± 1.1 Hz) and $36 \pm 7\%$ (from 45 ± 6 to 59 ± 6 pA) increase in sGABA_A-PSC frequency and amplitude 30 min after restoration of synaptic activity ($P < 0.05$ for both, Student's *t* test, Fig. 1B and C). In three experiments, bicuculline (10 μ M) was applied at the end of the experiments. All events were blocked, showing that they were mediated by GABA_A receptor.

A postsynaptic rise in $[Ca^{2+}]_i$ is a common trigger for long-lasting changes in the strength of GABAergic synapses (Gärsars *et al.* 2002). We therefore investigated the contribution of postsynaptic Ca^{2+} in LLP_{GABA-A} induction. Loading the recorded neuron with the calcium chelator BAPTA (10 mM) prevents the induction of LLP_{GABA-A} (from 5.5 ± 1.3 to 4.7 ± 1 Hz and 42 ± 8 to

Figure 1. Synaptic activity recovery induced a Ca^{2+} -dependent long-lasting increase in GABAergic synaptic activity

A, upper, sGABA_A-PSCs (holding potential = -70 mV) before (left, a) and 30 min (right, c) after the activity recovery (middle, b). Middle, a single GDP recorded during activity recovery is shown at an expanded time scale. Lower right, graph showing the average time course of sGABA_A-PSC frequency. In this and following figures the frequency of sGABA_A-PSCs is expressed as a percentage of control pre-recovery value and plotted against time (bin = 30 s). Lower right, cumulative probability plot of sGABA_A-PSC amplitude before (control) and 20 min after activity recovery (post-recovery). B, summary plots showing the mean frequency of sGABA_A-PSCs before and after activity recovery in control (●, $n = 33$) and BAPTA-loaded cells (10 mM, ○, $n = 6$). C, bar plot showing the modification in sGABA_A-PSC frequency and amplitude induced by activity recovery in control (filled bars) and treated cells (open bars) (BAPTA 10 mM, $n = 6$; nifedipine 10 μ M, $n = 12$; D-APV 40 μ M, $n = 7$) (in this and following figures, * $P < 0.05$ when compared to pre-recovery; § $P < 0.05$ when compared to control post-recovery).



36 ± 5 pA, $n = 6$, $P > 0.05$ for both, Student's t test, Fig. 1B and C). We next investigated the possible contribution of VDCCs and NMDA receptors, two major sources of $[Ca^{2+}]_i$ implicated in many forms of GABAergic synaptic plasticity. LLP_{GABA-A} was induced when synaptic activity was recovered in the presence of the NMDA receptor antagonist D-AP5 (from 3.2 ± 1.8 to 5.3 ± 1.6 Hz and 34 ± 5 to 47 ± 6 pA, $n = 7$, $P < 0.05$ for both, Student's t test, Fig. 1C), but not in the presence of nifedipine ($10 \mu M$), an L-type Ca^{2+} channel blocker (from 4.2 ± 0.9 to 4.7 ± 0.9 Hz and 57 ± 12 to 59 ± 8 pA, $n = 12$, $P > 0.05$ for both, Student's t test, Fig. 1C).

Overall, these experiments show that a transient recovery from network activity deprivation induces a persistent enhancement of GABAergic transmission requiring a postsynaptic rise in $[Ca^{2+}]_i$ and the activation of VDCCs.

Recovery of spontaneous glutamatergic synaptic activity is required to induce LLP_{GABA}

In normal ACSF, i.e. during NBQX and D-AP5 washout, synaptic activity consists of three broad classes of events: network-driven patterned activity, termed giant depolarizing potentials (GDPs), sGABA_A-PSCs and spontaneous glutamatergic postsynaptic currents (sGlu-PSCs) (Figs 1A and 2). Recent observations suggested a role of sGDPs in the induction of GABAergic and glutamatergic synaptic potentiation in the developing rat hippocampus (Kasyanov *et al.* 2004; Mohajerani *et al.* 2007). We therefore investigated the possible contribution of sGDPs in LLP_{GABA} induction. To this end, gabazine (GBZ), a specific GABA_A-receptor antagonist, was applied at a low concentration ($0.1 \mu M$) during the washout of NBQX and D-AP5. At this concentration, GBZ prevented the recovery of GDPs in 5 out of 6 slices. In these slices,

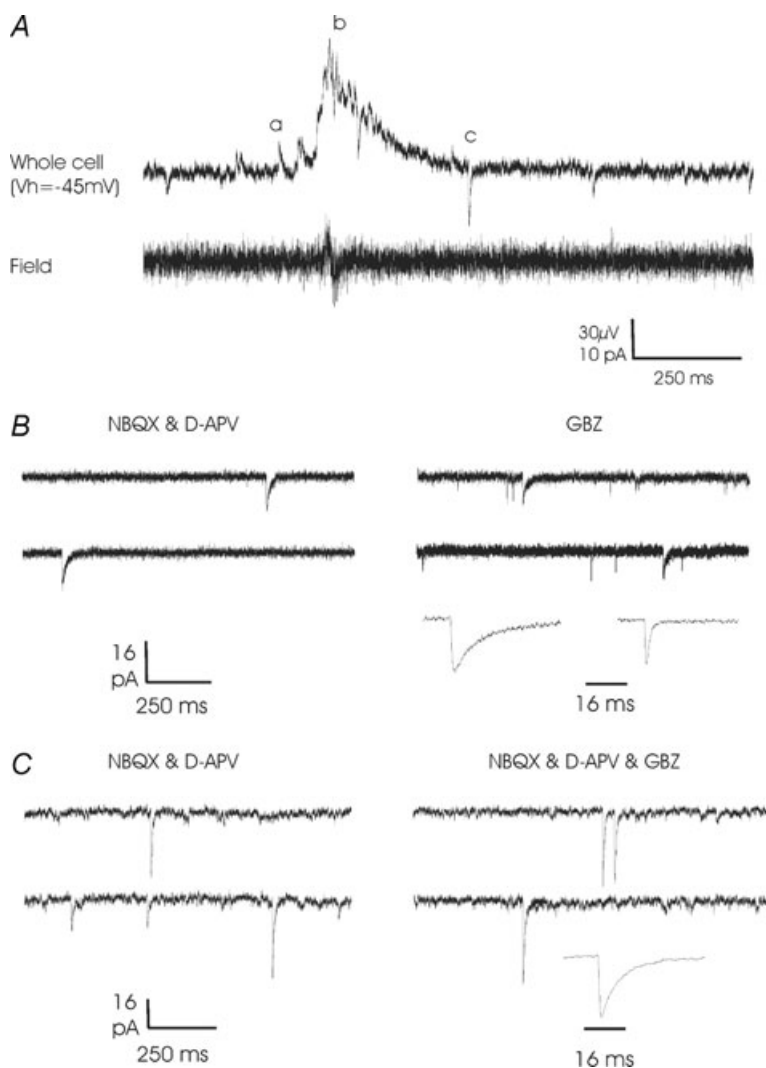


Figure 2. Spontaneous network-driven synaptic activity recovery

A, example of synaptic activity recorded during the washout of NBQX and D-AP5. Simultaneous whole cell (potassium methylsulphate pipette solution, the reversal GABA was set around -55 mV) and field recording in the CA3 rat hippocampal neuron. Spontaneous GABAergic (a, outward current) and glutamatergic (c, inward current) PSCs, as well as GDP (b) are shown. GDP is present in both whole-cell and field recordings. B, example of synaptic activity recorded during the washout of NBQX and D-AP5 in gabazine (GBZ, $0.1 \mu M$) (CsCl pipette solution, the reversal GABA was set around -0 mV). Both fast, likely sGlu-PSCs, and slow, likely sGABA_A-PSCs, events were recorded. Averaged fast and slow synaptic events are shown at an expanded time scale. C, example of synaptic activity recorded in NBQX and D-AP5 and following a further application of gabazine (GBZ, $0.1 \mu M$) (CsCl pipette solution). Only slow sGABA_A-PSCs were recorded. An averaged slow synaptic event is shown at an expanded time scale.

LLP_{GABA} was induced despite the lack of GDP recovery (from 2.7 ± 1.6 to 4.1 ± 2.2 Hz and 39 ± 6 to 54 ± 8 pA, $n=5$, $P < 0.05$ for both, Student's t test, Fig. 3A and D). Similar results were obtained with bicuculline ($10 \mu\text{M}$), which completely blocked the sGABA_A-PSCs (from 3.1 ± 1.3 to 5.2 ± 1.3 Hz and 42 ± 8 to 51 ± 6 pA, $n=5$, $P < 0.05$ for both, Student's t test, Fig. 3B and D). These results therefore show that neither GDPs nor sGABA_A-PSCs are required to trigger LLP_{GABA}, and suggest that sGlu-PSCs play a pivotal role in LLP_{GABA} induction. This conclusion was confirmed by blocking AMPA receptor activation with NBQX ($10 \mu\text{M}$) during activity recovery in control conditions (Fig. 3C) or in the presence of GBZ ($0.1 \mu\text{M}$, Fig. 3D). In these conditions, LLP_{GABA} was not observed (from 5.9 ± 1.5 to 5.6 ± 1.1 Hz and 46 ± 7 to 43 ± 10 pA, $n=6$, $P > 0.05$ for both, Student's t test).

Altogether, these data show that spontaneous glutamatergic synaptic activity is required to trigger LLP_{GABA}.

LLP_{GABA-A} requires endogenous BDNF

In a previous study, we reported that BDNF is required for the induction of Ca^{2+} -dependent GABAergic long-term potentiation in the newborn rat hippocampus (Gubellini *et al.* 2005). We therefore investigated the possible contribution of BDNF in LLP_{GABA-A} induction. k252a (200 nM), a membrane permeant inhibitor of protein tyrosine kinase coupled to Trk receptor family, bath

applied during the entire recording session, prevents the induction of LLP_{GABA-A} (from 4.2 ± 1.1 to 3.9 ± 0.9 Hz and 49 ± 6 to 51 ± 6 pA, $n=13$, $P > 0.05$ for both, Student's t test, Fig. 4A, E). We next investigated the effect of neurotrophin scavengers (Shelton *et al.* 1995), consisting of the extracellular domain of the Trk receptors fused to a human IgG Fc domain (Trk-IgG). In slices preincubated for 5–8 h with TrkB-IgG ($5 \mu\text{g ml}^{-1}$), to sequester endogenous BDNF, activity recovery failed to induce LLP_{GABA-A} (from 4.1 ± 1.1 to 3.9 ± 0.9 Hz and 43 ± 6 to 45 ± 8 pA, $n=11$, $P > 0.05$ for both, Student's t test, Fig. 4B and E). As control, slices were preincubated with TrkC-IgG, a scavenger of neurotrophin 3 (NT3). In these slices LLP_{GABA-A} was induced (from 4.5 ± 1.2 to 6.5 ± 1.1 Hz and 39 ± 5 to 62 ± 9 pA, $n=11$, $P < 0.05$ for both, Student's t test, Fig. 4B and E). Thus, a release of endogenous TrkB ligands is necessary to trigger LLP_{GABA-A}. LLP_{GABA-A} was also prevented when k252a (200 nM) was included in the patch pipette, showing that a postsynaptic protein tyrosine kinase activity is necessary to trigger LLP_{GABA-A} (from 3.9 ± 0.8 to 4.0 ± 0.9 Hz and 46 ± 6 to 50 ± 5 pA, $n=10$, $P > 0.05$ for both, Student's t test, Fig. 4C and E). Finally, to determine whether neurotrophin signalling is also required to maintain LLP_{GABA-A}, k252a was bath applied 15 min after LLP_{GABA-A} induction (from 1.8 ± 0.9 to 3.2 ± 1.1 Hz and 39 ± 4 to 51 ± 5 pA, $n=4$, $P < 0.05$ for both, Student's t test, Fig. 4D). k252a did not reverse LLP_{GABA-A} (from 3.2 ± 1.3 to 3.1 ± 1.2 Hz and 51 ± 11 to 52 ± 12 pA, $n=4$, $P > 0.05$ for both, Student's t test, Fig. 4D).

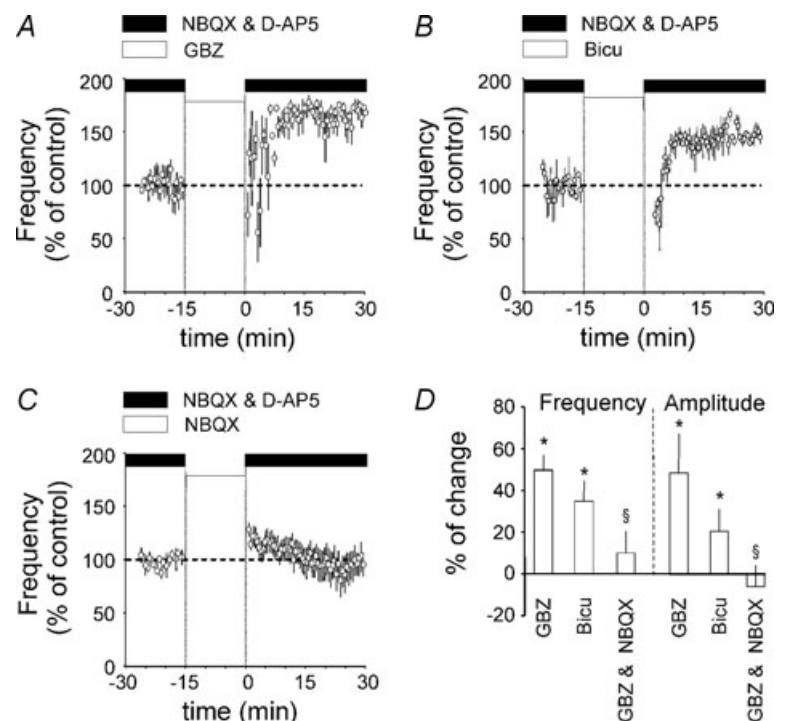


Figure 3. GDPs are not required to trigger LLP_{GABA-A}

A–C, average time course of sGABA_A-PSC frequency before and after activity recovery in the presence of gabazine ($0.1 \mu\text{M}$, $n=5$; A), bicuculline ($10 \mu\text{M}$, $n=5$; B), and NBQX ($10 \mu\text{M}$, $n=10$; C). D, bar plot showing the modification in sGABA_A-PSC frequency and amplitude induced by activity recovery in the different conditions.

Altogether, these data show that the activation of post-synaptic TrkB receptors by endogenous TrkB ligands is required to trigger LLP_{GABA-A}.

Exogenous BDNF induces a Ca²⁺-dependent enhancement of GABAergic activity

We next investigated the relationship between BDNF and Ca²⁺. To determine whether VDCC activation and calcium rise are downstream of TrkB receptors activation, we tested whether activation of these receptors with exogenous BDNF (5 ng ml⁻¹), during the period of activity recovery, bypasses the effect of calcium blockers and rescues LLP_{GABA-A}. As illustrated in Fig. 5A, exogenous

BDNF completely rescued the deficit of LLP_{GABA-A} induced by nifedipine (frequency and amplitude values of sGABA_A-PSCs increased, respectively, by 45 ± 18% (from 2.8 ± 1.1 to 4.4 ± 1.6 Hz) and 39 ± 9% (48 ± 2 to 67 ± 5 pA) 30 min after activity recovery in BDNF, *n* = 5, *P* < 0.05 for both, Student's *t* test), but had no effect on BAPTA loaded cells (frequency and amplitude values of sGABA_A-PSCs changed by 15 ± 7% (from 3.5 ± 0.8 to 4.1 ± 0.9 Hz) and -5 ± 6% (from 54 ± 7 to 48 ± 6 pA) 30 min after activity recovery in BDNF, *n* = 8, *P* > 0.05 for both, Student's *t* test). One possible interpretation of these results is that during the recovery of synaptic activity, the activation of L-type VDCC leads to BDNF secretion, and that once released, BDNF triggers

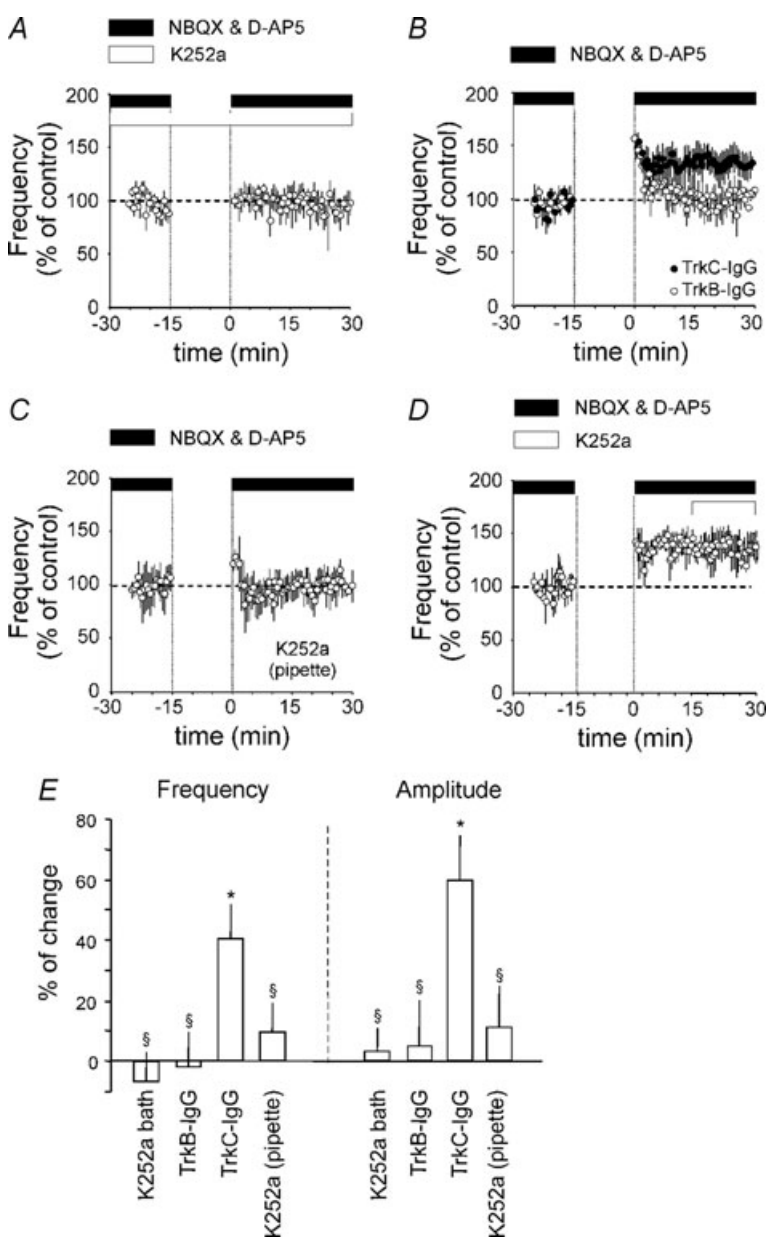
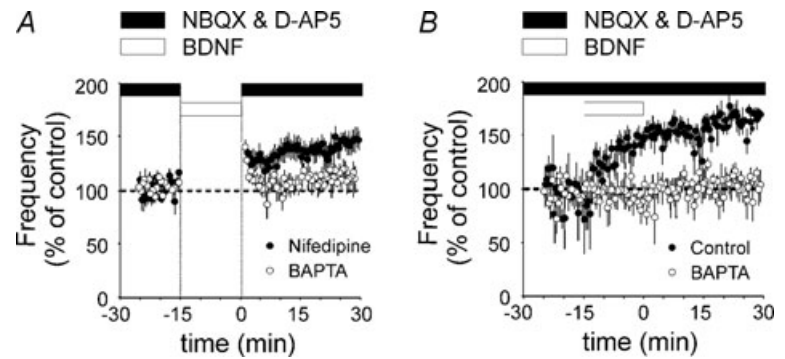


Figure 4. Requirement of postsynaptic BDNF-TrkB signalling activation for LLP_{GABA-A}

A, average time course of sGABA_A-PSC frequency before and after the synaptic activity recovery in the presence k252a (200 nM, *n* = 13). B, average time course of sGABA_A-PSC frequency before and after the activity recovery in TrkB-IgG (5 μg ml⁻¹, ●, *n* = 11) or in TrkB-IgG (5 μg ml⁻¹, ○, *n* = 11) preincubated slices. C, average time course of sGABA_A-PSC frequency before and after the activity recovery in k252a-loaded cells (200 nM, *n* = 10). D, average time course of sGABA_A-PSC frequency before and after the activity recovery. k252a (200 nM, grey bar, *n* = 4) was bath applied 15 min after LLP_{GABA-A} induction. E, bar plot showing the modification in sGABA_A-PSC frequency and amplitude induced by activity recovery in the different conditions.

Figure 5. Requirement of TrkB receptor-mediated postsynaptic $[Ca^{2+}]_i$ rise for LLP_{GABA-A}

A, average time course of sGABA_A-PSC frequency before and after bath applied BDNF during activity recovery in the presence of nifedipine (10 μ M, ●, $n = 5$) and BAPTA-loaded cells (10 mM, ○, $n = 8$). **B**, average time course of sGABA_A-PSC frequency before and after bath applied BDNF in the presence of NBQX (5 μ M) and D-AP5 (40 μ M) in control (●, $n = 5$) and BAPTA-loaded cells (10 mM, ○, $n = 6$).



LLP_{GABA-A} through a Ca^{2+} -dependent, but L-type VDCC independent, postsynaptic signalling cascade. To test this hypothesis we investigate whether BDNF is able to induce LLP_{GABA-A} in the presence of NBQX and D-AP5. As shown in Fig. 5B BDNF (5 ng ml⁻¹) induced a robust and long-lasting increase in both frequency ($52 \pm 10\%$, from 1.7 ± 0.7 to 2.9 ± 1 Hz) and amplitude ($32 \pm 11\%$, from 34 ± 6 to 48 ± 11 pA) of sGABA_A-PSCs that persisted for the duration of the recording session ($n = 5$, $P < 0.05$ for both, Student's t test). We next checked whether BDNF-dependent LLP_{GABA-A} requires postsynaptic Ca^{2+} -dependent signalling cascade by loading the postsynaptic neuron with BAPTA. In this condition the modification of GABAergic synaptic activity induced by BDNF was not observed: frequency and amplitude were, respectively, $-4 \pm 8\%$ (from 2.7 ± 0.9 to 3 ± 1.1 Hz) and $3 \pm 9\%$ (55 ± 6 to 58 ± 9 pA) of control 30 min after BDNF application ($n = 6$, $P > 0.05$ for both, Student's t test, Fig. 5B).

These results suggest that the activation of AMPA receptors trigger a VDCC-dependent secretion of BDNF that, in turn, induces LLP_{GABA-A} . To challenge this hypothesis we determined the amount of BDNF released in the different experimental conditions using an ELISA BDNF immuno-detection assay. Ten hippocampal slices were incubated for 30 min in 30 ml of ACSF supplemented with NBQX and D-AP5. After, incubation, a 6 ml fraction of the medium was collected. The slices were then transferred for 30 min in 30 ml of ACSF alone or supplemented with nifedipine (10 μ M), or GBZ (0.1 μ M), or NBQX (10 μ M), or AP5 (40 μ M), to allow activity recovery. Another 6 ml fraction of the medium was then collected. As illustrated in the Fig. 6, exogenous BDNF level increased upon activity recovery in control ACSF, in the presence of GBZ ($n = 3$, $P < 0.05$, Student's t test) or AP5 ($n = 3$, $P < 0.05$, Student's t test), but not in the presence of nifedipine or NBQX ($n = 3$ for both, $P > 0.05$, Student's t test).

Altogether, these results show that AMPA/KA-PSCs are required to maintain a high level of BDNF secretion through the activation of L-type VDCCs and that a postsynaptic $[Ca^{2+}]_i$ rise downstream of TrkB receptor activation is required to trigger LLP_{GABA-A} .

Discussion

The major finding of this study is that spontaneous AMPA/KA-PSCs trigger a Ca^{2+} -dependent long-lasting potentiation of GABAergic synaptic activity in the newborn rat hippocampus. This potentiation required the release of endogenous BDNF, which plays an instructive role through the activation of postsynaptic TrkB receptors. A Ca^{2+} -dependent long-term increase of GABAergic

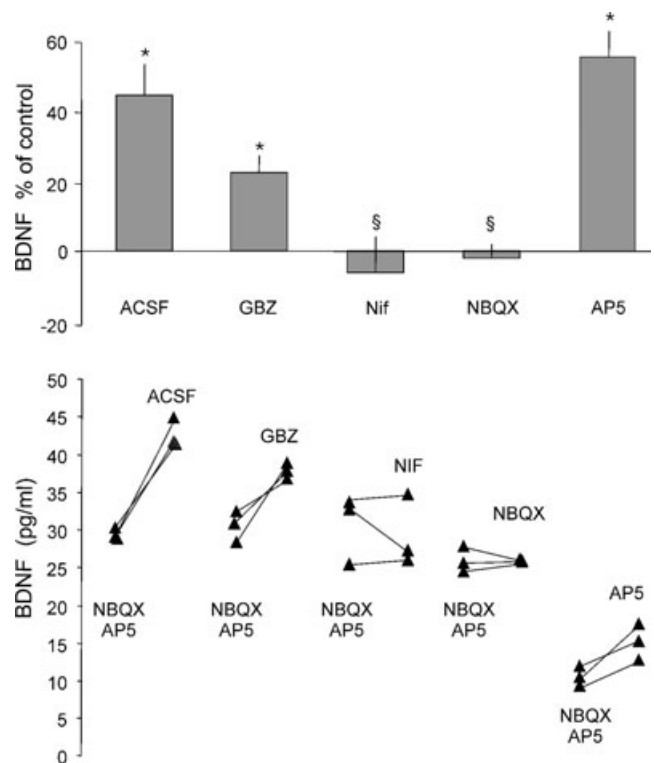


Figure 6. Spontaneous glutamatergic synaptic activity induced BDNF release

Mean percentage changes in the level of native BDNF measured in hippocampal slices during synaptic activity recovery in different conditions. Ten hippocampal slices were incubated for 30 min in NBQX (5 μ M) and D-AP5 (40 μ M) and then transferred in control ACSF (ACSF) or in ACSF containing Nifedipine (Nif, 10 μ M), gabazine (GBZ, 0.1 μ M), NBQX (10 μ M) or AP5 (40 μ M). $n = 3$ for each (* $P < 0.05$ when compared to control (NBQX and D-AP5); § $P < 0.05$ when compared to control recovery in ACSF).

synaptic efficacy can be induced in the developing rat hippocampus following tetanic stimulation of GABAergic fibres (McLean *et al.* 1996), postsynaptic firing of CA3 pyramidal neurons (Caillard *et al.* 1999) or pairing of GDPs with presynaptic stimulation of mossy fibres (Kasyanov *et al.* 2004). The present study shows that ongoing AMPA/KA-PSCs can induce a BDNF- and Ca^{2+} -dependent long-lasting potentiation of GABAergic synaptic transmission ($\text{LLP}_{\text{GABA-A}}$). In the developing rat hippocampus the GABAergic mossy fibres are potentiated by pairing sGDPs with presynaptic stimulation (Kasyanov *et al.* 2004). In the present study, sGDPs were not involved since $\text{LLP}_{\text{GABA-A}}$ was observed in the presence of a low concentration of gabazine, which blocks GDPs but not AMPA/KA-PSCs. Therefore at least two different forms of GABAergic plasticity are produced by spontaneous ongoing activity in the developing hippocampus. The first one relies on the associative activation of mossy fibre and GDPs and might contribute to the fine reorganization of mossy fibre connections. The second one relies on glutamatergic activity and might be important for the development of a correct balance between glutamatergic and GABAergic synaptic transmission in the CA3 circuitry.

Using ELISA BDNF immuno-detection we show that BDNF secretion is up-regulated during the recovery of AMPA/KA-PSCs. Because GABAergic interneurons do not produce neurotrophins themselves (Ernfors *et al.* 1990; Gorba & Wahle, 1999), BDNF is likely to be provided by the CA3 pyramidal neurons (Brigadski *et al.* 2005) or by mossy fibres arising from dentate gyrus granular cells (Danzer & McNamara, 2004). Whether dendritic and/or

axonal release of BDNF (Kohara *et al.* 2001; Brigadski *et al.* 2005; Kuczewski *et al.* 2008) contribute to the induction of $\text{LLP}_{\text{GABA-A}}$ remains to be determined. However, previous studies have reported that dendritic release of BDNF is blocked by the L-type Ca^{2+} channel blocker nifedipine (Kolarow *et al.* 2007) while axonal BDNF release is prevented by N-type Ca^{2+} channel blocker (Balkowiec & Katz, 2002; Wang *et al.* 2002). In the present study, nifedipine prevents $\text{LLP}_{\text{GABA-A}}$ and the increase in BDNF level during activity recovery suggesting a contribution of BDNF dendritic release. Therefore, along with the observation that exogenous BDNF potentiated GABAergic synapses and rescued the inhibitory effect of nifedipine, these results support the notion that BDNF released during AMPA/KA-PSCs acts as a target-derived and instructive messenger for $\text{LLP}_{\text{GABA-A}}$ induction.

A dendritic AMPA- and NMDA-dependent release of BDNF-GFP evoked by presynaptic tetanic stimulation of glutamatergic terminals can be induced in neuronal cultures (Hartmann *et al.* 2001). In agreement with a previous study (Mohajerani *et al.* 2007), we show that during ongoing synaptic activity activation of AMPA/KA receptors, but not NMDA receptors, is required to trigger a BDNF-dependent synaptic plasticity in the developing rat hippocampus. A glutamatergic receptor-independent dendritic release of BDNF can also be triggered by prolonged membrane depolarization of sufficient amplitude (Magby *et al.* 2006; Kuczewski *et al.* 2008). Thus, the stimulation conditions used critically determine the contribution of glutamatergic receptors for BDNF secretion. We previously reported that the depolarization mediated by the activation of ionotropic glutamatergic receptors during ongoing synaptic activity does not directly lead to BDNF secretion in neuronal cultures, but that instead back-propagating action potentials (b-APs) are required (Kuczewski *et al.* 2008). Whether b-APs similarly contribute to dendritic BDNF secretion in hippocampal slices, or whether AMPA/KA receptor mediated depolarization alone is sufficient to trigger VDCC activation and subsequent BDNF secretion remained to be determined.

Exogenous BDNF failed to rescue $\text{LLP}_{\text{GABA-A}}$ in BAPTA-loaded cells. This observation suggests that, in addition to the VDCC-dependent release of BDNF, a postsynaptic Ca^{2+} -dependent signalling cascade downstream to TrkB receptor activation is required to induce $\text{LLP}_{\text{GABA-A}}$. Accordingly, as reported in other studies (Tanaka *et al.* 1997; Cheng & Yeh, 2005a,b), we found that postsynaptic injection of BAPTA also prevents exogenous BDNF-induced $\text{LLP}_{\text{GABA-A}}$. With the observation that postsynaptic injection of k252a prevents $\text{LLP}_{\text{GABA-A}}$, these results support a postsynaptic action of BDNF. This does not, however, exclude the possibility that postsynaptic TrkB receptor activation might trigger the release of a retrograde messenger acting on the

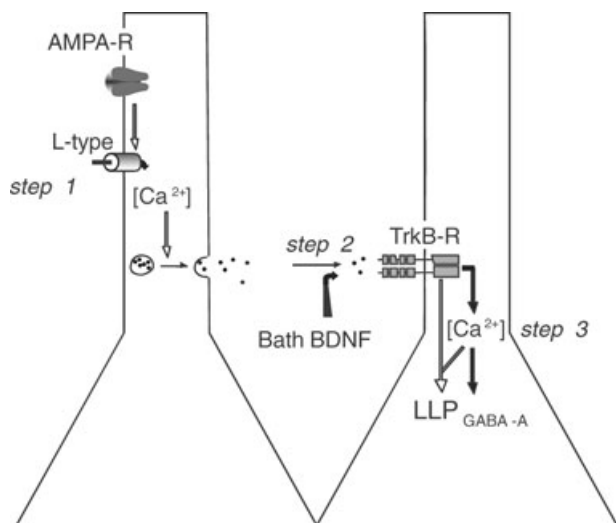


Figure 7. Paracrine action of BDNF triggers $\text{LLP}_{\text{GABA-A}}$

Schematic representation of the steps leading to $\text{LLP}_{\text{GABA-A}}$. Step 1 is prevented by nifedipine and NBQX, step 2 by TrkB-IgG, K252a, and step 3 by postsynaptic injection of BAPTA through the recording electrode. Bath applied BDNF can initiate step 2.

presynaptic site. Thus, a recent study reported that pairing presynaptic Schaffer collaterals with GDPs induced a BDNF-dependent potentiation of hippocampal glutamatergic synapses. Although this potentiation is expressed presynaptically, its induction involved postsynaptic mechanisms including a $[Ca^{2+}]_i$ rise and the phosphorylation of ERK induced by the activation of postsynaptic TrkB receptors (Mohajerani *et al.* 2007).

Based on our present data, the steps leading to LLP_{GABA-A} can be summarized as followed (Fig. 7). CA3 pyramidal cells release BDNF in response to the activation of L-type Ca^{2+} channels during AMPA/KA-PSCs (step 1). Once released, BDNF diffuses to bind on postsynaptic TrkB receptors (step 2), and induces LLP_{GABA-A} through a postsynaptic Ca^{2+} -dependent process (step 3). The relationship between postsynaptic TrkB receptor activation and postsynaptic $[Ca^{2+}]_i$ is presently unknown. Two hypotheses can be put forward: either TrkB receptor activation induces a rise in $[Ca^{2+}]_i$ leading to LLP_{GABA-A} (black arrow) or a basal level of $[Ca^{2+}]_i$ is required to allow TrkB-dependent induction of LLP_{GABA-A} (white arrow). If a $[Ca^{2+}]_i$ rise is required, possible candidates include release of Ca^{2+} from internal stores (Canossa *et al.* 1997; Li *et al.* 1998) or activation of transient receptor potential canonical (TRPC) channels (Li *et al.* 1999), which have been reported to mediate several biological effects induced by BDNF (Jia *et al.* 2007; Amaral *et al.* 2007).

In conclusion, we have shown that BDNF, released during spontaneous AMPA/KA-PSCs, trigger a long-lasting potentiation of GABAergic synaptic transmission in the newborn rat hippocampus. Impairing synaptic activity has been reported to produce structural and functional alterations that can be reverted by application of exogenous BDNF (McAllister *et al.* 1996; Rutherford *et al.* 1997; Marty *et al.* 2000; Seil & Drake-Baumann, 2000). Together with previous data showing that GDPs induce a BDNF-dependent LTP of glutamatergic synapses in the developing hippocampus (Mohajerani *et al.* 2007), these results point to a complex scenario in which synaptic activity and BDNF can modulate all aspects of hippocampal circuit formation.

References

- Aguado F, Carmona MA, Pozas E, Aguilo A, Martinez-Guijarro FJ, Alcantara S, Borrell V, Yuste R, Ibanez CF & Soriano E (2003). BDNF regulates spontaneous correlated activity at early developmental stages by increasing synaptogenesis and expression of K^+/Cl^- co-transport. *Development* **130**, 1287–1280.
- Amaral MD, Chapleau CA & Pozzo-Miller L (2007). Transient receptor potential channels as novel effectors of brain-derived neurotrophic factor signaling: potential implications for Rett syndrome. *Pharmacol Ther* **113**, 394–409.
- Balkowiec A & Katz DM (2002). Cellular mechanisms regulating activity-dependent release of native brain-derived neurotrophic factor from hippocampal neurons. *J Neurosci* **22**, 10399–10407.
- Ben-Ari Y, Cherubini E, Corradetti R & Gaiarsa J-L (1989). Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. *J Physiol* **416**, 303–325.
- Benevento LA, Bakkum BW & Cohen RS (1995). γ -Aminobutyric acid and somatostatin immunoreactivity in the visual cortex of normal and dark-reared rats. *Brain Res* **689**, 172–182.
- Brigadski T, Hartmann M & Lessmann V (2005). Differential vesicular targeting and time course of synaptic secretion of the mammalian neurotrophins. *J Neurosci* **25**, 7601–7614.
- Caillard O, Ben-Ari Y & Gaiarsa J-L (1999). Long-term potentiation of GABAergic synaptic transmission in neonatal rat hippocampus. *J Physiol* **518**, 109–119.
- Canossa M, Griesbeck O, Berninger B, Campana G, Kolbeck R & Thoenen H (1997). Neurotrophin release by neurotrophins: implications for activity-dependent neuronal plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 13279–13286.
- Carmona MA, Pozas E, Martinez A, Espinosa-Parrilla JF, Soriano E & Aguado F (2006). Age-dependent spontaneous hyperexcitability and impairment of GABAergic function in the hippocampus of mice lacking trkB. *Cereb Cortex* **16**, 47–63.
- Chattopadhyaya B, Di Cristo G, Higashiyama H, Knott GW, Kuhlman SJ, Welker E & Huang ZJ (2004). Experience and activity-dependent maturation of perisomatic GABAergic innervation in primary visual cortex during a postnatal critical period. *J Neurosci* **24**, 9598–9611.
- Cheng Q & Yeh HH (2005a). $PLC\gamma$ signaling underlies BDNF potentiation of Purkinje cell responses to GABA. *J Neurosci Res* **79**, 616–627.
- Cheng Q & Yeh HH (2005b). $PLC\gamma$ signaling underlies BDNF potentiation of Purkinje cell responses to GABA. *J Neurosci Res* **79**, 616–627.
- Colin-Le Brun I, Ferrand N, Caillard O, Tosetti P, Ben Ari Y & Gaiarsa JL (2004). Spontaneous synaptic activity is required for the formation of functional GABAergic synapses in the developing rat hippocampus. *J Physiol* **559**, 129–139.
- Danzer SC & McNamara JO (2004). Localization of brain-derived neurotrophic factor to distinct terminals of mossy fiber axons implies regulation of both excitation and feedforward inhibition of CA3 pyramidal cells. *J Neurosci* **24**, 11346–11355.
- Ernfors P, Wetmore C, Olson L & Persson H (1990). Identification of cells in rat brain and peripheral tissues expressing mRNA for members of the nerve growth factor family. *Neuron* **5**, 511–526.
- Gaiarsa JL, Caillard O & Ben Ari Y (2002). Long-term plasticity at GABAergic and glycinergic synapses: mechanisms and functional significance. *Trends Neurosci* **25**, 564–570.
- Gorba T & Wahle P (1999). Expression of TrkB and TrkC but not BDNF mRNA in neurochemically identified interneurons in rat visual cortex in vivo and in organotypic cultures. *Eur J Neurosci* **11**, 1179–1190.
- Gubellini P, Ben Ari Y & Gaiarsa JL (2005). Endogenous neurotrophins are required for the induction of GABAergic long-term potentiation in the neonatal rat hippocampus. *J Neurosci* **25**, 5796–5802.

- Hartmann M, Heumann R & Lessmann V (2001). Synaptic secretion of BDNF after high-frequency stimulation of glutamatergic synapses. *EMBO J* **20**, 5887–5897.
- Jia Y, Zhou J, Tai Y & Wang Y (2007). TRPC channels promote cerebellar granule neuron survival. *Nat Neurosci* **10**, 559–567.
- Jin X, Hu H, Mathers PH & Agmon A (2003). Brain-derived neurotrophic factor mediates activity-dependent dendritic growth in nonpyramidal neocortical interneurons in developing organotypic cultures. *J Neurosci* **23**, 5662–5673.
- Kasyanov AM, Safiulina VF, Voronin LL & Cherubini E (2004). GABA-mediated giant depolarizing potentials as coincidence detectors for enhancing synaptic efficacy in the developing hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 3967–3972.
- Kilman V, van Rossum MCW & Turrigiano GG (2002). Activity deprivation reduces miniature IPSC amplitude by decreasing the number of postsynaptic GABA_A receptors clustered at neocortical synapses. *J Neurosci* **22**, 1328–1337.
- Kohara K, Kitamura A, Morishima M & Tsumoto T (2001). Activity-dependent transfer of brain-derived neurotrophic factor to postsynaptic neurons. *Science* **291**, 2419–2423.
- Kolarow R, Brigadski T & Lessmann V (2007). Postsynaptic secretion of BDNF and NT-3 from hippocampal neurons depends on calcium calmodulin kinase II signaling and proceeds via delayed fusion pore opening. *J Neurosci* **27**, 10350–10364.
- Kuczewski N, Porcher C, Ferrand N, Fiorentino H, Pellegrino C, Kolarow R, Lessmann V, Medina I & Gaiarsa JL (2008). Back propagating action potentials trigger dendritic release of BDNF during spontaneous network activity. *J Neurosci* **28**, 7013–7023.
- Lessmann V, Gottmann K & Malcangio M (2003). Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Prog Neurobiol* **69**, 341–374.
- Li HS, Xu XZ & Montell C (1999). Activation of a TRPC3-dependent cation current through the neurotrophin BDNF. *Neuron* **24**, 261–273.
- Li YX, Zhang Y, Lester HA, Schuman EM & Davidson N (1998). Enhancement of neurotransmitter release induced by brain-derived neurotrophic factor in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* **18**, 10231–10240.
- MacLean Bolton M, Pittman AJ & Lo DC (2000). Brain-derived neurotrophic factor differentially regulates excitatory and inhibitory synaptic transmission in hippocampal neurons. *J Neurosci* **20**, 3221–3232.
- Magby JP, Bi C, Chen ZY, Lee FS & Plummer MR (2006). Single-cell characterization of retrograde signaling by brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* **26**, 13531–13536.
- Marty S, Berninger B, Carroll P & Thoenen H (1996). GABAergic stimulation regulates the phenotype of hippocampal interneurons through the regulation of brain-derived neurotrophic factor. *Neuron* **16**, 565–570.
- Marty S, Wehrle R & Sotelo C (2000). Neuronal activity and brain-derived neurotrophic factor regulate the density of inhibitory synapses in organotypic slice cultures of postnatal hippocampus. *J Neurosci* **20**, 8087–8095.
- McAllister AK, Katz LC & Lo DC (1996). Neurotrophic regulation of cortical dendritic growth requires activity. *Neuron* **17**, 1057–1064.
- McLean HA, Caillard O, Ben-Ari Y & Gaiarsa J-L (1996). Bidirectional plasticity expressed by GABAergic synapses in the neonatal rat hippocampus. *J Physiol* **496**, 471–477.
- Mohajerani MH, Sivakumaran S, Zacchi P, Aguilera P & Cherubini E (2007). Correlated network activity enhances synaptic efficacy via BDNF and the ERK pathway at immature CA3–CA1 connections in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 13176–13181.
- Ohba S, Ikeda T, Ikegaya Y, Nishiyama N, Matsuki N & Yamada MK (2005). BDNF locally potentiates GABAergic presynaptic machineries: target-selective circuit inhibition. *Cereb Cortex* **15**, 291–298.
- Rutherford LC, DeWan A, Lauer HM & Turrigiano GG (1997). Brain-derived neurotrophic factor mediates the activity-dependent regulation of inhibition in neocortical cultures. *J Neurosci* **17**, 4527–4535.
- Seil FJ & Drake-Baumann R (2000). TrkB receptor ligands promote activity-dependent inhibitory synaptogenesis. *J Neurosci* **20**, 5367–5373.
- Shelton DL, Sutherland J, Gripp J, Camerato T, Armanini MP, Phillips HS, Carroll K, Spencer SD & Levinson AD (1995). Human trks: molecular cloning, tissue distribution, and expression of extracellular domain immunoadhesins. *J Neurosci* **15**, 477–491.
- Tanaka T, Saito H & Matsuki N (1997). Inhibition of GABA_A synaptic responses by brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in rat hippocampus. *J Neurosci* **17**, 2959–2966.
- Wang X, Butowt R, Vasko MR & von Bartheld CS (2002). Mechanisms of the release of anterogradely transported neurotrophin-3 from axon terminals. *J Neurosci* **22**, 931–945.
- Zhang LI & Poo MM (2001). Electrical activity and development of neural circuits. *Nat Neurosci* **4**, 1207–1214.

Acknowledgements

This work was supported by INSERM, CNRS and ANR (Agence Nationale pour la Recherche). N.K. was the recipient of a FRM (Fondation pour la Recherche Médicale) fellowship and ANR grant (ANR-06-Neuro-017-01). We wish to thank Drs I. Medina, R. Khazipov and M. Colonnese for helpful comments and critical reading of the manuscript.

Références bibliographiques :

Livres :

Nota bene : Les références correspondant à des livres sont notées en rouges et suivies d'une astérisque.

Sporns, O : "Network of the Brain" (The MIT Press, 2011).

Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J : "The Hippocampus Book" (Oxford Neuroscience Séries, 2007).

Articles :

Aguiló, A., Schwartz, T.H, Kumar, V.S, Peterlin, Z.A, Tsiola, A, Soriano, E Yuste, R (1999) Involvement of cajal-retzius neurons in spontaneous correlated activity of embryonic and postnatal layer 1 from wild-type and reeler mice. J Neurosci 19:10856-10868.

Aika, Y., Ren, J.Q, Kosaka, K Kosaka, T (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. Exp Brain Res 99:267-276.

Ali, A.B., Deuchars, J, Pawelzik, H Thomson, A.M (1998) CA1 pyramidal to basket and bistratified cell EPSPs: dual intracellular recordings in rat hippocampal slices. J Physiol 507 (Pt 1):201-217.

Ali, F., Hindley, C, McDowell, G, Deibler, R, Jones, A, Kirschner, M, Guillemot, F Philpott, A (2011) Cell cycle-regulated multi-site phosphorylation of Neurogenin 2 coordinates cell cycling with differentiation during neurogenesis. Development 138:4267-4277.

Allene, C. Cossart, R (2010) Early NMDA receptor-driven waves of activity in the developing neocortex: physiological or pathological network oscillations?. J Physiol 588:83-91.

Altman, J. Bayer, S.A (1990) Prolonged sojourn of developing pyramidal cells in the intermediate zone of the hippocampus and their settling in the stratum pyramidale. J Comp Neurol 301:343-364.

Altman, J. Bayer, S.A (1990) Mosaic organization of the hippocampal neuroepithelium and the multiple germinal sources of dentate granule cells. J Comp Neurol 301:325-342.

Amaral, D.G. Dent, J.A (1981) Development of the mossy fibers of the dentate gyrus: I. A light and electron microscopic study of the mossy fibers and their expansions. J Comp Neurol 195:51-86.

Amaral, D.G. Kurz, J (1985) An analysis of the origins of the cholinergic and noncholinergic septal projections to the hippocampal formation of the rat. J Comp Neurol 240:37-59.

Amaral, D.G. Witter, M.P (1989) The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. Neuroscience 31:571-591.

Anderson, S.A., Eisenstat, D.D, Shi, L Rubenstein, J.L (1997) Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on *Dlx* genes. *Science* 278:474-476.

Angevine, J.B.J. (1965) Time of neuron origin in the hippocampal region. An autoradiographic study in the mouse. *Exp Neurol Suppl* :Suppl 2:1-70.

Angevine, J.B.J. Sidman, R.L (1961) Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. *Nature* 192:766-768.

Angulo, M.C., Kozlov, A.S, Charpak, S Audinat, E (2004) Glutamate released from glial cells synchronizes neuronal activity in the hippocampus. *J Neurosci* 24:6920-6927.

Aniksztejn, L., Demarque, M, Morozov, Y, Ben-Ari, Y Represa, A (2001) Recurrent CA1 collateral axons in developing rat hippocampus. *Brain Res* 913:195-200.

Araque, A., Parpura, V, Sanzgiri, R.P Haydon, P.G (1999) Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci* 22:208-215.

Baimbridge, K.G., Peet, M.J, McLennan, H Church, J (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-D28k. *Synapse* 7:269-277.

Barnes, A.P. Polleux, F (2009) Establishment of axon-dendrite polarity in developing neurons. *Annu Rev Neurosci* 32:347-381.

Bastrikova, N., Gardner, G.A, Reece, J.M, Jeromin, A Dudek, S.M (2008) Synapse elimination accompanies functional plasticity in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:3123-3127.

Bayer, S.A. (1980) Development of the hippocampal region in the rat. I. Neurogenesis examined with 3H-thymidine autoradiography. *J Comp Neurol* 190:87-114.

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

Behan, M. Haberly, L.B (1999) Intrinsic and efferent connections of the endopiriform nucleus in rat. *J Comp Neurol* 408:532-548.

Ben-Ari, Y. (2001) Developing networks play a similar melody. *Trends Neurosci* 24:353-360.

Ben-Ari, Y. Cossart, R (2000) Kainate, a double agent that generates seizures: two decades of progress. *Trends Neurosci* 23:580-587.

Ben-Ari, Y. Gho, M (1988) Long-lasting modification of the synaptic properties of rat CA3 hippocampal neurones induced by kainic acid. *J Physiol* 404:365-384.

Ben-Ari, Y., Cherubini, E, Corradetti, R Gaiarsa, J.L (1989) Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. *J Physiol* 416:303-325.

- Ben-Ari, Y., Gaiarsa, J, Tyzio, R Khazipov, R (2007) GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. *Physiol Rev* 87:1215-1284.
- Ben-Ari, Y., Khazipov, R, Leinekugel, X, Caillard, O Gaiarsa, J.L (1997) GABAA, NMDA and AMPA receptors: a developmentally regulated 'ménage à trois'. *Trends Neurosci* 20:523-529.
- Bertrand, N., Castro, D.S Guillemot, F (2002) Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat Rev Neurosci* 3:517-530.
- Bilkey, D.K. Schwartzkroin, P.A (1990) Variation in electrophysiology and morphology of hippocampal CA3 pyramidal cells. *Brain Res* 514:77-83.
- Bland, B.H., Konopacki, J Dyck, R (2005) Heterogeneity among hippocampal pyramidal neurons revealed by their relation to theta-band oscillation and synchrony. *Exp Neurol* 195:458-474.
- Blankenship, A.G. Feller, M.B (2010) Mechanisms underlying spontaneous patterned activity in developing neural circuits. *Nat Rev Neurosci* 11:18-29.
- Blatow, M., Caputi, A, Burnashev, N, Monyer, H Rozov, A (2003) Ca²⁺ buffer saturation underlies paired pulse facilitation in calbindin-D28k-containing terminals. *Neuron* 38:79-88.
- 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* 326:1419-1424.
- Bormann, J. (2000) The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci* 21:16-19.
- Bortone, D. Polleux, F (2009) KCC2 expression promotes the termination of cortical interneuron migration in a voltage-sensitive calcium-dependent manner. *Neuron* 62:53-71.
- Bragin, A., Jandó, G, Nádasdy, Z, Hetke, J, Wise, K Buzsáki, G (1995) Gamma (40-100 Hz) oscillation in the hippocampus of the behaving rat. *J Neurosci* 15:47-60.
- Brecht, M., Schneider, M, Sakmann, B Margrie, T.W (2004) Whisker movements evoked by stimulation of single pyramidal cells in rat motor cortex. *Nature* 427:704-710.
- Brown, S.P. Hestrin, S (2009) Intracortical circuits of pyramidal neurons reflect their long-range axonal targets. *Nature* 457:1133-1136.
- Brown, S.P. Hestrin, S (2009) Cell-type identity: a key to unlocking the function of neocortical circuits. *Curr Opin Neurobiol* 19:415-421.
- Brun, V.H., Otnass, M.K, Molden, S, Steffenach, H, Witter, M.P, Moser, M Moser, E.I (2002) Place cells and place recognition maintained by direct entorhinal-hippocampal circuitry. *Science* 296:2243-2246.

- Buhl, E.H., Halasy, K Somogyi, P (1994) Diverse sources of hippocampal unitary inhibitory postsynaptic potentials and the number of synaptic release sites. *Nature* 368:823-828.
- Burkhalter, A. (2008) Many specialists for suppressing cortical excitation. *Front Neurosci* 2:155-167.
- Butt, S.J.B., Fuccillo, M, Nery, S, Noctor, S, Kriegstein, A, Corbin, J.G Fishell, G (2005) The temporal and spatial origins of cortical interneurons predict their physiological subtype. *Neuron* 48:591-604.
- Buzsáki, G. (1986) Hippocampal sharp waves: their origin and significance. *Brain Res* 398:242-252.
- Caeser, M. Aertsen, A (1991) Morphological organization of rat hippocampal slice cultures. *J Comp Neurol* 307:87-106.
- Calderon de Anda, F., Gärtner, A, Tsai, L Dotti, C.G (2008) Pyramidal neuron polarity axis is defined at the bipolar stage. *J Cell Sci* 121:178-185.
- Cardin, J.A., Carlén, M, Meletis, K, Knoblich, U, Zhang, F, Deisseroth, K, Tsai, L Moore, C.I (2009) Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses. *Nature* 459:663-667.
- Case, M. Soltesz, I (2009) Discreet charm of the GABAergic bourgeoisie: superconnected cells conduct developmental symphonies. *Neuron* 64:780-782.
- Cattani, A.A., Bonfardin, V.D, Represa, A, Ben-Ari, Y Aniksztejn, L (2007) Generation of slow network oscillations in the developing rat hippocampus after blockade of glutamate uptake. *J Neurophysiol* 98:2324-2336.
- Cavalheiro, E.A., Santos, N.F Priel, M.R (1996) The pilocarpine model of epilepsy in mice. *Epilepsia* 37:1015-1019.
- Celio, M.R. (1990) Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience* 35:375-475.
- Ceranik, K., Deng, J, Heimrich, B, Lübke, J, Zhao, S, Förster, E Frotscher, M (1999) Hippocampal Cajal-Retzius cells project to the entorhinal cortex: retrograde tracing and intracellular labelling studies. *Eur J Neurosci* 11:4278-4290.
- Chao, D.L., Ma, L Shen, K (2009) Transient cell-cell interactions in neural circuit formation. *Nat Rev Neurosci* 10:262-271.
- Charles, A.C., Merrill, J.E, Dirksen, E.R Sanderson, M.J (1991) Intercellular signaling in glial cells: calcium waves and oscillations in response to mechanical stimulation and glutamate. *Neuron* 6:983-992.

Chicurel, M.E. Harris, K.M (1992) Three-dimensional analysis of the structure and composition of CA3 branched dendritic spines and their synaptic relationships with mossy fiber boutons in the rat hippocampus. *J Comp Neurol* 325:169-182.

Choi, Y., Lee, M, Sung, K, Jeong, S, Choi, J, Park, H, Kim, O.N, Lee, S.B Kim, S.Y (2003) Regional differences in enhanced neurogenesis in the dentate gyrus of adult rats after transient forebrain ischemia. *Mol Cells* 16:232-238.

Chorin, E., Vinograd, O, Fleidervish, I, Gilad, D, Herrmann, S, Sekler, I, Aizenman, E Hershfinkel, M (2011) Upregulation of KCC2 activity by zinc-mediated neurotransmission via the mZnR/GPR39 receptor. *J Neurosci* 31:12916-12926.

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

Cobb, S.R. Davies, C.H (2005) Cholinergic modulation of hippocampal cells and circuits. *J Physiol* 562:81-88.

Cobb, S.R., Bulters, D.O, Suchak, S, Riedel, G, Morris, R.G Davies, C.H (1999) Activation of nicotinic acetylcholine receptors patterns network activity in the rodent hippocampus. *J Physiol* 518 (Pt 1):131-140.

Cobb, S.R., Halasy, K, Vida, I, Nyiri, G, Tamás, G, Buhl, E.H Somogyi, P (1997) Synaptic effects of identified interneurons innervating both interneurons and pyramidal cells in the rat hippocampus. *Neuroscience* 79:629-648.

Colom, L.V. Saggau, P (1994) Spontaneous interictal-like activity originates in multiple areas of the CA2-CA3 region of hippocampal slices. *J Neurophysiol* 71:1574-1585.

Cornell-Bell, A.H., Finkbeiner, S.M, Cooper, M.S Smith, S.J (1990) Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science* 247:470-473.

Cossart, R., Bernard, C Ben-Ari, Y (2005) Multiple facets of GABAergic neurons and synapses: multiple fates of GABA signalling in epilepsies. *Trends Neurosci* 28:108-115.

Crépel, V., Aronov, D, Jorquera, I, Represa, A, Ben-Ari, Y Cossart, R (2007) A parturition-associated nonsynaptic coherent activity pattern in the developing hippocampus. *Neuron* 54:105-120.

Csicsvari, J., Henze, D.A, Jamieson, B, Harris, K.D, Sirota, A, Barthó, P, Wise, K.D Buzsáki, G (2003) Massively parallel recording of unit and local field potentials with silicon-based electrodes. *J Neurophysiol* 90:1314-1323.

Csicsvari, J., Hirase, H, Czurkó, A, Mamiya, A Buzsáki, G (1999) Oscillatory coupling of hippocampal pyramidal cells and interneurons in the behaving Rat. *J Neurosci* 19:274-287.

Csicsvari, J., Hirase, H, Mamiya, A Buzsáki, G (2000) Ensemble patterns of hippocampal CA3-CA1 neurons during sharp wave-associated population events. *Neuron* 28:585-594.

Curia, G., Longo, D, Biagini, G, Jones, R.S.G Avoli, M (2008) The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci Methods* 172:143-157.

Danglot, L., Triller, A Marty, S (2006) The development of hippocampal interneurons in rodents. *Hippocampus* 16:1032-1060.

De Blasi, A., Conn, P.J, Pin, J Nicoletti, F (2001) Molecular determinants of metabotropic glutamate receptor signaling. *Trends Pharmacol Sci* 22:114-120.

DeFelipe, J. (1993) Neocortical neuronal diversity: chemical heterogeneity revealed by colocalization studies of classic neurotransmitters, neuropeptides, calcium-binding proteins, and cell surface molecules. *Cereb Cortex* 3:273-289.

DeFelipe, J. Fariñas, I (1992) The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Prog Neurobiol* 39:563-607.

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

Deller, T., Drakew, A Frotscher, M (1999) Different primary target cells are important for fiber lamination in the fascia dentata: a lesson from reeler mutant mice. *Exp Neurol* 156:239-253.

Deller, T., Drakew, A, Heimrich, B, Förster, E, Tielsch, A Frotscher, M (1999) The hippocampus of the reeler mutant mouse: fiber segregation in area CA1 depends on the position of the postsynaptic target cells. *Exp Neurol* 156:254-267.

Dombeck, D.A., Harvey, C.D, Tian, L, Looger, L.L Tank, D.W (2010) Functional imaging of hippocampal place cells at cellular resolution during virtual navigation. *Nat Neurosci* 13:1433-1440.

Dong, H., Swanson, L.W, Chen, L, Faselow, M.S Toga, A.W (2009) Genomic-anatomic evidence for distinct functional domains in hippocampal field CA1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:11794-11799.

Dreier, J.P. Heinemann, U (1991) Regional and time dependent variations of low Mg²⁺ induced epileptiform activity in rat temporal cortex slices. *Exp Brain Res* 87:581-596.

Dumas, T.C., Powers, E.C, Tarapore, P.E Sapolsky, R.M (2004) Overexpression of calbindin D(28k) in dentate gyrus granule cells alters mossy fiber presynaptic function and impairs hippocampal-dependent memory. *Hippocampus* 14:701-709.

Durand, G.M., Kovalchuk, Y Konnerth, A (1996) Long-term potentiation and functional synapse induction in developing hippocampus. *Nature* 381:71-75.

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

Ego-Stengel, V. Wilson, M.A (2010) Disruption of ripple-associated hippocampal activity during rest impairs spatial learning in the rat. *Hippocampus* 20:1-10.

Ekstrom, A.D., Kahana, M.J, Caplan, J.B, Fields, T.A, Isham, E.A, Newman, E.L Fried, I (2003) Cellular networks underlying human spatial navigation. *Nature* 425:184-188.

Elias, L.A.B. Kriegstein, A.R (2008) Gap junctions: multifaceted regulators of embryonic cortical development. *Trends Neurosci* 31:243-250.

Ellender, T.J. Paulsen, O (2010) The many tunes of perisomatic targeting interneurons in the hippocampal network. *Front Cell Neurosci* 4:.

Ellender, T.J., Nissen, W, Colgin, L.L, Mann, E.O Paulsen, O (2010) Priming of hippocampal population bursts by individual perisomatic-targeting interneurons. *J Neurosci* 30:5979-5991.

Fabian-Fine, R., Skehel, P, Errington, M.L, Davies, H.A, Sher, E, Stewart, M.G Fine, A (2001) Ultrastructural distribution of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor subunit in rat hippocampus. *J Neurosci* 21:7993-8003.

Fanselow, M.S. Dong, H (2010) Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures?. *Neuron* 65:7-19.

Feldt, S., Bonifazi, P Cossart, R (2011) Dissecting functional connectivity of neuronal microcircuits: experimental and theoretical insights. *Trends Neurosci* 34:225-236.

Fellin, T., Gomez-Gonzalo, M, Gobbo, S, Carmignoto, G Haydon, P.G (2006) Astrocytic glutamate is not necessary for the generation of epileptiform neuronal activity in hippocampal slices. *J Neurosci* 26:9312-9322.

Fellin, T., Pascual, O, Gobbo, S, Pozzan, T, Haydon, P.G Carmignoto, G (2004) Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors. *Neuron* 43:729-743.

Fino, E. Yuste, R (2011) Dense inhibitory connectivity in neocortex. *Neuron* 69:1188-1203.

Fiorentino, H., Kuczewski, N, Diabira, D, Ferrand, N, Pangalos, M.N, Porcher, C Gaiarsa, J (2009) GABA(B) receptor activation triggers BDNF release and promotes the maturation of GABAergic synapses. *J Neurosci* 29:11650-11661.

Fisahn, A., Pike, F.G, Buhl, E.H Paulsen, O (1998) Cholinergic induction of network oscillations at 40 Hz in the hippocampus in vitro. *Nature* 394:186-189.

- Fischer, Y., Wittner, L, Freund, T.F Gähwiler, B.H (2002) Simultaneous activation of gamma and theta network oscillations in rat hippocampal slice cultures. *J Physiol* 539:857-868.
- Fishell, G. Hanashima, C (2008) Pyramidal neurons grow up and change their mind. *Neuron* 57:333-338.
- Fode, C., Ma, Q, Casarosa, S, Ang, S.L, Anderson, D.J Guillemot, F (2000) A role for neural determination genes in specifying the dorsoventral identity of telencephalic neurons. *Genes Dev* 14:67-80.
- Frederickson, C.J., Koh, J Bush, A.I (2005) The neurobiology of zinc in health and disease. *Nat Rev Neurosci* 6:449-462.
- Freund, T.F. Buzsáki, G (1996) Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6:347-470.
- Frotscher, M. (1998) Cajal-Retzius cells, Reelin, and the formation of layers. *Curr Opin Neurobiol* 8:570-575.
- Frotscher, M. Heimrich, B (1993) Formation of layer-specific fiber projections to the hippocampus in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:10400-10403.
- Frotscher, M., Schlander, M Léránth, C (1986) Cholinergic neurons in the hippocampus. A combined light- and electron-microscopic immunocytochemical study in the rat. *Cell Tissue Res* 246:293-301.
- Frotscher, M., Vida, I Bender, R (2000) Evidence for the existence of non-GABAergic, cholinergic interneurons in the rodent hippocampus. *Neuroscience* 96:27-31.
- Fuentealba, P., Begum, R, Capogna, M, Jinno, S, Márton, L.F, Csicsvari, J, Thomson, A, Somogyi, P Klausberger, T (2008) Ivy cells: a population of nitric-oxide-producing, slow-spiking GABAergic neurons and their involvement in hippocampal network activity. *Neuron* 57:917-929.
- GRASTYAN, E., LISSAK, K, MADARASZ, I DONHOFFER, H (1959) Hippocampal electrical activity during the development of conditioned reflexes. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 11:409-430.
- Gal, J.S., Morozov, Y.M, Ayoub, A.E, Chatterjee, M, Rakic, P Haydar, T.F (2006) Molecular and morphological heterogeneity of neural precursors in the mouse neocortical proliferative zones. *J Neurosci* 26:1045-1056.
- Galichet, C., Guillemot, F Parras, C.M (2008) Neurogenin 2 has an essential role in development of the dentate gyrus. *Development* 135:2031-2041.
- Gillies, M.J., Traub, R.D, LeBeau, F.E.N, Davies, C.H, Gloveli, T, Buhl, E.H Whittington, M.A (2002) A model of atropine-resistant theta oscillations in rat hippocampal area CA1. *J Physiol* 543:779-793.

Girardeau, G., Benchenane, K, Wiener, S.I, Buzsáki, G Zugaro, M.B (2009) Selective suppression of hippocampal ripples impairs spatial memory. *Nat Neurosci* 12:1222-1223.

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

Gomez-Di Cesare, C.M., Smith, K.L, Rice, F.L Swann, J.W (1997) Axonal remodeling during postnatal maturation of CA3 hippocampal pyramidal neurons. *J Comp Neurol* 384:165-180.

Gonzales, R.B., DeLeon Galvan, C.J, Rangel, Y.M Claiborne, B.J (2001) Distribution of thorny excrescences on CA3 pyramidal neurons in the rat hippocampus. *J Comp Neurol* 430:357-368.

Goutagny, R., Jackson, J Williams, S (2009) Self-generated theta oscillations in the hippocampus. *Nat Neurosci* 12:1491-1493.

Grabrucker, A.M., Knight, M.J, Proepper, C, Bockmann, J, Joubert, M, Rowan, M, Nienhaus, G.U, Garner, C.C, Bowie, J.U, Kreutz, M.R, Gundelfinger, E.D Boeckers, T.M (2011) Concerted action of zinc and ProSAP/Shank in synaptogenesis and synapse maturation. *EMBO J* 30:569-581.

Green, E.J. Juraska, J.M (1985) The dendritic morphology of hippocampal dentate granule cells varies with their position in the granule cell layer: a quantitative Golgi study. *Exp Brain Res* 59:582-586.

Grosse, G., Draguhn, A, Höhne, L, Tapp, R, Veh, R.W Ahnert-Hilger, G (2000) Expression of Kv1 potassium channels in mouse hippocampal primary cultures: development and activity-dependent regulation. *J Neurosci* 20:1869-1882.

Gulyás, A.I., Megías, M, Emri, Z Freund, T.F (1999) Total number and ratio of excitatory and inhibitory synapses converging onto single interneurons of different types in the CA1 area of the rat hippocampus. *J Neurosci* 19:10082-10097.

Gulyás, A.I., Tóth, K, McBain, C.J Freund, T.F (1998) Stratum radiatum giant cells: a type of principal cell in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 10:3813-3822.

Guzowski, J.F., Knierim, J.J Moser, E.I (2004) Ensemble dynamics of hippocampal regions CA3 and CA1. *Neuron* 44:581-584.

Götz, M. Huttner, W.B (2005) The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:777-788.

Hand, R. Polleux, F (2011) Neurogenin2 regulates the initial axon guidance of cortical pyramidal neurons projecting medially to the corpus callosum. *Neural Dev* 6:30.

Hand, R., Bortone, D, Mattar, P, Nguyen, L, Heng, J.I, Guerrier, S, Boutt, E, Peters, E, Barnes, A.P, Parras, C, Schuurmans, C, Guillemot, F Polleux, F (2005) Phosphorylation of Neurogenin2

specifies the migration properties and the dendritic morphology of pyramidal neurons in the neocortex. *Neuron* 48:45-62.

Harris, K.D., Henze, D.A, Hirase, H, Leinekugel, X, Dragoi, G, Czurkó, A Buzsáki, G (2002) Spike train dynamics predicts theta-related phase precession in hippocampal pyramidal cells. *Nature* 417:738-741.

Hayashi, N., Oohira, A Miyata, S (2005) Synaptic localization of receptor-type protein tyrosine phosphatase zeta/beta in the cerebral and hippocampal neurons of adult rats. *Brain Res* 1050:163-169.

Hefft, S., Hulo, S, Bertrand, D Muller, D (1999) Synaptic transmission at nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal organotypic cultures and slices. *J Physiol* 515 (Pt 3):769-776.

Hemond, P., Epstein, D, Boley, A, Migliore, M, Ascoli, G.A Jaffe, D.B (2008) Distinct classes of pyramidal cells exhibit mutually exclusive firing patterns in hippocampal area CA3b. *Hippocampus* 18:411-424.

Hemond, P., Migliore, M, Ascoli, G.A Jaffe, D.B (2009) The membrane response of hippocampal CA3b pyramidal neurons near rest: Heterogeneity of passive properties and the contribution of hyperpolarization-activated currents. *Neuroscience* 160:359-370.

Heng, J.I., Nguyen, L, Castro, D.S, Zimmer, C, Wildner, H, Armant, O, Skowronska-Krawczyk, D, Bedogni, F, Matter, J, Hevner, R Guillemot, F (2008) Neurogenin 2 controls cortical neuron migration through regulation of Rnd2. *Nature* 455:114-118.

Hennou, S., Khalilov, I, Diabira, D, Ben-Ari, Y Gozlan, H (2002) Early sequential formation of functional GABA(A) and glutamatergic synapses on CA1 interneurons of the rat foetal hippocampus. *Eur J Neurosci* 16:197-208.

Hevner, R.F. (2006) From radial glia to pyramidal-projection neuron: transcription factor cascades in cerebral cortex development. *Mol Neurobiol* 33:33-50.

Hevner, R.F., Hodge, R.D, Daza, R.A.M Englund, C (2006) Transcription factors in glutamatergic neurogenesis: conserved programs in neocortex, cerebellum, and adult hippocampus. *Neurosci Res* 55:223-233.

Ho, M.T., Pelkey, K.A, Topolnik, L, Petralia, R.S, Takamiya, K, Xia, J, Huganir, R.L, Lacaille, J McBain, C.J (2007) Developmental expression of Ca²⁺-permeable AMPA receptors underlies depolarization-induced long-term depression at mossy fiber CA3 pyramid synapses. *J Neurosci* 27:11651-11662.

Houweling, A.R. Brecht, M (2008) Behavioural report of single neuron stimulation in somatosensory cortex. *Nature* 451:65-68.

Huberfeld, G., Menendez de la Prida, L, Pallud, J, Cohen, I, Le Van Quyen, M, Adam, C, Clemenceau, S, Baulac, M Miles, R (2011) Glutamatergic pre-ictal discharges emerge at the transition to seizure in human epilepsy. *Nat Neurosci* 14:627-634.

Hájos, N. Paulsen, O (2009) Network mechanisms of gamma oscillations in the CA3 region of the hippocampus. *Neural Netw* 22:1113-1119.

Ishizuka, N., Cowan, W.M Amaral, D.G (1995) A quantitative analysis of the dendritic organization of pyramidal cells in the rat hippocampus. *J Comp Neurol* 362:17-45.

Ishizuka, N., Weber, J Amaral, D.G (1990) Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat. *J Comp Neurol* 295:580-623.

Jezek, K., Henriksen, E.J, Treves, A, Moser, E.I Moser, M (2011) Theta-paced flickering between place-cell maps in the hippocampus. *Nature* 478:246-249.

Jinno, S. (2009) Structural organization of long-range GABAergic projection system of the hippocampus. *Front Neuroanat* 3:13.

Jinno, S. Kosaka, T (2002) Immunocytochemical characterization of hippocamposeptal projecting GABAergic nonprincipal neurons in the mouse brain: a retrograde labeling study. *Brain Res* 945:219-231.

Jinno, S., Klausberger, T, Marton, L.F, Dalezios, Y, Roberts, J.D.B, Fuentealba, P, Bushong, E.A, Henze, D, Buzsáki, G Somogyi, P (2007) Neuronal diversity in GABAergic long-range projections from the hippocampus. *J Neurosci* 27:8790-8804.

Kanaya-Ida, S. Ben Ari, Y (1989) Transient increase in the number of cholinergic neurons in the developing rat dentate gyrus. *Neurosci Lett* 101:23-28.

Kanold, P.O. Luhmann, H.J (2010) The subplate and early cortical circuits. *Annu Rev Neurosci* 33:23-48.

Katz, L.C. Shatz, C.J (1996) Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science* 274:1133-1138.

Kawachi, H., Tamura, H, Watakabe, I, Shintani, T, Maeda, N Noda, M (1999) Protein tyrosine phosphatase zeta/RPTPbeta interacts with PSD-95/SAP90 family. *Brain Res Mol Brain Res* 72:47-54.

Khalilov, I., Dzhalal, V, Ben-Ari, Y Khazipov, R (1999) Dual role of GABA in the neonatal rat hippocampus. *Dev Neurosci* 21:310-319.

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

Khalilov, I., Khazipov, R, Esclapez, M Ben-Ari, Y (1997) Bicuculline induces ictal seizures in the intact hippocampus recorded in vitro. *Eur J Pharmacol* 319:R5-6.

Khazipov, R., Congar, P Ben-Ari, Y (1995) Hippocampal CA1 lacunosum-moleculare interneurons: modulation of monosynaptic GABAergic IPSCs by presynaptic GABAB receptors. *J Neurophysiol* 74:2126-2137.

Khazipov, R., Esclapez, M, Caillard, O, Bernard, C, Khalilov, I, Tyzio, R, Hirsch, J, Dzhalala, V, Berger, B Ben-Ari, Y (2001) Early development of neuronal activity in the primate hippocampus in utero. *J Neurosci* 21:9770-9781.

Khirug, S., Yamada, J, Afzalov, R, Voipio, J, Khiroug, L Kaila, K (2008) GABAergic depolarization of the axon initial segment in cortical principal neurons is caused by the Na-K-2Cl cotransporter NKCC1. *J Neurosci* 28:4635-4639.

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

Klausberger, T., Magill, P.J, Márton, L.F, Roberts, J.D.B, Cobden, P.M, Buzsáki, G Somogyi, P (2003) Brain-state- and cell-type-specific firing of hippocampal interneurons in vivo. *Nature* 421:844-848.

Koester, S.E. O'Leary, D.D (1993) Connectional distinction between callosal and subcortically projecting cortical neurons is determined prior to axon extension. *Dev Biol* 160:1-14.

Konopacki, J., Bland, B.H, MacIver, M.B Roth, S.H (1987) Cholinergic theta rhythm in transected hippocampal slices: independent CA1 and dentate generators. *Brain Res* 436:217-222.

Kowalczyk, T., Pontious, A, Englund, C, Daza, R.A.M, Bedogni, F, Hodge, R, Attardo, A, Bell, C, Huttner, W.B Hevner, R.F (2009) Intermediate neuronal progenitors (basal progenitors) produce pyramidal-projection neurons for all layers of cerebral cortex. *Cereb Cortex* 19:2439-2450.

Kriegstein, A.R. Noctor, S.C (2004) Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex. *Trends Neurosci* 27:392-399.

Krnjević, K. (2004) How does a little acronym become a big transmitter?. *Biochem Pharmacol* 68:1549-1555.

Kubota, D., Colgin, L.L, Casale, M, Brucher, F.A Lynch, G (2003) Endogenous waves in hippocampal slices. *J Neurophysiol* 89:81-89.

Kubota, Y., Hatada, S, Kondo, S, Karube, F Kawaguchi, Y (2007) Neocortical inhibitory terminals innervate dendritic spines targeted by thalamocortical afferents. *J Neurosci* 27:1139-1150.

Lahtinen, H., Palva, J.M, Sumanen, S, Voipio, J, Kaila, K Taira, T (2002) Postnatal development of rat hippocampal gamma rhythm in vivo. *J Neurophysiol* 88:1469-1474.

- Larimer, P. Strowbridge, B.W (2010) Representing information in cell assemblies: persistent activity mediated by semilunar granule cells. *Nat Neurosci* 13:213-222.
- Lee, I., Yoganarasimha, D, Rao, G Knierim, J.J (2004) Comparison of population coherence of place cells in hippocampal subfields CA1 and CA3. *Nature* 430:456-459.
- 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* 296:2049-2052.
- Leone, D.P., Srinivasan, K, Chen, B, Alcamo, E McConnell, S.K (2008) The determination of projection neuron identity in the developing cerebral cortex. *Curr Opin Neurobiol* 18:28-35.
- Leutgeb, S. Leutgeb, J.K (2007) Pattern separation, pattern completion, and new neuronal codes within a continuous CA3 map. *Learn Mem* 14:745-757.
- Leutgeb, S., Leutgeb, J.K, Treves, A, Moser, M Moser, E.I (2004) Distinct ensemble codes in hippocampal areas CA3 and CA1. *Science* 305:1295-1298.
- Levey, A.I., Edmunds, S.M, Koliatsos, V, Wiley, R.G Heilman, C.J (1995) Expression of m1-m4 muscarinic acetylcholine receptor proteins in rat hippocampus and regulation by cholinergic innervation. *J Neurosci* 15:4077-4092.
- Li, C.T., Poo, M Dan, Y (2009) Burst spiking of a single cortical neuron modifies global brain state. *Science* 324:643-646.
- Li, H., Tornberg, J, Kaila, K, Airaksinen, M.S Rivera, C (2002) Patterns of cation-chloride cotransporter expression during embryonic rodent CNS development. *Eur J Neurosci* 16:2358-2370.
- Li, X.G., Somogyi, P, Tepper, J.M Buzsáki, G (1992) Axonal and dendritic arborization of an intracellularly labeled chandelier cell in the CA1 region of rat hippocampus. *Exp Brain Res* 90:519-525.
- Li, X.G., Somogyi, P, Ylinen, A Buzsáki, G (1994) The hippocampal CA3 network: an in vivo intracellular labeling study. *J Comp Neurol* 339:181-208.
- Lisman, J. (2005) The theta/gamma discrete phase code occurring during the hippocampal phase precession may be a more general brain coding scheme. *Hippocampus* 15:913-922.
- Lisman, J.E. (1997) Bursts as a unit of neural information: making unreliable synapses reliable. *Trends Neurosci* 20:38-43.
- Lisman, J.E. (1999) Relating hippocampal circuitry to function: recall of memory sequences by reciprocal dentate-CA3 interactions. *Neuron* 22:233-242.
- London, M., Schreibman, A, Häusser, M, Larkum, M.E Segev, I (2002) The information efficacy of a synapse. *Nat Neurosci* 5:332-340.

Lothman, E.W., Stringer, J.L Bertram, E.H (1992) The dentate gyrus as a control point for seizures in the hippocampus and beyond. *Epilepsy Res Suppl* 7:301-313.

MOUNTCASTLE, V.B., DAVIES, P.W BERMAN, A.L (1957) Response properties of neurons of cat's somatic sensory cortex to peripheral stimuli. *J Neurophysiol* 20:374-407.

Maccaferri, G. McBain, C.J (1996) Long-term potentiation in distinct subtypes of hippocampal nonpyramidal neurons. *J Neurosci* 16:5334-5343.

Malatesta, P., Hack, M.A, Hartfuss, E, Kettenmann, H, Klinkert, W, Kirchhoff, F Götz, M (2003) Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate. *Neuron* 37:751-764.

Manent, J., Demarque, M, Jorquera, I, Pellegrino, C, Ben-Ari, Y, Aniksztejn, L Represa, A (2005) A noncanonical release of GABA and glutamate modulates neuronal migration. *J Neurosci* 25:4755-4765.

Marandi, N., Konnerth, A Garaschuk, O (2002) Two-photon chloride imaging in neurons of brain slices. *Pflugers Arch* 445:357-365.

Markram, H., Toledo-Rodriguez, M, Wang, Y, Gupta, A, Silberberg, G Wu, C (2004) Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci* 5:793-807.

Marín-Padilla, M. (1998) Cajal-Retzius cells and the development of the neocortex. *Trends Neurosci* 21:64-71.

Masukawa, L.M., Benardo, L.S Prince, D.A (1982) Variations in electrophysiological properties of hippocampal neurons in different subfields. *Brain Res* 242:341-344.

Mattar, P., Britz, O, Johannes, C, Nieto, M, Ma, L, Rebeyka, A, Klenin, N, Polleux, F, Guillemot, F Schuurmans, C (2004) A screen for downstream effectors of Neurogenin2 in the embryonic neocortex. *Dev Biol* 273:373-389.

Mattar, P., Langevin, L.M, Markham, K, Klenin, N, Shivji, S, Zinyk, D Schuurmans, C (2008) Basic helix-loop-helix transcription factors cooperate to specify a cortical projection neuron identity. *Mol Cell Biol* 28:1456-1469.

McBain, C.J. Fisahn, A (2001) Interneurons unbound. *Nat Rev Neurosci* 2:11-23.

McBain, C.J., DiChiara, T.J Kauer, J.A (1994) Activation of metabotropic glutamate receptors differentially affects two classes of hippocampal interneurons and potentiates excitatory synaptic transmission. *J Neurosci* 14:4433-4445.

McCloskey, D.P. Scharfman, H.E (2011) Progressive, potassium-sensitive epileptiform activity in hippocampal area CA3 of pilocarpine-treated rats with recurrent seizures. *Epilepsy Res* .:

McDonald, A.J., Muller, J.F Mascagni, F (2002) GABAergic innervation of alpha type II calcium/calmodulin-dependent protein kinase immunoreactive pyramidal neurons in the rat basolateral amygdala. *J Comp Neurol* 446:199-218.

McNaughton, B.L., Barnes, C.A, Meltzer, J Sutherland, R.J (1989) Hippocampal granule cells are necessary for normal spatial learning but not for spatially-selective pyramidal cell discharge. *Exp Brain Res* 76:485-496.

Menendez de la Prida, L. Sanchez-Andres, J.V (2000) Heterogeneous populations of cells mediate spontaneous synchronous bursting in the developing hippocampus through a frequency-dependent mechanism. *Neuroscience* 97:227-241.

Metz, A.E., Jarsky, T, Martina, M Spruston, N (2005) R-type calcium channels contribute to afterdepolarization and bursting in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 25:5763-5773.

Metz, A.E., Spruston, N Martina, M (2007) Dendritic D-type potassium currents inhibit the spike afterdepolarization in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Physiol* 581:175-187.

Middleton, S., Jalics, J, Kispersky, T, Lebeau, F.E.N, Roopun, A.K, Kopell, N.J, Whittington, M.A Cunningham, M.O (2008) NMDA receptor-dependent switching between different gamma rhythm-generating microcircuits in entorhinal cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:18572-18577.

Mikkonen, J.E., Huttunen, J Penttonen, M (2006) Contribution of a single CA3 neuron to network synchrony. *Neuroimage* 31:1222-1227.

Miles, R. (1990) Synaptic excitation of inhibitory cells by single CA3 hippocampal pyramidal cells of the guinea-pig in vitro. *J Physiol* 428:61-77.

Miles, R. Wong, R.K (1983) Single neurones can initiate synchronized population discharge in the hippocampus. *Nature* 306:371-373.

Miles, R. Wong, R.K (1986) Excitatory synaptic interactions between CA3 neurones in the guinea-pig hippocampus. *J Physiol* 373:397-418.

Miyata, T., Kawaguchi, A, Okano, H Ogawa, M (2001) Asymmetric inheritance of radial glial fibers by cortical neurons. *Neuron* 31:727-741.

Mizuseki, K., Diba, K, Pastalkova, E Buzsáki, G (2011) Hippocampal CA1 pyramidal cells form functionally distinct sublayers. *Nat Neurosci* 14:1174-1181.

Mohajerani, M.H., Sivakumaran, S, Zacchi, P, Aguilera, P Cherubini, E (2007) Correlated network activity enhances synaptic efficacy via BDNF and the ERK pathway at immature CA3 CA1 connections in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:13176-13181.

Molnár, G., Oláh, S, Komlósi, G, Füle, M, Szabadics, J, Varga, C, Barzó, P Tamás, G (2008) Complex events initiated by individual spikes in the human cerebral cortex. *PLoS Biol* 6:e222.

Molyneaux, B.J., Arlotta, P, Menezes, J.R.L Macklis, J.D (2007) Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 8:427-437.

Monyer, H., Burnashev, N, Laurie, D.J, Sakmann, B Seeburg, P.H (1994) Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12:529-540.

Morgan, R.J. Soltesz, I (2008) Nonrandom connectivity of the epileptic dentate gyrus predicts a major role for neuronal hubs in seizures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:6179-6184.

Mountcastle, V.B. (1997) The columnar organization of the neocortex. *Brain* 120 (Pt 4):701-722.

Myers, C.E. Scharfman, H.E (2010) Pattern separation in the dentate gyrus: A role for the CA3 backprojection. *Hippocampus* :.

Nadarajah, B. Parnavelas, J.G (2002) Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 3:423-432.

Nadarajah, B., Alifragis, P, Wong, R.O.L Parnavelas, J.G (2003) Neuronal migration in the developing cerebral cortex: observations based on real-time imaging. *Cereb Cortex* 13:607-611.

Nakahira, E. Yuasa, S (2005) Neuronal generation, migration, and differentiation in the mouse hippocampal primordium as revealed by enhanced green fluorescent protein gene transfer by means of in utero electroporation. *J Comp Neurol* 483:329-340.

Nakashiba, T., Young, J.Z, McHugh, T.J, Buhl, D.L Tonegawa, S (2008) Transgenic inhibition of synaptic transmission reveals role of CA3 output in hippocampal learning. *Science* 319:1260-1264.

Narayanan, N.S., Kimchi, E.Y Laubach, M (2005) Redundancy and synergy of neuronal ensembles in motor cortex. *J Neurosci* 25:4207-4216.

Nelson, S. (2002) Cortical microcircuits: diverse or canonical?. *Neuron* 36:19-27.

Nielsen, J.V., Blom, J.B, Noraberg, J Jensen, N.A (2010) Zbtb20-induced CA1 pyramidal neuron development and area enlargement in the cerebral midline cortex of mice. *Cereb Cortex* 20:1904-1914.

Noctor, S.C., Flint, A.C, Weissman, T.A, Dammerman, R.S Kriegstein, A.R (2001) Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature* 409:714-720.

Noctor, S.C., Martínez-Cerdeño, V, Ivic, L Kriegstein, A.R (2004) Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci* 7:136-144.

O'Keefe, J. Recce, M.L (1993) Phase relationship between hippocampal place units and the EEG theta rhythm. *Hippocampus* 3:317-330.

- Packer, A.M. Yuste, R (2011) Dense, unspecific connectivity of neocortical parvalbumin-positive interneurons: a canonical microcircuit for inhibition?. *J Neurosci* 31:13260-13271.
- Palva, J.M., Lamsa, K, Lauri, S.E, Rauvala, H, Kaila, K Taira, T (2000) Fast network oscillations in the newborn rat hippocampus in vitro. *J Neurosci* 20:1170-1178.
- Panatier, A., Vallée, J, Haber, M, Murai, K.K, Lacaille, J Robitaille, R (2011) Astrocytes are endogenous regulators of basal transmission at central synapses. *Cell* 146:785-798.
- Paoletti, P., Vergnano, A.M, Barbour, B Casado, M (2009) Zinc at glutamatergic synapses. *Neuroscience* 158:126-136.
- Paolicelli, R.C., Bolasco, G, Pagani, F, Maggi, L, Scianni, M, Panzanelli, P, Giustetto, M, Ferreira, T.A, Guiducci, E, Dumas, L, Ragozzino, D Gross, C.T (2011) Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* 333:1456-1458.
- Parnavelas, J.G. (2000) The origin and migration of cortical neurones: new vistas. *Trends Neurosci* 23:126-131.
- Perea, G. Araque, A (2005) Glial calcium signaling and neuron-glia communication. *Cell Calcium* 38:375-382.
- Perea, G., Navarrete, M Araque, A (2009) Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci* 32:421-431.
- Petralia, R.S. Wenthold, R.J (1992) Light and electron immunocytochemical localization of AMPA-selective glutamate receptors in the rat brain. *J Comp Neurol* 318:329-354.
- Petrovic, M. Hummel, T (2008) Temporal identity in axonal target layer recognition. *Nature* 456:800-803.
- Picardo, M.A., Guigue, P, Bonifazi, P, Batista-Brito, R, Allene, C, Ribas, A, Fishell, G, Baude, A Cossart, R (2011) Pioneer GABA cells comprise a subpopulation of hub neurons in the developing hippocampus. *Neuron* 71:695-709.
- Pikkarainen, M., Rönkkö, S, Savander, V, Insausti, R Pitkänen, A (1999) Projections from the lateral, basal, and accessory basal nuclei of the amygdala to the hippocampal formation in rat. *J Comp Neurol* 403:229-260.
- Pinsker, H.M. (1977) Aplysia bursting neurons as endogenous oscillators. II. Synchronization and entrainment by pulsed inhibitory synaptic input. *J Neurophysiol* 40:544-556.
- Pinsker, H.M. (1977) Aplysia bursting neurons as endogenous oscillators. I. Phase-response curves for pulsed inhibitory synaptic input. *J Neurophysiol* 40:527-543.
- Pitkänen, A., Pikkarainen, M, Nurminen, N Ylinen, A (2000) Reciprocal connections between the amygdala and the hippocampal formation, perirhinal cortex, and postrhinal cortex in rat. A review. *Ann N Y Acad Sci* 911:369-391.

Pokorný, J. Yamamoto, T (1981) Postnatal ontogenesis of hippocampal CA1 area in rats. I. Development of dendritic arborisation in pyramidal neurons. *Brain Res Bull* 7:113-120.

Polleux, F. Snider, W (2010) Initiating and growing an axon. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a001925.

Poskanzer, K.E. Yuste, R (2011) Astrocytic regulation of cortical UP states. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:18453-18458.

Puchalla, J.L., Schneidman, E, Harris, R.A Berry, M.J (2005) Redundancy in the population code of the retina. *Neuron* 46:493-504.

Radnikow, G., Feldmeyer, D Lübke, J (2002) Axonal projection, input and output synapses, and synaptic physiology of Cajal-Retzius cells in the developing rat neocortex. *J Neurosci* 22:6908-6919.

Reillo, I. Borrell, V (2011) Germinal Zones in the Developing Cerebral Cortex of Ferret: Ontogeny, Cell Cycle Kinetics, and Diversity of Progenitors. *Cereb Cortex* .:

Reillo, I., de Juan Romero, C, García-Cabezas, M.Á Borrell, V (2011) A role for intermediate radial glia in the tangential expansion of the mammalian cerebral cortex. *Cereb Cortex* 21:1674-1694.

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* 397:251-255.

Romo-Parra, H., Treviño, M, Heinemann, U Gutiérrez, R (2008) GABA actions in hippocampal area CA3 during postnatal development: differential shift from depolarizing to hyperpolarizing in somatic and dendritic compartments. *J Neurophysiol* 99:1523-1534.

Roybon, L., Hjalt, T, Stott, S, Guillemot, F, Li, J Brundin, P (2009) Neurogenin2 directs granule neuroblast production and amplification while NeuroD1 specifies neuronal fate during hippocampal neurogenesis. *PLoS One* 4:e4779.

Safiulina, V.F., Zacchi, P, Taglialatela, M, Yaari, Y Cherubini, E (2008) Low expression of Kv7/M channels facilitates intrinsic and network bursting in the developing rat hippocampus. *J Physiol* 586:5437-5453.

Savić, N. Sciancalepore, M (2001) Electrophysiological characterization of "giant" cells in stratum radiatum of the CA3 hippocampal region. *J Neurophysiol* 85:1998-2007.

Scharfman, H.E. (2007) The neurobiology of epilepsy. *Curr Neurol Neurosci Rep* 7:348-354.

Scharfman, H.E. (2007) The CA3 "backprojection" to the dentate gyrus. *Prog Brain Res* 163:627-637.

Scharfman, H.E., Sollas, A.L, Smith, K.L, Jackson, M.B Goodman, J.H (2002) Structural and functional asymmetry in the normal and epileptic rat dentate gyrus. *J Comp Neurol* 454:424-439.

Schuurmans, C., Armant, O, Nieto, M, Stenman, J.M, Britz, O, Klenin, N, Brown, C, Langevin, L, Seibt, J, Tang, H, Cunningham, J.M, Dyck, R, Walsh, C, Campbell, K, Polleux, F Guillemot, F (2004) Sequential phases of cortical specification involve Neurogenin-dependent and -independent pathways. *EMBO J* 23:2892-2902.

Scott, E.K. Luo, L (2001) How do dendrites take their shape?. *Nat Neurosci* 4:359-365.

Seibt, J., Schuurmans, C, Gradwohl, G, Dehay, C, Vanderhaeghen, P, Guillemot, F Polleux, F (2003) Neurogenin2 specifies the connectivity of thalamic neurons by controlling axon responsiveness to intermediate target cues. *Neuron* 39:439-452.

Senior, T.J., Huxter, J.R, Allen, K, O'Neill, J Csicsvari, J (2008) Gamma oscillatory firing reveals distinct populations of pyramidal cells in the CA1 region of the hippocampus. *J Neurosci* 28:2274-2286.

Shao, L. Dudek, F.E (2009) Both synaptic and intrinsic mechanisms underlie the different properties of population bursts in the hippocampal CA3 area of immature versus adult rats. *J Physiol* 587:5907-5923.

Shapiro, L.A. Ribak, C.E (2005) Integration of newly born dentate granule cells into adult brains: hypotheses based on normal and epileptic rodents. *Brain Res Brain Res Rev* 48:43-56.

Sharma, A.K., Reams, R.Y, Jordan, W.H, Miller, M.A, Thacker, H.L Snyder, P.W (2007) Mesial temporal lobe epilepsy: pathogenesis, induced rodent models and lesions. *Toxicol Pathol* 35:984-999.

Shirasaki, R. Pfaff, S.L (2002) Transcriptional codes and the control of neuronal identity. *Annu Rev Neurosci* 25:251-281.

Shitamukai, A., Konno, D Matsuzaki, F (2011) Oblique radial glial divisions in the developing mouse neocortex induce self-renewing progenitors outside the germinal zone that resemble primate outer subventricular zone progenitors. *J Neurosci* 31:3683-3695.

Sik, A., Tamamaki, N Freund, T.F (1993) Complete axon arborization of a single CA3 pyramidal cell in the rat hippocampus, and its relationship with postsynaptic parvalbumin-containing interneurons. *Eur J Neurosci* 5:1719-1728.

Singec, I., Knoth, R, Ditter, M, Volk, B Frotscher, M (2004) Neurogranin is expressed by principal cells but not interneurons in the rodent and monkey neocortex and hippocampus. *J Comp Neurol* 479:30-42.

Sipilä, S.T., Huttu, K, Voipio, J Kaila, K (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 Ca²⁺ -activated K⁺ current. *Eur J Neurosci* 23:2330-2338.

Sipilä, S.T., Schuchmann, S, Voipio, J, Yamada, J Kaila, K (2006) The cation-chloride cotransporter NKCC1 promotes sharp waves in the neonatal rat hippocampus. *J Physiol* 573:765-773.

Skaggs, W.E., McNaughton, B.L, Wilson, M.A Barnes, C.A (1996) Theta phase precession in hippocampal neuronal populations and the compression of temporal sequences. *Hippocampus* 6:149-172.

Slomianka, L. Geneser, F.A (1997) Postnatal development of zinc-containing cells and neuropil in the hippocampal region of the mouse. *Hippocampus* 7:321-340.

Slomianka, L., Amrein, I, Knuesel, I, Sørensen, J.C Wolfer, D.P (2011) Hippocampal pyramidal cells: the reemergence of cortical lamination. *Brain Struct Funct* .:

Sloviter, R.S., Sollas, A.L, Barbaro, N.M Laxer, K.D (1991) Calcium-binding protein (calbindin-D28K) and parvalbumin immunocytochemistry in the normal and epileptic human hippocampus. *J Comp Neurol* 308:381-396.

Snyder, D.C., Coltman, B.W, Muneoka, K Ide, C.F (1991) Mapping the early development of projections from the entorhinal cortex in the embryonic mouse using prenatal surgery techniques. *J Neurobiol* 22:897-906.

Sohal, V.S., Zhang, F, Yizhar, O Deisseroth, K (2009) Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature* 459:698-702.

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

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

Soriano, E. Del Río, J.A (2005) The cells of cajal-retzius: still a mystery one century after. *Neuron* 46:389-394.

Spruston, N. (2008) Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. *Nat Rev Neurosci* 9:206-221.

Stancik, E.K., Navarro-Quiroga, I, Sellke, R Haydar, T.F (2010) Heterogeneity in ventricular zone neural precursors contributes to neuronal fate diversity in the postnatal neocortex. *J Neurosci* 30:7028-7036.

Steward, O. Falk, P.M (1991) Selective localization of polyribosomes beneath developing synapses: a quantitative analysis of the relationships between polyribosomes and developing synapses in the hippocampus and dentate gyrus. *J Comp Neurol* 314:545-557.

Supèr, H., Soriano, E Uylings, H.B (1998) The functions of the preplate in development and evolution of the neocortex and hippocampus. *Brain Res Brain Res Rev* 27:40-64.

Szabadics, J., Varga, C, Brunner, J, Chen, K Soltesz, I (2010) Granule cells in the CA3 area. *J Neurosci* 30:8296-8307.

Szabadics, J., Varga, C, Molnár, G, Oláh, S, Barzó, P Tamás, G (2006) Excitatory effect of GABAergic axo-axonic cells in cortical microcircuits. *Science* 311:233-235.

Szentágothai, J. (1975) The 'module-concept' in cerebral cortex architecture. *Brain Res* 95:475-496.

Sørensen, J.C., Tønder, N Slomianka, L (1993) Zinc-positive afferents to the rat septum originate from distinct subpopulations of zinc-containing neurons in the hippocampal areas and layers. A combined fluoro-gold tracing and histochemical study. *Anat Embryol (Berl)* 188:107-115.

Tabata, H. Nakajima, K (2003) Multipolar migration: the third mode of radial neuronal migration in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* 23:9996-10001.

Tamás, G., Lorincz, A, Simon, A Szabadics, J (2003) Identified sources and targets of slow inhibition in the neocortex. *Science* 299:1902-1905.

Thompson, C.L., Pathak, S.D, Jeromin, A, Ng, L.L, MacPherson, C.R, Mortrud, M.T, Cusick, A, Riley, Z.L, Sunkin, S.M, Bernard, A, Puchalski, R.B, Gage, F.H, Jones, A.R, Bajic, V.B, Hawrylycz, M.J Lein, E.S (2008) Genomic anatomy of the hippocampus. *Neuron* 60:1010-1021.

Tissir, F. Goffinet, A.M (2003) Reelin and brain development. *Nat Rev Neurosci* 4:496-505.

Traub, R.D., Miles, R Wong, R.K (1989) Model of the origin of rhythmic population oscillations in the hippocampal slice. *Science* 243:1319-1325.

Trevelyan, A.J., Sussillo, D, Watson, B.O Yuste, R (2006) Modular propagation of epileptiform activity: evidence for an inhibitory veto in neocortex. *J Neurosci* 26:12447-12455.

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. *J Neurosci* 31:10948-10970.

Tronson, N.C., Schrick, C, Guzman, Y.F, Huh, K.H, Srivastava, D.P, Penzes, P, Guede, A.L, Gao, C Radulovic, J (2009) Segregated populations of hippocampal principal CA1 neurons mediating conditioning and extinction of contextual fear. *J Neurosci* 29:3387-3394.

Truccolo, W., Donoghue, J.A, Hochberg, L.R, Eskandar, E.N, Madsen, J.R, Anderson, W.S, Brown, E.N, Halgren, E Cash, S.S (2011) Single-neuron dynamics in human focal epilepsy. *Nat Neurosci* 14:635-641.

Turner, D.A., Li, X.G, Pyapali, G.K, Ylinen, A Buzsaki, G (1995) Morphometric and electrical properties of reconstructed hippocampal CA3 neurons recorded in vivo. *J Comp Neurol* 356:580-594.

Turski, W.A., Cavalheiro, E.A., Schwarz, M., Czuczwar, S.J., Kleinrok, Z Turski, L (1983) Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res* 9:315-335.

Turski, W.A., Czuczwar, S.J., Kleinrok, Z Turski, L (1983) Cholinomimetics produce seizures and brain damage in rats. *Experientia* 39:1408-1411.

Tyzio, R., Cossart, R., Khalilov, I., Minlebaev, M., Hübner, C.A., Represa, A., Ben-Ari, Y Khazipov, R (2006) Maternal oxytocin triggers a transient inhibitory switch in GABA signaling in the fetal brain during delivery. *Science* 314:1788-1792.

Tyzio, R., Ivanov, A., Bernard, C., Holmes, G.L., Ben-Ari, Y Khazipov, R (2003) Membrane potential of CA3 hippocampal pyramidal cells during postnatal development. *J Neurophysiol* 90:2964-2972.

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. *J Neurosci* 19:10372-10382.

Vanderwolf, C.H. (1969) Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 26:407-418.

Varga, C., Lee, S.Y Soltesz, I (2010) Target-selective GABAergic control of entorhinal cortex output. *Nat Neurosci* 13:822-824.

Vazdarjanova, A. Guzowski, J.F (2004) Differences in hippocampal neuronal population responses to modifications of an environmental context: evidence for distinct, yet complementary, functions of CA3 and CA1 ensembles. *J Neurosci* 24:6489-6496.

Vida, I., Halasy, K., Szinyei, C., Somogyi, P Buhl, E.H (1998) Unitary IPSPs evoked by interneurons at the stratum radiatum-stratum lacunosum-moleculare border in the CA1 area of the rat hippocampus in vitro. *J Physiol* 506 (Pt 3):755-773.

Wang, K., Cui, J, Cai, Y, Wang, F, Li, Y, Tao, W Xiang, H (2009) Critical roles of voltage-dependent sodium channels in the process of synaptogenesis during the postnatal cortical development of rats. *Cell Mol Neurobiol* 29:1131-1142.

Wang, X., Tsai, J, LaMonica, B Kriegstein, A.R (2011) A new subtype of progenitor cell in the mouse embryonic neocortex. *Nat Neurosci* 14:555-561.

Williams, P.A., Larimer, P, Gao, Y Strowbridge, B.W (2007) Semilunar granule cells: glutamatergic neurons in the rat dentate gyrus with axon collaterals in the inner molecular layer. *J Neurosci* 27:13756-13761.

Witter, M.P. (2007) Intrinsic and extrinsic wiring of CA3: indications for connectional heterogeneity. *Learn Mem* 14:705-713.

- Witter, M.P., Griffioen, A.W, Jorritsma-Byham, B Krijnen, J.L (1988) Entorhinal projections to the hippocampal CA1 region in the rat: an underestimated pathway. *Neurosci Lett* 85:193-198.
- Wittner, L. Miles, R (2007) Factors defining a pacemaker region for synchrony in the hippocampus. *J Physiol* 584:867-883.
- Wittner, L., Henze, D.A, Záborszky, L Buzsáki, G (2006) Hippocampal CA3 pyramidal cells selectively innervate aspiny interneurons. *Eur J Neurosci* 24:1286-1298.
- Wonders, C.P. Anderson, S.A (2006) The origin and specification of cortical interneurons. *Nat Rev Neurosci* 7:687-696.
- Woodruff, A., Xu, Q, Anderson, S.A Yuste, R (2009) Depolarizing effect of neocortical chandelier neurons. *Front Neural Circuits* 3:15.
- Woodson, W., Nitecka, L Ben-Ari, Y (1989) Organization of the GABAergic system in the rat hippocampal formation: a quantitative immunocytochemical study. *J Comp Neurol* 280:254-271.
- Xie, Z., Ma, X, Ji, W, Zhou, G, Lu, Y, Xiang, Z, Wang, Y.X, Zhang, L, Hu, Y, Ding, Y Zhang, W.J (2010) Zbtb20 is essential for the specification of CA1 field identity in the developing hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:6510-6515.
- Xu, J. Clancy, C.E (2008) Ionic mechanisms of endogenous bursting in CA3 hippocampal pyramidal neurons: a model study. *PLoS One* 3:e2056.
- Yashiro, K. Philpot, B.D (2008) Regulation of NMDA receptor subunit expression and its implications for LTD, LTP, and metaplasticity. *Neuropharmacology* 55:1081-1094.
- Yu, Y., Bultje, R.S, Wang, X Shi, S (2009) Specific synapses develop preferentially among sister excitatory neurons in the neocortex. *Nature* 458:501-504.
- Yue, C. Yaari, Y (2006) Axo-somatic and apical dendritic Kv7/M channels differentially regulate the intrinsic excitability of adult rat CA1 pyramidal cells. *J Neurophysiol* 95:3480-3495.
- Yuste, R. (2011) Dendritic spines and distributed circuits. *Neuron* 71:772-781.
- Zhang, Z. (2004) Maturation of layer V pyramidal neurons in the rat prefrontal cortex: intrinsic properties and synaptic function. *J Neurophysiol* 91:1171-1182.
- de la Prida, L.M., Huberfeld, G, Cohen, I Miles, R (2006) Threshold behavior in the initiation of hippocampal population bursts. *Neuron* 49:131-142.
- van Groen, T., Miettinen, P Kadish, I (2003) The entorhinal cortex of the mouse: organization of the projection to the hippocampal formation. *Hippocampus* 13:133-149.

